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

**Fracionamento das proteínas do soro de leite por meio de agregação
proteica combinada com processos de separação por membranas**

- Dissertação de Mestrado -

Alisson de Oliveira

Porto Alegre

2017

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

Fracionamento das proteínas do soro de leite por meio de agregação proteica combinada com processos de separação por membranas

Alisson de Oliveira

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

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e Operações Unitárias

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Isabel Cristina Tessaro

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

À UFRGS e ao PPGEQ pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o mestrado.

Ao Itt Nutrifor - Unisinos pela doação de reagentes necessários para os experimentos.

À bolsista de iniciação científica, Tamizi Grando Sarmiento, pela ajuda durante a realização dos experimentos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

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 *Fracionamento das proteínas do soro de leite por meio de agregação proteica combinada com processos de separação por membranas*, elaborada por Alisson de Oliveira, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Florencia Cladera Olivera

Prof. Dr. Nilson Romeu Marcilio

Dr.^a Renata Moschini Daudt

Resumo

O soro de leite é o coproduto da produção de queijos e contém proteínas com excelentes propriedades nutricionais e tecnológicas. Dentre essas proteínas, as majoritárias são a β -lactoglobulina (BLG) e a α -lactalbumina (ALA). Embora o soro do leite já seja aproveitado pelas indústrias para a produção de isolados e concentrados proteicos, esses produtos consistem em uma mistura de diversas proteínas e atualmente há um grande interesse em realizar o seu fracionamento a fim de aproveitar melhor as suas propriedades individuais. Entretanto, fracionar essas proteínas é um grande desafio devido às suas massas molares próximas, e uma combinação de diferentes abordagens baseadas nas suas características se torna necessária para possibilitar uma boa separação. A ALA apresenta uma capacidade de formar agregados proteicos em meio ácido e ausência de cálcio, sendo uma estratégia interessante para combinar com processos de separação por membranas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar o fracionamento da BLG e da ALA a partir da agregação proteica combinada com processos de separação por membranas. O ajuste do pH para 4 e adição de citrato de sódio como agente complexante do íon cálcio possibilitou a formação de agregados proteicos da solução de isolado proteico do soro de leite 6 %, porém ao determinar a pressão de operação dessa solução utilizando membranas cerâmicas de microfiltração (MF) de 0,8 e 0,05 μm para reter os agregados proteicos, o fluxo de permeado foi baixo. O mesmo procedimento foi utilizado para a solução de soro do leite em pó 6 % e membrana de 0,8 μm , resultando, também, em um fluxo de permeado baixo durante a determinação da pressão de operação. Ao combinar a centrifugação com a ultrafiltração (UF), o sobrenadante, contendo a fração que não formou agregados proteicos, apresentou maiores fluxos de permeado em pH 7 e 10, e baixos fluxos em pH 3 e 4. A purificação do sobrenadante em pH 10 com membrana cerâmica de 5 kDa apresentou fluxo de permeado elevado e, quando a diafiltração foi realizada, o fluxo de permeado apresentou um comportamento ascendente e menor tendência ao *fouling*, variando entre 56,5 e 64,6 %. O sedimentado ressolubilizado em pH 10 também apresentou um fluxo de permeado elevado, porém com comportamento mais estável durante a diafiltração, e tendência ao *fouling* entre 81,4 e 84,6 %. Contudo, a agregação proteica precisa ser mais bem avaliada para separar as proteínas, bem como a retenção da membrana de 5 kDa,

a qual permitiu a passagem de parte das proteínas tanto do sobrenadante como do sedimentado ressolubilizado, sendo, ainda, verificado um pH mais elevado nos concentrados do que nos permeados e livre passagem dos demais íons mediante análise de condutividade elétrica. Os resultados demonstraram que o ajuste do pH para 10 possibilitou melhorar a performance do fluxo de permeado, provavelmente devido à menor interação proteína-proteína e proteína-membrana, além de ser uma estratégia interessante para minimizar os fatores limitantes em processos de separação por membranas.

Palavras-chave: proteínas do soro de leite, fracionamento, processos de separação por membranas, agregação proteica, fluxo de permeado, pH.

Abstract

Whey is the co-product of cheese production and contains proteins with excellent nutritional and technological properties. Among these proteins, β -lactoglobulin (BLG) and α -lactalbumin (ALA) are the main ones. Although whey is already used by industries to produce protein isolates and concentrates, these products consist of a mixture of several proteins and currently there is a great interest in their fractionation in order to take better advantage of their individual properties. However, fractionating whey proteins is a great challenge because of their similar molecular weight. Due to this, a combination of different approaches based on characteristics of each of these proteins becomes necessary to enable a good separation. ALA has the ability to form protein aggregates in an acidic media and absence of calcium, providing an interesting condition to combine with membrane separation processes. In view of this, the aim of this work was to fractionate BLG and ALA using a combination of protein aggregation procedure and membrane separation processes. Adjustment of pH to 4 and addition of sodium citrate as complexing agent of calcium ion allowed the formation of protein aggregates in whey protein isolate solution, but when microfiltration was carried out with ceramic membranes of 0.8 and 0.05 μm to retain the protein aggregates formed, permeate flux was low during the determination of the operating pressure of the process. The same procedure was used with whey powder solution and 0.8 μm membrane, also resulting in a low permeate flux when determining the operating pressure. By combining centrifugation with ultrafiltration, the supernatant containing the fraction that did not form protein aggregates showed higher permeate flux at pH 7 and 10, and lower permeate flux at pH 3 and 4. Purification of the supernatant at pH 10 with 5 kDa ceramic membrane showed high permeate flux and, when the diafiltration was performed, the permeate flux presented an upward behavior and lower fouling tendency, varying between 56.5 and 64.6 %. The resolubilized sediment at pH 10 also showed a higher permeate flux, but with a more stable behavior during diafiltration and fouling tendency between 81.4 and 84.6 %. Nevertheless, protein aggregation procedure needs to be better evaluated to separate the proteins as well as the retention of the 5 kDa membrane, which allowed passage of part of the proteins of the supernatant and the resolubilized sediment solutions and showed a higher pH in the

concentrates than in the final permeate and free passage of the other ions evaluated by electrical conductivity analysis. The results showed that adjusting the pH to 10 allowed to improve the performance of permeate flux, probably due to the lower protein-protein and protein-membrane interactions, besides being an interesting strategy to minimize the limiting factors in PSM.

Keywords: whey proteins, fractionation, membrane separation processes, protein aggregation, permeate flux, pH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da produção do soro de leite doce e do soro de leite ácido.....	7
Figura 2. Composição típica dos diferentes concentrados proteicos do soro de leite (<i>whey protein concentrate</i> - WPC).	10
Figura 3. Estrutura quaternária da BLG em função do pH do meio em baixa temperatura e baixa concentração.	16
Figura 4. Mecanismo de precipitação da α -lactalbumina na presença de um agente quelante (citrato) e condições ácidas, em que K_G é a constante de equilíbrio e k é a constante de velocidade da reação.....	18
Figura 5. Representação esquemática de um processo de separação por membrana em que a corrente de alimentação foi separada em duas correntes, concentrado e permeado.....	29
Figura 6. Representação esquemática de um sistema contendo duas fases separadas por uma membrana.	30
Figura 7. Representação esquemática dos processos de filtração transversal e tangencial juntamente com o comportamento do fluxo de permeado e formação de torta durante PSM (R_T é a resistência da torta formada sobre a membrana pelo soluto impermeável, R_M é a resistência da membrana e J é o fluxo do permeado).	30
Figura 8. Comportamento típico do fluxo de permeado durante PSM.....	33
Figura 9. Comportamento do fluxo de permeado para água pura e uma solução em função da pressão.	34
Figura 10. Representação da polarização por concentração em PSM.	34
Figura 11. Modelo esquemático da polarização por concentração, em que C_b é a concentração do soluto no seio da solução; C_g é a concentração do soluto na camada de gel; C_w é a concentração de soluto na superfície interna da membrana; C_p é a concentração do soluto no permeado; $J_{Convecção}$ é o fluxo do soluto por convecção; $J_{Difusão}$ é o fluxo do soluto por difusão.	35
Figura 12. Efeito da polarização por concentração e <i>fouling</i> sobre o fluxo de permeado durante PSM.	36

Figura 13. Representação esquemática do efeito da pressão sobre uma membrana de UF: formação da camada de gel e efeito sobre o fluxo de permeado.	38
Figura 14. Classificação dos processos de separação por membranas.	39
Figura 15. Representação esquemática do modo de operação em diafiltração contínua.	41
Figura 16. Representação esquemática do modo de operação em diafiltração descontínua.	41
Figura 17. Fluxograma da metodologia experimental utilizada para fracionar as proteínas do soro de leite e do isolado proteico do soro de leite.	53
Figura 18. Fotografias da membrana de MF: (A) vista lateral e (B) seção transversal.	55
Figura 19. Fotografias das membranas de UF e MF: (A) vista lateral das membranas de 5 kDa (inferior), 0,05 μm (centro) e 0,8 μm (superior)) e (B) seção transversal da membrana de 5 kDa (direita), 0,05 μm (centro) e 0,8 μm (esquerda).	59
Figura 20. Representação esquemática do sistema de bancada para realização dos experimentos de MF e UF.	64
Figura 21. Fotografia do sistema de UF e MF construído para realização dos experimentos.	65
Figura 22. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de MF de 0,05 μm , solução de isolado proteico 6 % (m v^{-1}), velocidade de escoamento de 0,99 m s^{-1} e temperatura de 55 $^{\circ}\text{C}$	72
Figura 23. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de MF de 0,8 μm , solução de isolado proteico 6 % (m v^{-1}), velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 $^{\circ}\text{C}$	73
Figura 24. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de MF de 0,8 μm e solução de soro de leite 6 % (m v^{-1}) com velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e na temperatura de 55 $^{\circ}\text{C}$	74
Figura 25. Resultados da análise de eletroforese para a solução inicial de soro de leite 6 % em pH 6,35 (sem pré-tratamento) e as diferentes frações obtidas após a agregação proteica e centrifugação: (1) soro do leite 6 % (m v^{-1}), (2) sobrenadante, (3) sedimentado ressolubilizado, (4) marcador de massa molar.	78
Figura 26. Aspecto visual das soluções de soro de leite 6 % (m v^{-1}) em pH 6,35 (sem pré-tratamento), sedimentado ressolubilidade e sobrenadante.	80

Figura 27. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução de soro de leite 6 % (m v ⁻¹), velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.	82
Figura 28. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 4, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.....	83
Figura 29. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 3, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.....	84
Figura 30. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 7, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.....	85
Figura 31. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 10, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.....	86
Figura 32. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.	88
Figura 33. Comportamento do fluxo de permeado em função do tempo durante a UF da solução de soro de leite em pó 6 % (m v ⁻¹), utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de P = 0,25 kgf cm ⁻² , v = 0,99 m s ⁻¹ e T = 55 °C.	89
Figura 34. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução de soro de leite em pó 6 % (m v ⁻¹) e das diferentes correntes obtidas após a UF utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de P = 0,25 kgf cm ⁻² , v = 0,99 m s ⁻¹ e T = 55 °C.....	90
Figura 35. Comportamento do fluxo de permeado em função do tempo durante a UF da solução sobrenadante em pH 4 (UF8-A e UF9-B) em comparação com a solução de soro de leite 6 % (m v ⁻¹), utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de P = 0,25 kgf cm ⁻² , v = 0,99 m s ⁻¹ e T = 55 °C.....	91
Figura 36. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução sobrenadante em pH 4 e das diferentes correntes obtidas após a UF utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de P = 0,25 kgf cm ⁻² , v = 0,99 m s ⁻¹ e T = 55 °C.	93

Figura 37. Comportamento do fluxo de permeado durante a UF /DF (5 kDa) do sobrenadante em pH 10 (UF9-A e UF9-B), nas condições de $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ comparado com o fluxo de permeado durante a UF da solução de soro de leite 6 % em pH 6,35 (UF7-B), nas condições de $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$	94
Figura 38. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução sobrenadante em pH 10 e das diferentes correntes obtidas após a UF/DF utilizando membrana de 5 kDa nas condições de $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$	95
Figura 39. Concentração de proteína das diferentes correntes obtidas por meio da UF/DF utilizando a solução sobrenadante em pH 10.	98
Figura 40. Eletroforese das diferentes correntes durante a UF/DF com a solução sobrenadante em pH 10. (A) UF9-A e (B) UF9-B; (1) soro de leite 6 %, (2) sobrenadante inicial, (3) concentrado, (4) Pré-DF, (5) DF1, (6) DF2, (7) DF3, (8) DF4, (9) marcador de massa molar.	99
Figura 41. Comportamento do fluxo de permeado durante a UF /DF (5 kDa) da solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10 (UF10-A e UF10-B), $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ comparado com o fluxo de permeado durante a UF da solução de soro de leite 6 % em pH 6,35 (UF7-B), $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$	100
Figura 42. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução sedimentado ressolubilizado em pH 10 e das diferentes correntes obtidas após a UF/DF utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$	102
Figura 43. Aspecto da solução correspondente so sedimentado ressolubilizado pH 10 ao longo do experimento. (A) à temperatura ambiente; (B) a $55 \text{ }^\circ\text{C}$; (C) a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ no tanque de alimentação sem movimentação da solução; (D) a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ no tanque de alimentação com movimentação da solução; (E) concentrado final.....	103
Figura 44. Concentração de proteína das diferentes correntes obtidas por meio da UF/DF utilizando a solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10.	105
Figura 45. Eletroforese das diferentes correntes durante a UF/DF com a solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10. A) UF10-A e B) UF10-B. (1) soro de leite 6 %, (2) sedimentado ressolubilizado inicial, (3) concentrado, (4) Pré-DF, (5) DF1, (6) DF2, (7) DF3, (8) DF4, (9) marcador de massa molar.....	106
Figura A1. Compactação da membrana de microfiltração de $0,05 \text{ }\mu\text{m}$, água destilada, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $P = 1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos MF1-A e MF1-B.....	121

Figura A2. Determinação da permeância para a membrana de microfiltração de 0,05 μm , água destilada, $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos MF1-A e MF1-B.....	121
Figura A3. Compactação da membrana de microfiltração de 0,8 μm , água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 1,5\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos MF2-A e MF2-B.....	122
Figura A4. Determinação da permeância para a membrana de microfiltração de 0,8 μm , água destilada, $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos MF2-A e MF2-B.....	122
Figura A5. Compactação da membrana de microfiltração de 0,8 μm , água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 1,5\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos MF3-A e MF3-B.....	123
Figura A6. Determinação da permeância para a membrana de microfiltração de 0,8 μm , água destilada, $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos MF3-A e MF3-B.....	123
Figura A7. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 2,0\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos UF1-A e UF1-B.	124
Figura A8. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos UF1-A e UF1-B.	124
Figura A9. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 2,0\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos UF2-A e UF2-B.	125
Figura A10. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos UF2-A e UF2-B.	125
Figura A11. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 2,0\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos UF3-A e UF3-B.	126
Figura A12. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos UF3-A e UF3-B.	126
Figura A13. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 2,0\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos UF4-A e UF4-B.	127
Figura A14. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos UF4-A e UF4-B.	127
Figura A15. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 2,0\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos UF5-A e UF5-B.	128
Figura A16. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e referente aos experimentos UF5-A e UF5-B.	128

Figura A17. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm ⁻² e referente aos experimentos UF6-A e UF6-B.	129
Figura A18. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF6-A e UF6-B.	129
Figura A19. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm ⁻² e referente aos experimentos UF7-A e UF7-B.	130
Figura A20. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF7-A e UF7-B.	130
Figura A21. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm ⁻² e referente aos experimentos UF8-A e UF8-B.	131
Figura A22. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF8-A e UF8-B.	131
Figura A23. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm ⁻² e referente aos experimentos UF9-A e UF9-B.	132
Figura A24. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF9-A e UF9-B.	132
Figura A25. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm ⁻² e referente aos experimentos UF10-A e UF10-B.	133
Figura A26. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF10-A e UF10-B.	133
Figura D1. Primeira curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas.....	147
Figura D2. Segunda curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas.....	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição característica do soro de leite doce e do soro de leite ácido.	7
Tabela 2. Composição típica das proteínas isoladas obtidas por PSM e troca iônica.	11
Tabela 3. Propriedades nutricionais de algumas proteínas de origem animal.	13
Tabela 4. Definições das propriedades tecnológicas das proteínas.	14
Tabela 5. Composição típica das proteínas do soro de leite doce e suas propriedades físicas.	15
Tabela 6. Composição de aminoácidos das proteínas BLG, ALA e CMP.	21
Tabela 7. Composição química do soro de leite em pó Pic-Nic.	50
Tabela 8. Informação nutricional da proteína isolada Provon [®] 292 da Ganblia Nutritionals (porção de 100 g).	51
Tabela 9. Lista de reagentes utilizados nos experimentos e análises.	52
Tabela 10. Velocidade de escoamento utilizada para determinar a pressão de operação para cada solução e membrana.	57
Tabela 11. Relação entre a velocidade máxima para cada pressão.	57
Tabela 12. Valores de pH das soluções utilizadas nos experimentos de determinação da pressão de operação.	60
Tabela 13. Informações sobre cada uma das soluções e correntes envolvidas no processo de ultrafiltração e diafiltração.	61
Tabela 14. Informações sobre os experimentos utilizando a membrana de ultrafiltração de 5 kDa.	63
Tabela 15. Dados dos experimentos envolvendo as membranas que antecederam a determinação da pressão de operação - permeância, tempo total de compactação e variação relativa da permeância.	71
Tabela 16. Concentração de proteína e pH da solução de soro de leite em pó 6 % (m v ⁻¹) e das frações obtidas, sobrenadante e sedimentado ressolubilizado, após a realização da formação de agregados proteicos e centrifugação.	77

Tabela 17. Resultados de turbidez para as soluções de soro de leite 6 % ($m v^{-1}$), sobrenadante e sedimentado ressolubilizado.	80
Tabela 18. Permeância (K_p) da membrana de 5 kDa antes da realização dos experimentos (limpa) e após a realização dos experimentos (suja) e tendência ao <i>fouling</i> gerado para as diferentes soluções submetidas ao processo de UF.	107
Tabela B1. Fluxo de permeado durante a determinação da pressão de operação com membrana de MF, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$	134
Tabela B2. Fluxo de permeado durante a determinação da pressão de operação com membrana de UF, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$	135
Tabela B3. Fluxo de permeado durante a determinação da pressão de operação com membrana de UF, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$	136
Tabela B4. Dados do fluxo de permeado para os experimento UF7-A e UF7-B, $P = 0,25\text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $v = 0,99\text{ m s}^{-1}$	138
Tabela B5. Dados do fluxo de permeado para os experimento UF7-A e UF7-B, $P = 0,25\text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $v = 0,99\text{ m s}^{-1}$	139
Tabela B6. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF9-A, $P = 0,5\text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $v = 1,2\text{ m s}^{-1}$	140
Tabela B7. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF9-B, $P = 0,5\text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $v = 1,2\text{ m s}^{-1}$	141
Tabela B8. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF10-A, $P = 0,5\text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $v = 1,2\text{ m s}^{-1}$	142
Tabela B9. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF10-B, $P = 0,5\text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $v = 1,2\text{ m s}^{-1}$	143
Tabela C1. Condutividade elétrica e pH das soluções iniciais utilizadas nos experimentos de MF e UF.	144

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

ΔC	diferença de concentração
ΔE	diferença de potencial elétrico
ΔP	diferença de pressão
ΔP_{TM}	pressão transmembrana
ΔT	diferença de temperatura
μ	viscosidade
A	área
ALA	α -lactalbumina
BLG	β -lactoglobulina
BSA	albumina do soro bovino
C_b	concentração de soluto no seio da solução
C_f	concentração de soluto na solução de alimentação
C_g	concentração de soluto na camada gel
CMP	caseinomacropéptido
C_p	concentração de soluto no permeado
C_w	concentração de soluto na superfície interna da membrana
DF	diafiltração
Igs	imunoglobulinas
J	fluxo de permeado
k	constante de velocidade da reação
K_G	constante de equilíbrio
k_p	permeabilidade
K_p	permeância
LF	lactoferrina
LP	lactoperoxidase
$m v^{-1}$	massa por volume
m	massa
MF	microfiltração
MMC	massa molar de corte
P	pressão

pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PPs	proteose peptonas
PSM	processos de separação por membranas
R	retenção
R _M	resistência da membrana
R _T	resistência da torta formada sobre a membrana
T	temperatura
t	tempo
UF	ultrafiltração
v	velocidade de escoamento
V	volume
x _A	concentração do componente A na solução de alimentação
x _B	concentração do componente B na solução de alimentação
y _A	concentração do componente A no permeado
y _B	concentração do componente B no permeado
α	fator de separação

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Objetivos	4
<i>2.1. Objetivo geral</i>	<i>4</i>
<i>2.2. Objetivos específicos</i>	<i>4</i>
Capítulo 3 - Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica	6
<i>3.1. Soro de leite</i>	<i>6</i>
<i>3.2. Produtos proteicos obtidos a partir do soro de leite</i>	<i>9</i>
3.2.1. Concentrados proteicos do soro de leite	10
3.2.2. Isolados proteicos do soro de leite.....	11
<i>3.3. Propriedades das proteínas</i>	<i>12</i>
3.3.1. Propriedades nutricionais	12
3.3.2. Propriedades tecnológicas	13
3.3.3. Funções biológicas	14
<i>3.3. Proteínas do soro de leite</i>	<i>15</i>
3.3.1. β -lactoglobulina.....	16
3.3.2. α -lactalbumina	17
3.3.3. Caseinomacropéptido.....	20
3.3.4. Albumina do soro bovino	23
3.3.5. Lactoferrina	23
3.3.6. Lactoperoxidase.....	24
3.3.7. Imunoglobulinas	24
3.3.8. Proteose-peptonas.....	25
<i>3.4. Fracionamento das proteínas do soro de leite</i>	<i>26</i>
<i>3.5. Processos de separação por membranas</i>	<i>29</i>
3.5.1. Conceitos em processos de separação por membranas	31
3.5.1.1. Fluxo de permeado	31
3.5.1.2. Seletividade.....	32

3.5.1.4. Fatores limitantes em processos de separação por membranas: polarização por concentração e fouling	33
3.5.1.5. Compactação.....	37
3.5.1.6. Fluxo crítico, fluxo limite, pressão crítica e pressão limite	37
3.5.3. Microfiltração e ultrafiltração.....	38
3.5.3. Diafiltração	40
3.5.4. Aplicação de processos de separação por membranas envolvendo soluções contendo proteínas e desafios.....	42
3.4. Revisão de trabalhos sobre o fracionamento das proteínas do soro de leite	43
3.5. Considerações finais.....	48
Capítulo 4 - Materiais e Métodos	49
4.1. Matéria-Prima.....	49
4.1.2. Isolado proteico do soro de leite.....	50
4.2. Reagentes	51
4.3. Experimentos	52
4.3.1. Preparo da solução.....	53
4.3.1.1. Solução de soro de leite.....	53
4.3.1.2. Solução de isolado proteico do soro de leite.....	54
4.3.1.3. Características físico-químicas da água	54
4.3.2. Tratamento térmico.....	54
4.3.3. Microfiltração	55
4.3.3.1. Módulo e membranas	55
4.3.3.2. Compactação das membranas.....	55
4.3.3.3. Determinação da permeância hidráulica.....	56
4.3.3.4. Determinação da pressão de operação	56
4.3.4. Centrifugação.....	58
4.3.5. Ressolubilização do sedimentado	58
4.3.6. Ultrafiltração e diafiltração.....	59
4.3.6.1. Módulo e membrana.....	59
4.3.6.2. Compactação.....	59
4.3.6.3. Determinação da permeância hidráulica.....	60
4.3.6.4. Determinação da pressão de operação	60

4.3.6.5. Diafiltração	61
4.3.6.6. Determinação da tendência ao fouling	62
4.3.6.7. Identificação dos experimentos de UF	62
4.4. Sistema de microfiltração e de ultrafiltração	63
4.5. Limpeza das membranas	65
4.6. Análises	67
4.6.2. Eletroforese (SDS-PAGE).....	68
4.6.3. Medição de pH, condutividade elétrica e turbidez	69
Capítulo 5 - Resultados e Discussão	70
5.1. Microfiltração	70
5.1.1. Determinação da pressão de operação.....	72
5.1.1.2. Solução de soro de leite.....	74
5.2. Centrifugação	76
5.3. Ultrafiltração.....	81
5.3.1. Determinação da pressão de operação.....	81
5.3.1.1. Solução de soro de leite.....	81
5.3.1.2. Solução sobrenadante.....	82
5.3.1.3. Solução de sedimentado ressolubilizado.....	87
5.3.2. Concentração	89
5.3.2.1. Soro de leite.....	89
5.3.2.2. Solução sobrenadante em pH 10.....	94
5.3.2.3. Sedimentado ressolubilizado pH 10	100
5.3.2.4. Determinação da tendência ao fouling	107
Capítulo 6 - Conclusões	110
Capítulo 7 - Sugestões para Trabalhos Futuros	112
Referências	114
Apêndice A	121
Apêndice B.....	134
Apêndice C	144
Apêndice D	147

Capítulo 1 - Introdução

O soro de leite corresponde à fração aquosa do leite e é gerado no processo de produção de queijos. Essa fração contém proteínas com excelentes propriedades nutricionais, tecnológicas e biológicas, tornando interessante a recuperação dessas proteínas para aplicações pela indústria de alimentos e farmacêutica, porém elas encontram-se diluídas e acompanhadas de grande quantidade de lactose, além da presença de sais

Durante o processamento de queijos, é gerada uma grande quantidade de soro de leite. A cada 10 kg de leite utilizados na produção de queijos, apenas 1 kg se torna queijo, ao passo que os 9 kg restantes dão origem ao soro de leite. O soro gerado pela indústria de laticínios costumava ser descartado de forma inadequada, causando poluição ambiental devido à sua composição orgânica, ou utilizado como fertilizante ou, ainda, na alimentação de animais, simplesmente desprezando-se as excelentes propriedades de suas proteínas. Contudo, graças aos avanços dos processos de separação e purificação, sobretudo os processos de separação por membranas, foi possível que as proteínas do soro de leite pudessem ser recuperadas, separadas da lactose e dos sais, e aplicadas em alimentos destinados a humanos. Hoje há diversos ingredientes obtidos a partir do soro, como o soro de leite em pó, o soro de leite desmineralizado, a lactose, e, no que diz respeito às proteínas, destacam-se os concentrados e os isolados proteicos. No entanto, esses produtos proteicos consistem em uma mistura de

diversas proteínas e, atualmente, há um grande interesse em obter as frações individuais das diferentes proteínas presentes no soro de leite.

Fracionar as proteínas do soro de leite é um grande desafio devido ao tamanho próximo das proteínas, principalmente em relação às proteínas majoritárias β -lactoglobulina (BLG) e α -lactalbumina (ALA). Dessa forma, ao utilizar os processos de separação por membranas, os quais são mais adequados para aplicações industriais e produção de grandes volumes, é necessário avaliar outras características dessas proteínas além de suas massas molares a fim de possibilitar o fracionamento.

Em pH ácido e ausência de cálcio, a ALA se torna instável e insolúvel, possibilitando sua separação do restante da solução contendo as demais proteínas. Assim, essa propriedade da ALA pode ser aproveitada por meio da adição de um agente complexante do íon cálcio como uma forma de realizar o fracionamento das proteínas.

Muitos estudos utilizando um agente complexante de cálcio para fracionar as proteínas do soro geralmente utilizam produtos derivados do soro de leite, como os concentrados e isolados proteicos. Contudo, ao adicionar o agente complexante e ácido à solução contendo as proteínas, essas proteínas necessitarão passar por um novo processo de purificação, como a diafiltração, mediante processos de separação por membranas, para que ocorra a remoção dessas moléculas de baixa massa molar.

Diante disso, este trabalho tem como objetivo realizar o fracionamento das proteínas majoritárias do soro de leite mediante a realização da agregação térmica da ALA combinada com processos de separação por membranas.

Para a compreensão deste trabalho, a seguir é apresentada a divisão dos capítulos e os seus conteúdos.

No capítulo 2 são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

No capítulo 3 é realizada uma fundamentação teórica sobre o soro de leite, produtos proteicos derivados do soro, formas de obtenção e informações sobre as propriedades de cada uma das proteínas presentes para justificar a importância do estudo realizado neste

trabalho. Também são apresentados alguns conceitos sobre processos de separação por membranas para possibilitar um bom entendimento do processo de fracionamento, concentração e purificação. Por fim, uma revisão sobre pesquisas realizadas com o objetivo de fracionar as proteínas do soro de leite é apresentada.

No capítulo 4 são apresentados os materiais e métodos para a realização do estudo experimental.

No capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos levando-se em consideração as diferentes condições físico-químicas e operacionais e como elas podem afetar o processo.

No capítulo 6 são apresentadas as conclusões obtidas com a realização deste estudo.

Por fim, sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no capítulo 7.

Capítulo 2 - Objetivos

Neste capítulo são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a utilização de um pré-tratamento para promover a agregação de uma das proteínas do soro de leite para realizar o fracionamento das suas proteínas majoritárias, β -lactoglobulina e α -lactalbumina, combinado com processos de separação por membranas.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são os seguintes:

- Avaliar as diferentes frações, obtidas mediante a realização do pré-tratamento, em relação às proteínas, pH e turbidez;

-
- Avaliar as melhores condições operacionais, pH e membrana mais adequada para a realização dos processos de separação por membranas após a realização do pré-tratamento;
 - Comparar a performance do fluxo de permeado durante o processo de separação por membrana do soro de leite sem a utilização do pré-tratamento com o fluxo de permeado do processo de separação por membrana após a realização do pré-tratamento;
 - Avaliar a utilização de diafiltração para purificar o concentrado, como também seu efeito sobre o fluxo de permeado;
 - Avaliar os concentrados e os permeados obtidos em relação às proteínas, ao pH e à condutividade elétrica.

Capítulo 3 - Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

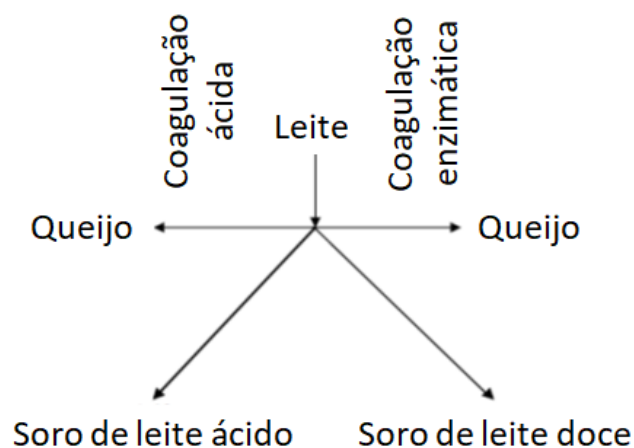
Neste capítulo é apresentada a fundamentação teórica referente ao soro de leite, às suas proteínas, bem como os fundamentos dos processos de separação por membranas para que haja uma boa compreensão da metodologia empregada e dos resultados obtidos com o método proposto neste trabalho. Além disso, são apresentados alguns trabalhos que tiveram como objetivo a realização do fracionamento das proteínas do soro de leite para que se tenha um bom entendimento das abordagens utilizadas até o momento para fracionar essas proteínas.

3.1. Soro de leite

O soro de leite corresponde à porção aquosa do leite obtida por meio da coagulação ácida, térmica ou enzimática (PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001). É um líquido opaco que apresenta cor amarelo-esverdeada, com um conteúdo total de sólidos variando entre 6,0 e 6,5 % ($m v^{-1}$), dos quais cerca de 5,4 % são lactose e 0,6 - 0,7 % são proteínas, as quais representam cerca de 20 % das proteínas totais do leite (HUFFMAN; FERREIRA, 2011). O soro de leite é o principal coproduto da produção de queijos e de caseína pelas indústrias de laticínios e, além de lactose e proteínas, contém sais, vitaminas, lipídeos e

resíduos da produção de queijo ou de caseína (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; HUFFMAN; FERREIRA, 2011). De acordo com a forma de obtenção, o soro de leite pode ser ácido ou doce, conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da produção do soro de leite doce e do soro de leite ácido.



Fonte: adaptado de Madureira *et al.* (2007).

Entre os dois tipos de soro de leite, a produção do soro de leite ácido e, conseqüentemente, a sua utilização em alimentos são significativamente menores do que as do soro de leite doce (SIENKEWICZ; RIEDEL, 1990 *apud* ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013). A Tabela 1 apresenta as composições do soro de leite doce e ácido.

Tabela 1. Composição característica do soro de leite doce e do soro de leite ácido.

Constituintes	Soro de leite doce (g L ⁻¹)	Soro de leite ácido (g L ⁻¹)
Sólidos totais	63,0-70,0	63,0-70,0
Lactose	46,0-52,0	44,0-46,0
Proteína	6,0-10,0	6,0-8,0
Gordura	5,0	0,4
Lactato	2,0	6,4
Cinzas	5,0	8,0
Cálcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfato	1,0-3,0	2,0-4,5
Cloreto	1,1	1,1

Fonte: adaptado de Jelen (2009).

A composição do soro de leite depende de diversos fatores, tais como o tipo de soro de leite (ácido ou doce), a espécie animal fonte do leite (bovinos, caprinos ou ovinos), a raça, a época do ano, a dieta, o estágio de lactação e a forma de processamento subsequente (PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001).

As principais diferenças entre os dois tipos de soro de leite são os teores de minerais, proteínas e lipídeos. O soro de leite ácido apresenta uma maior concentração de sais minerais devido à solubilização do fosfato de cálcio coloidal das micelas de caseína que ocorre com a acidificação (PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001). Para produzir o soro ácido, as proteínas do leite podem ser precipitadas pela adição de ácido láctico, ácido acético ou ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico. Quando o ácido láctico é utilizado para coagular as proteínas do leite, o soro de leite é chamado de soro ácido, ao passo que o soro gerado pela utilização dos outros ácidos dá origem ao chamado soro de leite industrial (ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013). Em relação ao soro de leite doce, o qual é obtido por meio da coagulação enzimática, devido à presença da proteína caseinomacropéptido, um teor de proteína maior pode ser encontrado (HUFFMAN; FERREIRA, 2011). No que diz respeito à diferença no conteúdo de gordura entre os dois tipos de soro de leite, o menor teor encontrado no soro de leite ácido se deve à utilização do leite desnatado na produção de queijo *cottage* ou outros queijos similares (MILLER; JARVIS; MCBEAN, 2002).

Durante a fabricação do queijo, 10 kg de leite geram cerca de 1 kg de queijo e 9 kg de soro de leite (HUFFMAN; FERREIRA, 2011; PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001). Com o aumento da quantidade de leite utilizado para a produção de queijos, caseína, caseinato e outros produtos lácteos, ocorre um aumento concomitante no volume de soro de leite produzido (SMITHERS, 2008). Além disso, o soro de leite gerado representa um importante problema de gestão para os pequenos e médios produtores de queijo, uma vez que a maior parte do leite utilizado para a fabricação de queijo é descartada como soro de leite (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Antes de 1970, a indústria de laticínios considerava o soro de leite como um resíduo, descartando-o caso não fosse usado para alimentação animal ou aplicado em campos como fertilizante líquido. Foram as rigorosas normas ambientais implementadas em todo o mundo que fizeram a indústria queijeira desenvolver maneiras de utilizar o soro gerado para

diferentes fins, combinadas com pesquisas sobre tecnologias de separação e purificação, com foco especial na tecnologia de ultrafiltração para o processamento do soro de leite. Como resultado, as indústrias de laticínios começaram a processar o soro de leite, obtendo uma variedade de produtos, tais como soro de leite em pó, soro de leite desmineralizado, proteína concentrada do soro de leite, proteína isolada do soro de leite, entre outros. A recuperação dos componentes sólidos do soro de leite se tornou atraente por duas razões principais: para reduzir a poluição orgânica causada pelo soro do soro de leite ao ser descartado e, sobretudo, para o melhor aproveitamento das propriedades tecnológicas e nutricionais oferecidas pelas suas proteínas (ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013; BONNAILLIE; TOMASULA, 2008; SMITHERS, 2008; OSTOJIC *et al.*, 2005 *apud* BONNAILLIE; TOMASULA, 2008).

No Brasil, o volume de soro de leite gerado anualmente é de cerca de quatro bilhões de litros. Estima-se ainda que metade desse montante é descartado no meio ambiente, o que representa aproximadamente dois bilhões de litros. Mesmo com essa grande produção de soro de leite, o Brasil é um dos maiores importadores do produto em pó. O não aproveitamento do soro de leite gerado no Brasil se deve ao fato dos pequenos laticínios não possuírem volume e padrão para aproveitar o potencial do soro de leite resultante da produção de queijos e derivados (EMBRAPA, 2015).

O soro de leite em pó, o qual contém cerca da metade dos sólidos do leite, ainda é o principal produto no que diz respeito ao volume. O baixo teor de proteínas no soro de leite em pó limita sua aplicação em alimentos. No entanto, os processos de separação possibilitam o aumento do teor de proteína, dando origem a ingredientes com maior valor agregado e adequados para serem aplicados em alimentos (DE BOER, 2014).

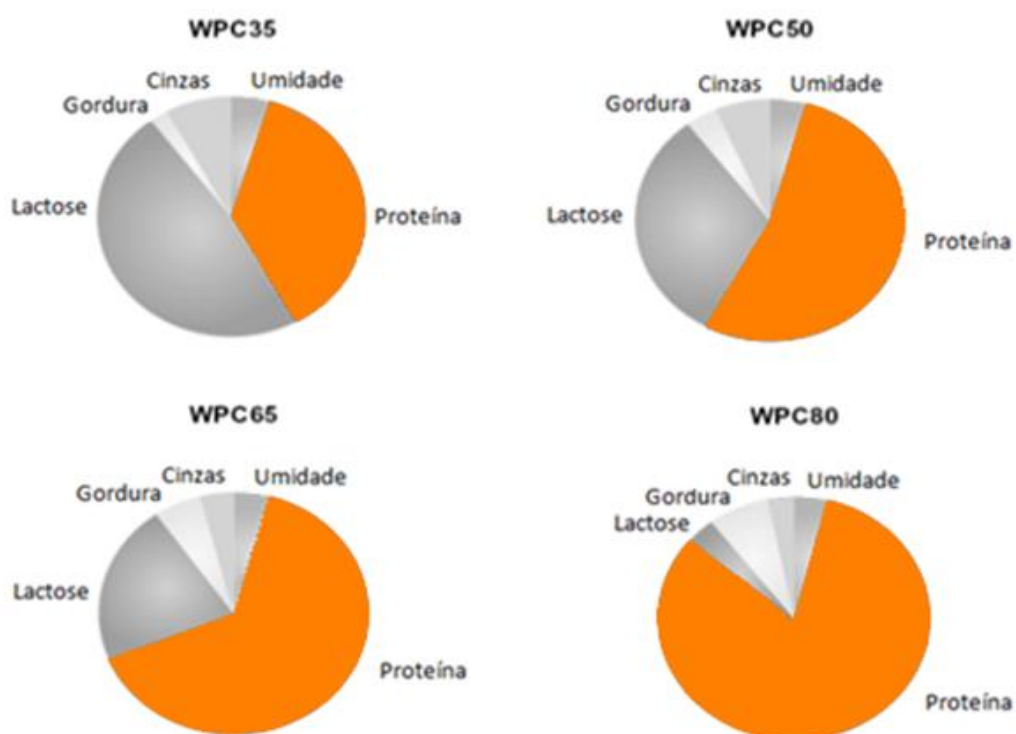
3.2. Produtos proteicos obtidos a partir do soro de leite

A obtenção dos diferentes produtos proteicos obtidos a partir do soro de leite – concentrados e isolados proteicos – e as informações sobre esses produtos são apresentadas a seguir.

3.2.1. Concentrados proteicos do soro de leite

Os concentrados proteicos do soro de leite (*whey protein concentrate* - WPC) são geralmente produzidos por ultrafiltração, um tipo de processo de separação por membranas (PSM). Componentes de baixa massa molar, como a lactose e os minerais, são removidos, enquanto as proteínas são concentradas, podendo ser obtidos concentrados proteicos com diferentes proporções de proteínas mediante a utilização de diafiltração (HUFFMAN; FERREIRA, 2011). A Figura 2 apresenta a composição típica das proteínas concentradas do soro de leite.

Figura 2. Composição típica dos diferentes concentrados proteicos do soro de leite (*whey protein concentrate* - WPC).



Fonte: adaptado de Huffman e Ferreira (2011).

Esses concentrados proteicos são os produtos mais importantes obtidos pelas indústrias de processamento do soro de leite. Eles podem ter diferentes concentrações de proteína, variando entre 35 e 80 % em base seca e a sua utilização é bastante ampla, sendo adicionados a uma grande variedade de alimentos (LUCENA *et al.*, 2007). Contudo, as indústrias de soro de leite devem buscar novas aplicações para essas proteínas concentradas,

porque a sua utilização como ingrediente em alimentos não é suficiente para absorver toda a sua produção (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; LUCENA *et al.*, 2007). Além disso, é esperado que a produção desses concentrados aumente no futuro devido ao aumento da quantidade de soro de leite que está sendo processada, especialmente nos países em desenvolvimento (LUCENA *et al.*, 2007).

3.2.2. Isolados proteicos do soro de leite

As proteínas isoladas do soro de leite (*whey protein isolate - WPI*) têm um teor proteico mínimo de 90 %. Elas são geralmente produzidas por ultrafiltração combinada com diafiltração ou por cromatografia de troca iônica seguida por processos de concentração, evaporação e secagem. A produção de isolados proteicos do soro de leite por cromatografia de troca iônica é baseada na natureza anfotérica das proteínas. Por outro lado, a produção das proteínas do soro de leite por ultrafiltração é baseada na diferença de tamanho entre as proteínas e os demais componentes presentes no soro (HUFFMAN; FERREIRA, 2011; LUCENA *et al.*, 2007). A composição dos isolados proteicos produzidos por PSM e por cromatografia de troca iônica é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição típica das proteínas isoladas obtidas por PSM e troca iônica.

Componente	Separação por membranas (%)	Troca iônica (%)
α -lactalbumina	15,0-22,0	14,0-26,0
β -lactoglobulina	56,0-60,0	66,0-75,0
Albumina do soro bovino	1,0-2,0	3,0-6,0
Imunoglobulinas	2,0-5,0	2,0-3,0
Caseinomacropéptido	20,0-26,0	Não detectado
Lactoferrina	0-0,1	Não detectado
Fragmentos de peptídeos	3,0-5,0	Não detectado
Cálcio	0,3-0,6	0,08-0,11
Sódio	0,2-0,3	0-0,5

Fonte: adaptado de Huffman e Ferreira (2011).

As diferenças existentes entre os isolados proteicos produzidos utilizando PSM e os produzidos utilizando cromatografia de troca iônica estão relacionadas aos seus conteúdos de proteínas e minerais. No que diz respeito à composição de proteínas, a principal diferença encontra-se na ausência de caseinmacropeptídeo e de fragmentos de peptídeos nos isolados proteicos produzidos pelo processo de troca iônica (HUFFMAN; FERREIRA, 2011). Devido à alta concentração de proteínas, os isolados proteicos são utilizados em formulações para atletas, médicas e em alimentos infantis (LUCENA *et al.*, 2007).

3.3. Propriedades das proteínas

A seguir são apresentadas as propriedades das proteínas: propriedades nutricionais, propriedades tecnológicas e funções biológicas.

3.3.1. Propriedades nutricionais

Aminoácidos essenciais e nitrogênio são necessários para a síntese de novas proteínas corporais e para a compensação de perdas de nitrogênio corporal causadas principalmente pela oxidação de aminoácidos (SCHAAFSMA; STEIJNS, 2000). O valor nutritivo de uma proteína é determinado pela sua composição de aminoácidos. Uma proteína que contém proporcionalmente todos os aminoácidos essenciais para o crescimento e a manutenção das funções vitais é considerada uma proteína completa e terá um alto valor biológico. No entanto, as proteínas incompletas podem ser suplementadas com os aminoácidos ausentes para que o seu valor biológico seja melhorado (USTUNOL, 2015).

De acordo com Anand, Khanal e Marella (2013), a comparação nutricional de diferentes proteínas é geralmente realizada com base em três parâmetros: valor biológico (quantidade de proteína corporal que pode ser substituída por 100 g de proteína na dieta ou nitrogênio absorvido), coeficiente de eficácia proteica (ganho de peso em indivíduos em crescimento produzidos por 1 g de proteína) e utilização proteica líquida (nitrogênio ingerido).

Nutricionalmente, as proteínas do soro de leite são consideradas uma das proteínas de maior qualidade pela indústria de alimentos (FARKYE; SHAH, 2015). As propriedades nutricionais de algumas proteínas de origem animal são comparadas na Tabela 3, a qual mostra que as proteínas do soro são superiores às proteínas totais do leite e à caseína com base no valor biológico, no coeficiente de eficácia proteica e na utilização proteica líquida, e são semelhantes à proteína do ovo (ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013).

Tabela 3. Propriedades nutricionais de algumas proteínas de origem animal.

Tipo de proteína	Valor biológico	Coeficiente de eficácia proteica	Utilização proteica líquida
Leite	91	2,5	82
Caseína	77	2,5	76
Proteína do soro de leite	104	3,2	92
Ovo	100	3,9	94
Carne bovina	80	2,9	73

Fonte: adaptado de Anand, Khanal e Marella (2013).

3.3.2. Propriedades tecnológicas

O termo "propriedades tecnológicas das proteínas" pode ser encontrado na literatura como "propriedades funcionais das proteínas", "propriedades tecno-funcionais das proteínas" ou "funcionalidade das proteínas" e se referem às propriedades físico-químicas que influenciam o seu comportamento nos sistemas alimentares durante o processamento, o armazenamento, o preparo e o consumo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

As principais propriedades tecnológicas das proteínas nos alimentos são as seguintes: solubilidade, gelificação, emulsificação, estabilidade térmica, formação de espuma, e capacidade de absorção de água e óleo. A definição de cada propriedade é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Definições das propriedades tecnológicas das proteínas.

Propriedade	Definição
Solubilidade	Habilidade de permanecer em solução em uma ampla faixa de pH
Gelificação	Habilidade de formar gel estável e coeso quando aquecido
Emulsificação	Habilidade de manter duas soluções que não solúveis uma na outra como uma suspensão estável
Estabilidade térmica	Habilidade de se manter solúvel durante aquecimento
Formação de espuma	Habilidade de formar espuma estável
Absorção de água e óleo	Habilidade de se ligar à água ou prendê-la, ou se ligar à gordura livre

Fonte: adaptado de Damodaran, Parkin e Fennema (2010).

A solubilidade é provavelmente a mais importante das propriedades tecnológicas das proteínas. Muitas das outras propriedades tecnológicas, como a formação de espuma, a emulsificação e a gelificação, são afetadas pela solubilidade. Se a proteína não apresenta boa solubilidade, as outras propriedades geralmente não são boas (HUFFMAN; FERREIRA, 2011; WILDING; LILLFORD; REGENSTEIN, JOE, 1984).

Em relação às proteínas do soro, elas apresentam uma excelente solubilidade ao longo de uma ampla faixa de pH. Uma vez que a maioria dos sistemas alimentares têm valores de pH na faixa de 3 a 7, as proteínas do soro de leite permanecerão solúveis em praticamente todos os líquidos e na maioria dos alimentos, a não ser que sejam aquecidas (HUFFMAN; FERREIRA, 2011).

3.3.3. Funções biológicas

As funções biológicas das proteínas estão associadas com os papéis funcionais definidos por peptídeos específicos (ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013). As principais funções biológicas apresentadas pelas proteínas do soro de leite são as seguintes: atividade antimicrobiana, atividade anticarcinogênica, atividade transportadora, atividade

imonomoduladora, transporte passivo de imunidade, atividade opióide, síntese da lactose, entre outras (CHATTERTON *et al.*, 2006; MADUREIRA *et al.*, 2007).

3.3. Proteínas do soro de leite

As proteínas do soro são uma mistura complexa de β -lactoglobulina (BLG), α -lactalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Igs), lactoferrina (LF), lactoperoxidase (LP) e proteose-peptonas (PP). O soro de leite pode ainda conter a proteína caseinomacropéptido (CMP) se o soro for proveniente da fabricação de queijos obtidos por meio da coagulação enzimática (HUFFMAN; FERREIRA, 2011; MADUREIRA *et al.*, 2007). A Tabela 5 apresenta a composição das proteínas do soro de leite juntamente com as informações sobre os pontos isoelétricos e massas molares, as quais são importantes para os processos de fracionamento.

Tabela 5. Composição típica das proteínas do soro de leite doce e suas propriedades físicas.

Proteína	Conteúdo (%)	Massa molar (kg mol^{-1})	Ponto isoelétrico
β -lactoglobulina	48,0 - 58,0	18	5,4
α -lactalbumina	13,0 - 19,0	14	4,4
Caseinomacropéptido	12,0 - 20,0	7 - 8,6	< 3,8
Albumina do soro bovino	6,0	66	5,1
Imunoglobulinas	8,0 - 12,0	150 - 1000	5,0 - 8,0
Lactoferrina	2,0	77	7,9
Lactoperoxidase	0,5	78	9,6

Fonte: adaptado de Etzel (2004), Bonnaillie e Tomasula (2008) e Metsämuuronen e Nyström (2009).

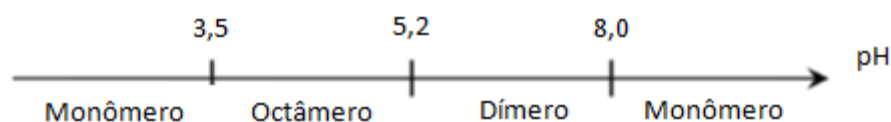
A fração proteica do soro inclui alguns dos componentes nutricionais e nutracêuticos mais valiosos, tais como lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, entre outras proteínas. Essas proteínas já estão sendo produzidas por alguns fabricantes especializados, contudo, a maior parte das proteínas produzidas a partir do soro de leite ainda consiste em concentrados proteicos e isolados proteicos (JELEN, 2009).

3.3.1. β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina (BLG) é a principal proteína do soro de leite bovino, estando presente no leite de todos os ruminantes, mas não no leite da maioria dos não ruminantes, como o leite humano. Ela corresponde a aproximadamente 50 % das proteínas do soro de leite de ruminantes e cerca de 12 % das proteínas totais do leite bovino (O'MAHONY; FOX, 2013)

A BLG é uma proteína pequena, solúvel em água, estável em meio ácido e que consiste em 162 aminoácidos, apresentando uma massa molar que varia de 18,20 a 18,36 kDa (ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013; YADAV *et al.*, 2015). No entanto, sua estrutura quaternária depende do pH do meio, podendo formar dímeros ou octâmeros, conforme é apresentado na Figura 3,

Figura 3. Estrutura quaternária da BLG em função do pH do meio em baixa temperatura e baixa concentração.



Fonte: Adaptado de Bonnaillie e Tomasula (2008).

A BLG ocorre principalmente como um dímero estável, com uma massa molar de 36,7 kDa, em valores de pH entre 5,2 e 8,0; como um octâmero, com uma massa molar de 140 kDa, em pH entre 3,5 e 5,2; como um monômero, com dois resíduos de cisteína por monômero, abaixo de pH 3,5 e acima de 8,0 (BONNAILLIE; TOMASULA, 2008; MADUREIRA *et al.*, 2007).

Diversas variantes genéticas da BLG foram identificadas, sendo as variantes A e B as principais (CHEISON *et al.*, 2012). Essas duas variantes genéticas diferem da seguinte forma: a BLG variante A contém o aminoácido ácido aspártico na posição 64 e o aminoácido valina na posição 118, ao passo que a BLG variante B possui os aminoácidos glicina e alanina nas posições 64 e 118, respectivamente (KEPLER *et al.*, 2014).

Essa proteína é uma excelente fonte de aminoácidos essenciais e aminoácidos de

cadeia ramificada, os quais correspondem a 48 e 25 %, respectivamente, da massa total da BLG (ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013). Os aminoácidos de cadeia ramificada desempenham um papel importante na reconstrução e recuperação muscular causadas pela prática de atividade física e fadiga (FARKYE; SHAH, 2015). A BLG também é uma fonte rica em cisteína, um aminoácido essencial que estimula a síntese de glutathione, um tripeptídeo com atividade antioxidante que protege o organismo contra os danos causados pelos radicais livres e que pode reduzir o risco de câncer (DE WIT, 1998; FARKYE; SHAH, 2015).

Como o leite humano não contém BLG e a fração dessa proteína é considerada a mais alergênica do leite bovino, a sua remoção se torna interessante para o desenvolvimento de produtos infantis e produtos destinados a pessoas alérgicas a ela (CHEISON *et al.*, 2012; FOX, 2001; TOLKACH; KULOZIK, 2005).

Nas proteínas isoladas e concentradas, a funcionalidade observada – ou propriedade tecnológica observada – é a soma das propriedades tecnológicas das proteínas individuais (ALOMIRAH; ALLI, 2004). Devido à sua maior concentração relativa no soro de leite e à sua fácil desnaturação quando aquecida, a BLG é responsável pela maior parte das propriedades tecnológicas pelas quais as proteínas do soro são reconhecidas, como a gelificação térmica (CHEISON *et al.*, 2012; FOX, 2001; O'MAHONY; FOX, 2013).

Devido às suas estruturas secundária e terciária, a BLG é muito resistente à proteólise no seu estado nativo (GUO *et al.*, 1995 *apud* O'MAHONY; FOX, 2013), sendo resistente à ação da pepsina e de ácidos (SCHMIDT; POLL, 1991 *apud* CHEISON *et al.*, 2012; DE WIT, 1998), uma característica que indica que a sua função principal não é nutricional. Uma vez que as outras proteínas do soro de leite apresentam alguma função biológica, seu papel biológico pode estar relacionado a sua capacidade de se ligar ao retinol e a ácidos graxos, possuindo função protetora contra a oxidação, transportadora ou estimulante da atividade da lipase (O'MAHONY; FOX, 2013).

3.3.2. *α*-lactalbumina

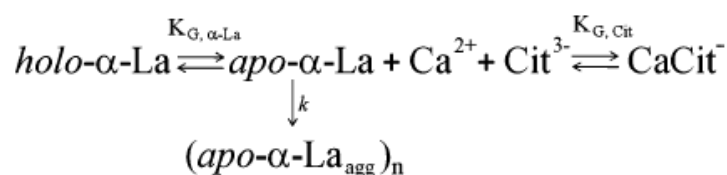
A *α*-lactalbumina (ALA) representa cerca de 20 % das proteínas do soro de leite

bovino ou 3,5 % das proteínas totais do leite. A ALA bovina, assim como a humana e a caprina, consiste em 123 aminoácidos e apresenta massa molar de aproximadamente 14 kDa. No leite humano, a ALA é a principal proteína e, ao nível dos aminoácidos, a homologia entre a ALA do leite humano e a do leite bovino é de 76 %, ou seja, 93 dos 123 aminoácidos (CHATTERTON *et al.*, 2006; O'MAHONY; FOX, 2013).

Uma das características mais interessantes da ALA é a sua capacidade de se ligar a cátions metálicos. Ela contém um sítio interno de ligação com o cálcio e devido a essa ligação iônica intramolecular, a qual mantém a sua estrutura terciária esférica compacta e estabilizada, torna-se menos sensível às mudanças de pH em valores acima de 4,0, como ocorre com a BLG. Além disso, essa ligação com o cálcio a torna mais resistente ao desdobramento térmico. Sob condições favoráveis de Ca^{2+} e pH, a ALA permanece solúvel mesmo quando aquecida a 100 °C (BONNAILLIE; TOMASULA, 2008; FARKYE; SHAH, 2015; PERMYAKOV; BERLINER, 2000).

Quando o pH da solução contendo proteínas do soro de leite é inferior a 4,0, a ALA sofre uma conversão da forma ligada ao cálcio, denominada *holo- α -lactalbumina*, para a forma livre de cálcio, denominada *apo- α -lactalbumina* (PATOCKA; JELEN, 1991 *apud* TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013). Na ausência de cálcio, a ALA se torna instável e sensível ao aquecimento suave, e sua tendência de formar agregados proteicos aumenta sob essas condições (TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013), conforme mostrado na Figura 4. Além disso, a utilização de agentes quelantes de cálcio, como o citrato de sódio, favorece a conversão da ALA da forma *holo* para a forma *apo* (ALOMIRAH; ALLI, 2004), além de deslocar o fenômeno de precipitação para uma faixa de temperatura menor (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1997).

Figura 4. Mecanismo de precipitação da α -lactalbumina na presença de um agente quelante (citrato) e condições ácidas, em que K_G é a constante de equilíbrio e k é a constante de velocidade da reação.



Fonte: adaptado de Toro-Sierra, Tolkach e Kulozik (2013).

Nesse processo, a estrutura terciária da ALA é modificada parcialmente, mas sua estrutura secundária permanece similar à do estado nativo, de modo a formar o chamado *molten globule state*, o qual pode ser definido como uma conformação estável parcialmente dobrada que pode ser distinguida das formas nativa ou totalmente desnaturada e que corresponde a forma *apo* da ALA (CREIGHTON; EWBANK, 1994 *apud* TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013; KUWAJIMA, 1996 *apud* TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013; BOYE; MA; HARWALKAR, 1997; KATAOKA *et al.*, 1997).

A depleção de cálcio e ajuste de pH ao redor do ponto isoelétrico da ALA faz com que alterações ocorram na estrutura dessa proteína, sendo essa instabilidade explorada em processos de purificação (CHATTERTON *et al.*, 2006). Alguns estudos demonstraram que a agregação da ALA sob as condições de complexação do íon cálcio, baixo pH e aquecimento suave é um processo reversível após o resfriamento da solução, remoção do agente complexante e ajuste do pH para valores superiores a 7,5, fazendo com que a ALA seja resolubilizada e retorne ao seu estado nativo (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1997; EUGENIA LUCENA *et al.*, 2006; TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013). Por outro lado, Chatterton (2001 *apud* CHATTERTON *et al.*, 2006) relata que o inconveniente dessa abordagem é a alteração irreversível da estrutura dessa proteína.

Além do fenômeno de agregação da ALA, característica mencionada anteriormente, essa proteína é resistente à ação da enzima tripsina, enquanto que a BLG é suscetível à sua ação (KONRAD; KLEINSCHMIDT, 2008), podendo essa enzima ser utilizada a fim de obter a fração de ALA.

Uma fração enriquecida de ALA pode ser utilizada com êxito pelas indústrias de alimentos e farmacêutica. Essa proteína é rica no aminoácido triptofano e, por isso, pode ser utilizada em alimentos para fins dietéticos e terapêuticos. O aminoácido triptofano tem mostrado melhorar a qualidade do sono, o desempenho cognitivo e o humor sob estresse por meio da formação do neurotransmissor serotonina. Além disso, comercialmente, a ALA é de grande interesse para o desenvolvimento de fórmulas infantis que simulam o leite humano (FARKYE; SHAH, 2015; METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009).

Como função biológica, a ALA desempenha um papel importante na biossíntese de

lactose, que é uma fonte de energia importante para o recém-nascido (DE WIT, 1998; FARKYE; SHAH, 2015).

Sob condições ácidas, a ALA humana forma um complexo com ácido oleico denominado "HAMLET" (*Humana Alfa-lactalbumin Made L_Etal to Tumor cells*), o qual demonstrou inibir uma grande variedade de tumores por meio de um processo semelhante à apoptose (SVANBORG *et al.*, 2003 *apud* FARKYE; SHAH, 2015). O complexo formado com a ALA bovina, denominado de "BAMLET" (*Bovine Alfa-lactalbumin Made L_Etal to Tumor cells*) também apresentou potente atividade citotóxica contra oito tipos de células cancerígenas (RAMMER *et al.*, 2010 *apud* FARKYE; SHAH, 2015).

3.3.3. Caseinomacropéptídeo

O caseinomacropéptídeo (CMP) é formado durante o processo de fabricação de queijos mediante coagulação enzimática. Ele não faz parte das proteínas nativas do soro de leite, pois deriva da camada externa das micelas de caseína, em que apresenta um aspecto ciliado. Sua presença no soro de leite é resultado da ação da quimosina ou coalho, que hidrolisa a ligação peptídica entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) da κ -caseína, tornando, assim, as micelas de caseína sensíveis à coagulação. O CMP apresenta massa molar entre 6,8 e 8,6 kDa e contém 64 aminoácidos, os quais correspondem aos aminoácidos 106-169 da κ -caseína. (ANAND; KHANAL; MARELLA, 2013; ETZEL, 2004; SILVA; MALCATA, 2005; TOLKACH; KULOZIK, 2005; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; YADAV *et al.*, 2015).

O CMP é um componente valioso tanto pelas suas propriedades tecnológicas quanto pelo seu valor nutritivo. Ele é considerado um potencial ingrediente para os conceitos de alimentos funcionais e também apresenta propriedades tecnológicas interessantes devido à sua natureza anfifílica, que resulta de sua glicosilação parcial. Os resíduos de açúcar são altamente hidrofílicos, ao passo que a cadeia peptídica é mais hidrofóbica. Devido ao seu elevado teor de carboidratos, o caseinomacropéptídeo é frequentemente referido como glicomacropéptídeo (GMP). A fração de CMP glicosilada corresponde a 50 - 60 % do total de CMP e os carboidratos encontrados ligados à sua estrutura são a galactose, a N-acetil-

galactosamina e o ácido N-neuramínico. Além disso, a presença do CMP no soro de leite altera as suas propriedades tecnológicas, diluindo os efeitos da BLG e da ALA (EL-SALAM; BUCHHEIMH, 1996; HUFFMAN; FERREIRA, 2011; KORHONEN, 2010; TOLKACH; KULOZIK, 2005).

Em relação à composição de aminoácidos, o CMP apresenta características interessantes quando comparado às outras proteínas do soro de leite, conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Composição de aminoácidos das proteínas BLG, ALA e CMP.

Aminoácido	BLG (% m m⁻¹)	ALA (% m m⁻¹)	CMP (% m m⁻¹)
Alanina	5,4	1,5	6,4
Arginina	2,6	1,1	0,0
Asparagina	3,1	9,7	5,1
Ácido aspártico	6,9	7,3	1,7
Cisteína	2,8	5,8	0,0
Glutamina	6,3	4,5	3,8
Ácido glutâmico	11,3	7,3	15,5
Glicina	0,9	2,4	0,9
Histidina	1,5	2,9	0,0
Isoleucina	6,2	6,4	11,9
Leucina	13,6	10,4	1,7
Lisina	10,5	10,9	5,8
Metionina	2,9	0,9	2,0
Fenilalanina	3,2	4,2	0,0
Prolina	4,2	1,4	11,7
Serina	3,3	4,3	7,8
Treonina	4,4	5,0	16,7
Triptofano	2,0	5,3	0,0
Tirosina	3,6	4,6	0,0
Valina	5,4	4,2	8,9
Cadeia ramificada	25,1	21,0	22,5
Essenciais	48,1	47,2	47,0

Fonte: adaptado de Etzel (2004).

Devido à ausência dos aminoácidos fenilalanina, triptofano, tirosina, histidina, arginina e cisteína, o CMP apresenta características únicas (YADAV *et al.*, 2015). Como não há aminoácidos aromáticos em sua estrutura, o CMP não apresenta absorção em 280 nm (RAJPUT *et al.*, 2013 *apud* YADAV *et al.*, 2015). A ausência de fenilalanina torna essa proteína um ingrediente alimentar valioso para os portadores da doença fenilcetonúria. Dessa forma, o soro de leite pode ser usado como fonte de CMP para satisfazer o perfil nutricional de tais indivíduos. Além disso, o CMP é rico em aminoácidos de cadeia ramificada (KRISSENSEN, 2007 *apud* YADAV *et al.*, 2015; MARSHALL, 2004 *apud* YADAV *et al.*, 2015).

O CMP pode, ainda, ser útil em dietas que visam controlar diversas doenças do fígado, nos casos em que os aminoácidos de cadeia ramificada podem ser utilizados como uma fonte de energia (EL-SALAM; BUCHHEIMH, 1996). Quando submetido à ação da pepsina, vários peptídeos com atividades fisiológicas distintas podem ser produzidos, tais como atividade opióide e promotora de saciedade (STAN; EKIMOVSKII; ALEINIK; ZHURAVLEV, 1988 *apud* SILVA; MALCATA, 2005). Também se tem conhecimento de que o CMP pode ajudar na absorção de cálcio, ferro e zinco (SILVA; MALCATA, 2005).

Uma doença que pode afetar lactantes alimentados com fórmulas contendo predominantemente proteína do soro de leite é a hipertreoninemia e, por isso, Fanaro e Vigi (2002 *apud* SILVA; MALCATA, 2005) recomendam a remoção de CMP do soro de leite para o desenvolvimento de fórmulas mais próximas do leite humano destinadas a lactantes. Assim, o desenvolvimento de fórmulas infantis à base de soro de leite ácido parece ser mais adequado (RIGO *et al.*, 2001 *apud* SILVA; MALCATA, 2005).

Recentes avanços nas tecnologias de fracionamento têm permitido a separação do CMP do soro de leite, dando origem a ingredientes comerciais enriquecidos em CMP. Devido à carga altamente negativa do CMP em baixos valores de pH, faixa em que as outras proteínas do soro de leite estão carregadas positivamente, um processo de troca iônica pode ser utilizado para isolá-lo (FARKYE; SHAH, 2015).

3.3.4. Albumina do soro bovino

A albumina do soro bovino (BSA) é uma proteína de 66,5 kDa composta por 583 aminoácidos, com um ponto isoelétrico próximo de 5,0 e idêntica à BSA encontrada no sangue. O leite bovino normal contém baixo teor de BSA, entre 0,1 e 0,4 g L⁻¹, e como essa proteína não é produzida na glândula mamária, sua presença no leite se deve, presumivelmente, à sua passagem do sangue para o leite (FARKYE; SHAH, 2015; O'MAHONY; FOX, 2013).

Por conter todos os aminoácidos essenciais, essa proteína apresenta alto valor nutricional, além de apresentar boas propriedades tecnológicas de formação de espuma e gelificação (VALIÑO *et al.*, 2014). Em relação às propriedades biológicas, a BSA não tem nenhuma função conhecida no leite e é provavelmente de pouca significância, embora possa se ligar a metais e a ácidos graxos. Devido à sua concentração relativamente baixa, ela provavelmente tem pouco efeito sobre as propriedades tecnológicas dos ingredientes obtidos a partir das proteínas do leite (O'MAHONY; FOX, 2013).

3.3.5. Lactoferrina

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína que se liga ao ferro, com massa molar de 78 kDa e ponto isoelétrico de aproximadamente 9,0, sendo encontrada nos diferentes fluidos biológicos dos mamíferos e nos neutrófilos. Ela é considerada uma importante molécula de defesa do hospedeiro e exibe uma grande variedade de funções biológicas, tais como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, imunomoduladora, bem como capacidade de melhorar a biodisponibilidade do ferro. Além disso, ela contém todos os aminoácidos essenciais, o que a torna uma proteína de alto valor nutricional (FOX; KELLY, 2012; KORHONEN, 2010; VALIÑO *et al.*, 2014)

O leite bovino contém entre 0,02 e 0,35 mg mL⁻¹ de LF, dependendo do período de lactação, ao passo que o leite humano contém 4 mg mL⁻¹ (MADUREIRA *et al.*, 2007). No leite humano, a LF corresponde a aproximadamente 20 % das proteínas totais e como o leite bovino contém baixo teor de LF, há um interesse em suplementar fórmulas infantis à base de

leite bovino com LF isolada do leite bovino ou do soro de leite (FOX, 2001).

3.3.6. *Lactoperoxidase*

A lactoperoxidase (LP) é uma enzima presente no leite, com massa molar de aproximadamente 77,5 kDa e ponto isoelétrico entre 9 e 10. Sua concentração no leite varia de 13 a 30 mg L⁻¹, ao passo que no soro ela corresponde a aproximadamente 0,5 % das proteínas totais do soro de leite (FARKYE; SHAH, 2015).

Essa enzima funciona como um agente antibacteriano natural. A LP, juntamente com o peróxido de hidrogênio e o íon tiocianato, constituem o sistema lactoperoxidase. Esse sistema tem um largo espectro de atividade antibacteriana, possuindo um efeito bacteriostático contra bactérias gram-positivas e efeito bactericida contra bactérias gram-negativas (FARKYE; SHAH, 2015).

Há estudos mostrando aplicação do sistema lactoperoxidase para tratamento da gengivite e periodontite (POULSEN, 1988 *apud* FARKYE; SHAH, 2015) para utilização em pastas de dentes e enxaguantes bucais para eliminar as bactérias orais (TENOVUO, 2002 *apud* FARKYE; SHAH, 2015), e em soluções de limpeza de lentes de contato (MCKEE; SILLS, 2003 *apud* FARKYE; SHAH, 2015). Em alimentos, a LP pode ser explorada para a realizar a esterilização a frio do leite ou utilizada em fórmulas infantis (WYNN; SHEEHY, 2013).

3.3.7. *Imunoglobulinas*

As imunoglobulinas (Igs) compreendem pelo menos 2 % das proteínas totais do leite e cerca de 10 % das proteínas do soro de leite. Três classes de Igs são encontrados no leite: IgA, IgM e IgG, sendo esta subdividida em IgG1 e IgG2 (FARKYE; SHAH, 2015; MADUREIRA *et al.*, 2007).

Essas proteínas estão presentes no soro e nos fluidos fisiológicos de todos os

mamíferos em resposta a estímulos antigênicos ou imunogênicos, tais como bactérias e vírus, proporcionando, assim, proteção contra as infecções microbianas. Algumas Igs se ligam a superfícies, onde se comportam como receptores, ao passo que outras funcionam como anticorpos que são liberados no sangue e na linfa (FARKYE; SHAH, 2015; MADUREIRA *et al.*, 2007).

No leite bovino, a IgG1 é a principal imunoglobulina encontrada, com quantidades menores de IgG2, IgA e IgM. Em comparação, o colostro humano, o qual contém cerca de 2 % de Igs, apresenta maior quantidade de IgA, com menores quantidades de IgG e IgM (FARKYE; SHAH, 2015).

Vacas, ovelhas, cabras e algumas outras espécies não transmitem Igs para o feto no útero e seus filhotes nascem sem Igs no soro sanguíneo. Sendo assim, é essencial que o seus filhotes recebam o colostro logo após o nascimento. Em relação aos humanos, as Igs podem passar para o feto no útero, porém, ao contrário do que ocorre com os filhotes de bovinos, ovinos e caprinos, o humano recém-nascido não pode absorver Igs a partir do seu intestino. Contudo, as Igs no colostro ainda desempenham um papel protetor importante contra infecção entérica (FOX, 2001).

Há um potencial interesse na produção comercial de Igs para a nutrição de bebês prematuros ou que não podem ser amamentados mediante a preparação de um "concentrado imunológico" a partir do leite bovino, mas essa prática pode não ser muito eficaz considerando os diferentes perfis de Igs entre os leites humano e bovino (FOX, 2001).

3.3.8. *Proteose-peptonas*

As proteose-peptonas (PPs) têm sido definidas como aquelas proteínas que permanecem em solução após o leite ser aquecido a 95 °C durante 20 minutos, caracterizando sua estabilidade térmica, seguido de acidificação até pH 4,7 (FARKYE; SHAH, 2015).

As PPs correspondem a aproximadamente 1,1 % das proteínas do leite e cerca de 10 % das proteínas do soro de leite (INNOCENTE *et al.*, 1998 *apud* FARKYE; SHAH, 2015). Existem quatro tipos principais de PPs, as quais são designadas da seguinte forma: componente 3 (PP3), componente 5 (PP5), componente 8 rápida (*fast*) (PP8f), e componente 8

lenta (*slow*) (PP8s) correspondentes às suas mobilidades eletroforéticas (FARKYE; SHAH, 2015).

A PP3 é encontrada apenas no soro e não deriva da caseína, apresentando massa molar de 20 kDa. A PP5 tem massa molar de 13 kDa e está presente tanto no soro quanto na caseína. Essa proteína é resultante da proteólise e corresponde ao fragmento da β -caseína entre os aminoácidos 1 e 105, representada como β -CN (f1-105). A PP8f possui massa molar de 3,9 kDa e corresponde à β -CN (f1-28), enquanto que a PP8s tem massa molar de 9,9 kDa e corresponde à β -CN (f29-105) (FARKYE; SHAH, 2015).

3.4. Fracionamento das proteínas do soro de leite

A indústria de laticínios tem empregado com sucesso a ultrafiltração na concentração do soro de leite e no fracionamento das proteínas do soro de leite a partir da lactose e dos seus sais, porém, nos últimos anos, a procura por proteínas individuais do soro de leite vem aumentando, juntamente com a produção de alimentos funcionais, devido às necessidades nutricionais e de saúde de indivíduos com restrições alimentares (ETZEL, 2004; METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009).

Embora as proteínas nos concentrados e isolados proteicos estejam muito mais concentradas que no soro de leite em pó, as quantidades relativas de ALA, BLG, Igs, BSA, CMP, LF e LP não são significativamente diferentes. Há uma distinção importante entre concentração e fracionamento em processos de separação. Os processos de concentração aumentam igualmente o conteúdo de cada proteína numa mistura, ou seja, a quantidade relativa de cada proteína permanece inalterada à medida que o volume da solução vai diminuindo. Por outro lado, os processos de fracionamento dividem a mistura de proteínas em diferentes frações, cada uma com diferentes quantidades relativas de cada proteína em comparação com a mistura proteica inicial. Os processos de separação mais desejáveis fracionam e concentram simultaneamente uma proteína específica a partir da solução contendo a mistura de proteínas (ETZEL, 2004).

A proteína concentrada do soro, uma vez considerada um produto de alto valor, passou a ser vista apenas como uma *commodity* (SMITHERS, 2008). Atualmente há um maior interesse na separação e fracionamento das proteínas do soro de leite. Mesmo que as proteínas concentradas e isoladas ainda possam proporcionar uma vasta gama de propriedades tecnológicas e nutricionais quando adicionadas aos alimentos, as proteínas individuais ou as frações enriquecidas dessas proteínas têm potencial para permitir a criação de novos produtos com propriedades tecnológicas ou nutricionais melhores, além de desempenharem atividades biológicas sobre a saúde humana e encontrarem várias aplicações na indústria farmacêutica (BONNAILLIE; TOMASULA, 2008; MADUREIRA *et al.*, 2007; TOLKACH; KULOZIK, 2005; YADAV *et al.*, 2015).

As proteínas lácteas apresentam massas molares, concentrações e pontos isoelétricos diferentes, e a fim de separá-las, os processos de separação devem ser projetados para explorar ao máximo essas diferenças. Os processos propostos para a produção das frações proteicas do soro de leite em escala comercial são divididos em quatro categorias principais: (1) precipitação seletiva, (2) filtração por membranas, (3) adsorção seletiva e (4) eluição seletiva (ETZEL, 2004).

- **Precipitação seletiva.** É um processo de separação que consiste em ajustar as propriedades físicas da solução para promover a insolubilidade da proteína. As proteínas são tipicamente menos solúveis em pH próximo do seu ponto isoelétrico (pI) e em soluções com força iônica baixa, apresentando uma maior probabilidade de agregarem-se sob essas condições. A precipitação seletiva fraciona a solução de alimentação produzindo uma solução mais diluída – sobrenadante – e um precipitado mais concentrado (ETZEL, 2004).
- **Filtração por membrana.** Tradicionalmente, os processos de separação por membranas têm sido baseados unicamente nas diferenças das massas molares e utilizados, principalmente, para concentrar. A utilização de membranas para realizar o fracionamento das proteínas é possível em dois casos: (1) proteínas que apresentam grande diferença entre as suas massas molares, como a α -lactalbumina e a imunoglobulina, e (2) proteínas em que as diferenças combinadas de carga e tamanho são ótimas. Até alguns anos atrás, acreditava-se que a separação de proteínas através

de membranas somente seria possível se a razão entre as massas molares das proteínas fosse, no mínimo, igual a 10 (ETZEL, 2004). No entanto, o ajuste do pH e da força iônica da solução, bem como a velocidade de escoamento e a pressão transmembrana podem ser utilizados para separar proteínas com massas molares próximas, pois afetam a maneira como as proteínas passam através da membrana, interagem entre si e com a membrana (ETZEL, 2004; GHOSH, 2009). As membranas normalmente têm uma ligeira carga residual e, ao ajustar o pH da solução, a rejeição eletrostática pela membrana pode ser aumentada ou reduzida. Além disso, o diâmetro efetivo de uma proteína aumenta com a diminuição da força iônica. A separação pode ainda ser melhorada operando próximo do pI da proteína menor e longe do pI da proteína maior de forma a maximizar a diferença de tamanho hidrodinâmico efetivo das proteínas. Baixas concentrações de sal (1-20 mM) aumentam a rejeição eletrostática e estérica pela membrana. Dessa forma, o fracionamento das proteínas do soro de leite pode ser alcançado mediante o ajuste do pH e da força iônica utilizando uma sequência de processos de separação por membranas (ETZEL, 2004).

- **Adsorção seletiva.** Existem muitos exemplos de processos de adsorção seletiva das proteínas de soro de leite, como a utilização de retinal imobilizado para adsorver a β -lactoglobulina (WANG *et al.*, 1993 *apud* ETZEL, 2004). Nos processos de adsorção seletiva, uma única proteína purificada é produzida em conjunto com uma solução de soro de leite com reduzido teor da proteína adsorvida (ETZEL, 2004).
- **Eluição seletiva.** Nesse método, todas as proteínas presentes numa mistura ficam presas sobre o adsorvente e são lavadas, ficando livre de contaminantes. Em seguida, elui-se uma por uma, gerando as diferentes proteínas purificadas (ETZEL, 2004).

Os métodos cromatográficos têm sido utilizados para o fracionamento das proteínas do soro de leite principalmente na indústria farmacêutica e no desenvolvimento de pesquisa. As vantagens desses métodos são a capacidade de separação e a alta pureza do produto, enquanto que as desvantagens são o baixo rendimento, o longo tempo de produção e, conseqüentemente, um produto de alto custo, além de um elevado volume de efluente produzido pela regeneração das resinas. Para o fracionamento de grandes quantidades na indústria de laticínios, os métodos de filtração por membranas são muito mais adequados

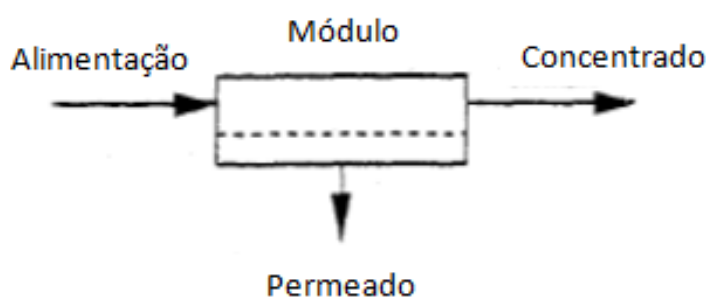
devido ao aumento de escala relativamente fácil, curto tempo de produção e menores custos de processamento em comparação com as técnicas cromatográficas (ETZEL, 2004; METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009).

Além dos métodos descritos anteriormente, há trabalhos em que foram utilizadas diferentes enzimas como uma forma de pré-tratamento, sendo que cada enzima teve ação sobre uma determinada proteína do soro de leite, sendo possível o processamento posterior mediante processos de separação por membranas (CHEISON *et al.*, 2012; KONRAD; KLEINSCHMIDT, 2008; TOLKACH; KULOZIK, 2005).

3.5. Processos de separação por membranas

Os processos de separação por membranas (PSM) são caracterizados por uma corrente de alimentação que é dividida em duas correntes: concentrado e permeado. Dependendo do objetivo do processo, qualquer uma das correntes geradas pode ser considerada como produto, ou até mesmo ambas (MULDER, 1996). Na Figura 5 é ilustrada uma representação esquemática de um processo de separação por membrana.

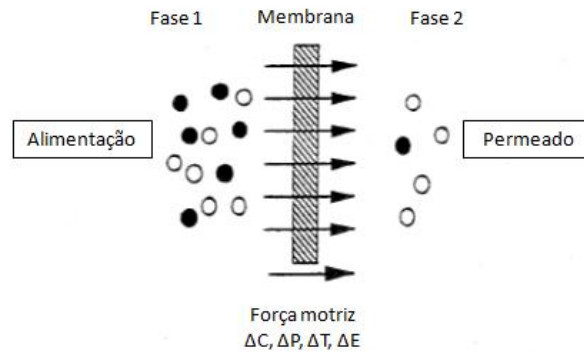
Figura 5. Representação esquemática de um processo de separação por membrana em que a corrente de alimentação foi separada em duas correntes, concentrado e permeado.



Fonte: adaptado de Mulder (1996).

A membrana é a parte essencial de um processo de separação por membrana e pode ser definida como uma barreira de permeabilidade seletiva ou como uma interface entre duas fases (MULDER, 1996), conforme a representação esquemática da Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática de um sistema contendo duas fases separadas por uma membrana.

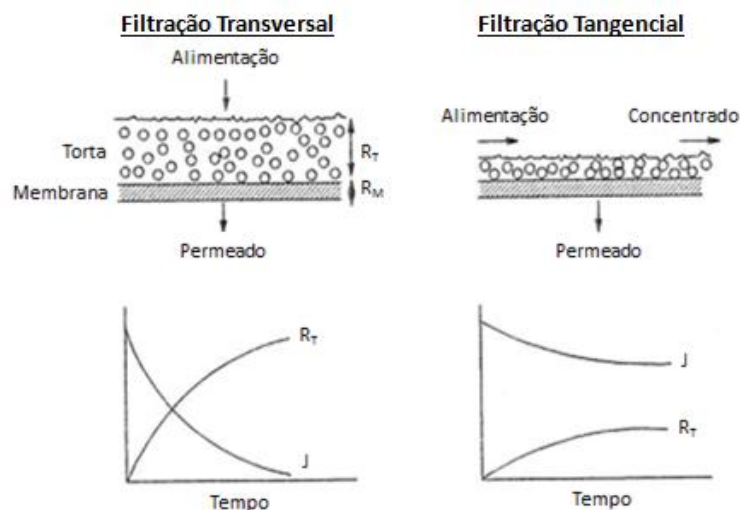


Fonte: adaptado de Mulder (1996).

A fase 1 é denominada alimentação ou lado *upstream*, ao passo que a fase 2 é chamada de permeado ou lado *downstream*. A separação ocorre porque a membrana tem a capacidade de transportar um componente da mistura de alimentação mais rapidamente que os demais componentes da mistura (MULDER, 1996).

A filtração através de membranas pode ser realizada em dois modos de operação distintos: filtração transversal e filtração tangencial, conforme é apresentado na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática dos processos de filtração transversal e tangencial juntamente com o comportamento do fluxo de permeado e formação de torta durante PSM (R_T é a resistência da torta formada sobre a membrana pelo soluto impermeável, R_M é a resistência da membrana e J é o fluxo do permeado).



Fonte: Adaptado de Cheryan (1998).

A resistência causada pela formação de torta na filtração transversal ocorre mais rapidamente, resultando em uma queda maior e mais rápida do fluxo de permeado (CHERYAN, 1998). Nesse modo de operação, o fluxo diminui ao longo do processo, porque o meio filtrante fica carregado com partículas retidas. Além disso, quando a concentração de partículas na corrente de alimentação é alta, o meio filtrante precisa ser substituído com frequência, o que pode ser inviável economicamente. Ainda, quando os solutos a serem separados são pequenos, requerendo ultrafiltração ou osmose inversa, a filtração transversal se torna menos viável devido ao rápido declínio do fluxo ao longo do tempo, exigindo, assim, frequente substituição do filtro (KURIYEL, R., FUSHIJIMA, M., JUNG, 2009).

A filtração tangencial supera as limitações da filtração transversal. Esse modo de operação é um processo no qual a corrente de alimentação escoia paralelamente à superfície de filtração, reduzindo a ocorrência da polarização por concentração e *fouling*, e, por isso, sendo mais utilizado em processos industriais. Em relação às duas correntes geradas, uma parte da corrente de alimentação, que é separada ao passar através da membrana, é denominada de permeado ou filtrado. A parte remanescente, contendo os componentes que não passam através da membrana, é chamada de retido ou concentrado (KURIYEL, R., FUSHIJIMA, M., JUNG, 2009; MULDER, 1996).

3.5.1. Conceitos em processos de separação por membranas

A seguir são apresentados alguns conceitos importantes relacionados aos processos de separação por membranas.

3.5.1.1. Fluxo de permeado

O desempenho ou a eficiência de uma dada membrana é determinado por dois fatores: fluxo de permeado e seletividade (MULDER, 1996). O fluxo de permeado é definido como o volume que flui através da membrana por unidade de área e tempo, conforme a Equação 1.

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

em que J é o fluxo de permeado, A é área da superfície de filtração da membrana, V é o volume de permeado que passa através da membrana e t é o tempo.

3.5.1.2. Seletividade

A seletividade de uma membrana para misturas aquosas compostas por diversos solutos é expressa em termos de retenção (R) para um determinado soluto. O soluto é parcialmente ou completamente retido, enquanto as moléculas de água (solvente) passam livremente através da membrana (MULDER, 1996). A retenção (R) é dada pela Equação 2:

$$R = \frac{C_f - C_p}{C_f} = 1 - \frac{C_p}{C_f} \quad (2)$$

em que C_f é a concentração do soluto na solução de alimentação e C_p é a concentração do soluto no permeado. O valor de R pode variar entre 1 (retenção completa do soluto) e 0 (solute e solvente passam livremente através da membrana).

3.5.1.3. Permeabilidade hidráulica e permeância hidráulica

Em pressões baixas, o fluxo de permeado aumenta linearmente com o aumento da pressão. Essa faixa de pressão é chamada de região em que o fluxo de permeado controlado pela pressão ou região controlada pela membrana. Essa relação é dada pela Equação 3:

$$J = \frac{k_p \Delta P_{TM}}{\mu} \quad (3)$$

em que J é o fluxo de permeado; k_p é a permeabilidade hidráulica da membrana; ΔP_{TM} é a pressão transmembrana; μ é a viscosidade da corrente de alimentação.

A Equação 4 pode ser simplificada, dando origem a um parâmetro chamado de permeância hidráulica (K_p), conforme apresentado na Equação 4.

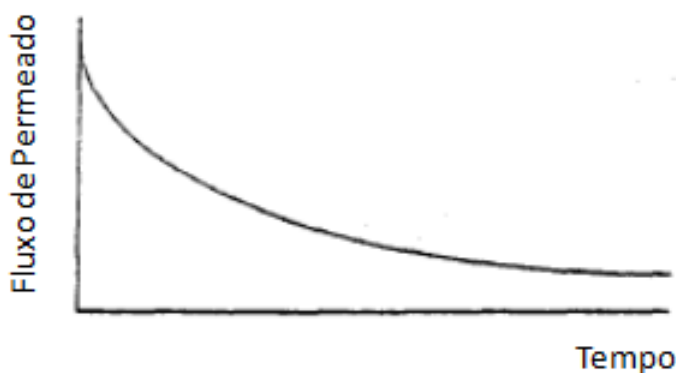
$$J = K_p \Delta P_{TM} \quad (4)$$

Essa relação se aplica, em geral, quando: (i) a pressão transmembrana é baixa, (ii) a concentração da solução é baixa e (iii) a velocidade da corrente de alimentação é alta para que não ocorra acúmulo de solutos sobre a membrana (HELDMAN; HARTEL, 1997).

3.5.1.4. Fatores limitantes em processos de separação por membranas: polarização por concentração e *fouling*

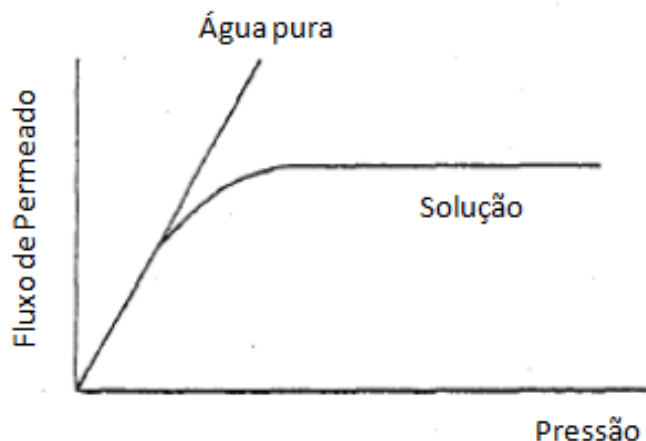
Durante um processo de separação por membrana em que a força motriz é a pressão, o desempenho da membrana pode mudar muito com o tempo e, muitas vezes, pode ser observado um comportamento típico do fluxo de permeado com o tempo: o fluxo de permeado através da membrana diminui ao longo do tempo (MULDER, 1996), conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8. Comportamento típico do fluxo de permeado durante PSM.



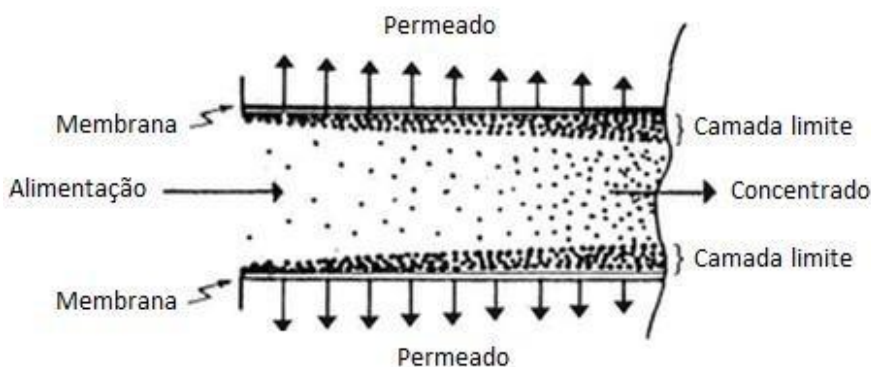
Fonte: adaptado de Mulder (1996).

O desempenho de um processo de separação por membrana é reduzido por fenômenos de polarização. Em microfiltração e ultrafiltração, o fluxo real através da membrana pode ser apenas uma fração do fluxo de permeado ao trabalhar com água pura. Devido ao fenômeno de polarização por concentração, o fluxo de permeado de uma solução é sempre menor do que o fluxo ao trabalhar com água pura (MULDER, 1996), conforme é apresentado na Figura 9.

Figura 9. Comportamento do fluxo de permeado para água pura e uma solução em função da pressão.

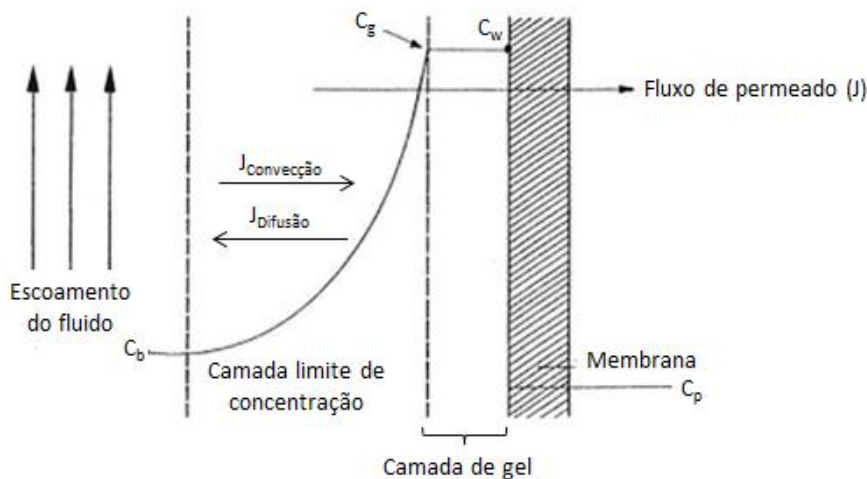
Fonte: adaptado de Mulder (1996).

Como a membrana retém os solutos até certo ponto, haverá um acúmulo de moléculas retidas perto da superfície da membrana. Isso resulta em uma camada altamente concentrada perto da membrana e essa camada exerce uma resistência à transferência de massa, isto é, uma resistência devido à polarização por concentração (MULDER, 1996). O fenômeno de polarização por concentração é ilustrado na Figura 10 e esquematizado na Figura 11.

Figura 10. Representação da polarização por concentração em PSM.

Fonte: adaptado de Singh e Heldeman (2003).

Figura 11. Modelo esquemático da polarização por concentração, em que C_b é a concentração do soluto no seio da solução; C_g é a concentração do soluto na camada de gel; C_w é a concentração de soluto na superfície interna da membrana; C_p é a concentração do soluto no permeado; $J_{\text{Convecção}}$ é o fluxo do soluto por convecção; $J_{\text{Difusão}}$ é o fluxo do soluto por difusão.

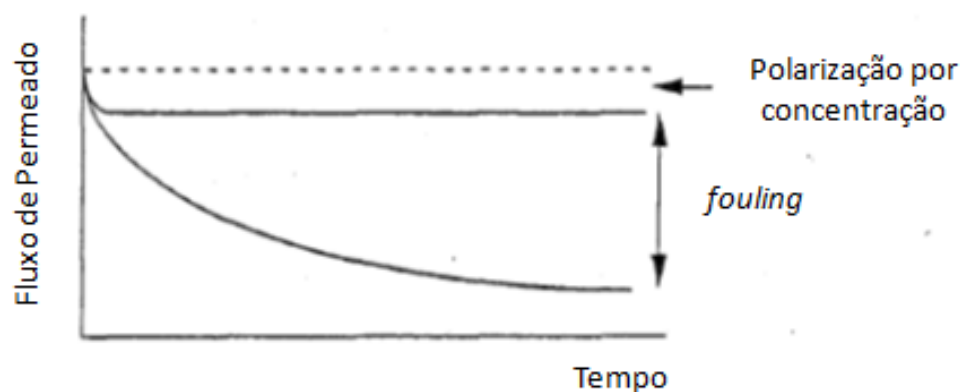


Fonte: adaptado de Singh e Heldeman (2003).

A polarização por concentração limita o desempenho do processo de filtração, aumentando a resistência à filtração perto da superfície da membrana. Quando a pressão transmembrana é aplicada, os solutos são transportados em direção à membrana, ocorrendo um acúmulo na superfície da membrana e um aumento gradual da concentração dos solutos retidos. No estado estacionário, essa maior concentração de solutos na superfície da membrana gera um contra fluxo difusivo para a solução. O fluxo convectivo do soluto em direção à superfície da membrana é balanceado pelo fluxo de solutos através da membrana (fluxo de permeado) mais o fluxo difusivo a partir da superfície da membrana em direção à solução (YOON, 2015).

Quando as condições de estado estacionário são atingidas, uma redução maior do fluxo não será observada, isto é, o fluxo de permeado se tornará constante ao longo do tempo. O fenômeno de polarização por concentração é reversível, mas na prática, muitas vezes pode ser observado um declínio contínuo do fluxo, caracterizando a ocorrência do *fouling* da membrana (MULDER, 1996). Isso é demonstrado no gráfico apresentado na Figura 12.

Figura 12. Efeito da polarização por concentração e *fouling* sobre o fluxo de permeado durante PSM.



Fonte: adaptado de Mulder (1996).

O fenômeno de *fouling* é bastante complexo e dependente de parâmetros físicos e químicos, tais como natureza e concentração do soluto, temperatura, pH, força iônica e interações específicas (ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo). Além disso, as características das membranas também exercem influência sobre esse fenômeno. O uso de membranas hidrofílicas em vez de hidrofóbicas pode ajudar a reduzir o *fouling*, uma vez que as proteínas geralmente adsorvem mais fortemente em superfícies hidrofóbicas, o que dificulta a sua remoção, do que em superfícies hidrofílicas (MULDER, 1996).

A redução do *fouling* começa pelo desenvolvimento de um pré-tratamento adequado. Esses pré-tratamentos podem incluir tratamento térmico, ajuste do pH, adição de agentes complexantes, cloração, adsorção em carvão ativado, clarificação química, pré-microfiltração e pré-ultrafiltração (MULDER, 1996). A minimização do *fouling* é essencial para controlar a eficiência e a capacidade da separação. Nesse contexto, a velocidade de escoamento é um fator importante (DE BOER, 2014).

Além do *fouling*, a contaminação microbiana também é importante. Na maioria das vezes, a escolha da temperatura de operação é de 10 ou 50 °C. Em ambos os casos, o crescimento de micro-organismos é limitado. Para as membranas cerâmicas, a temperatura de 50 °C é sempre utilizada, pois o fluxo elevado de permeado compensa o maior investimento (DE BOER, 2014).

3.5.1.5. Compactação

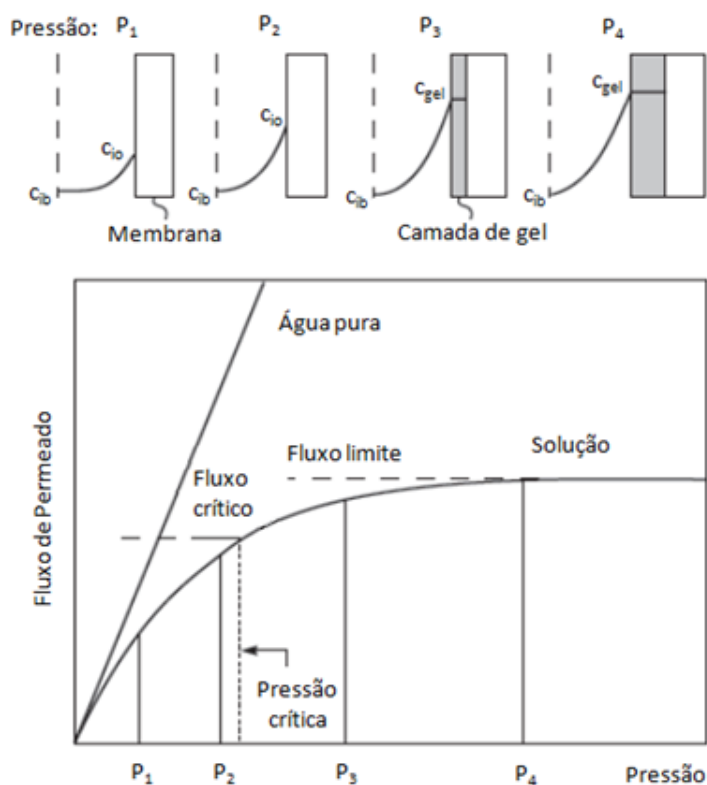
A compactação é uma deformação mecânica de membranas de estrutura porosa que ocorre em processos cuja força motriz é a diferença de pressão. Durante esses processos, ocorre um adensamento da estrutura porosa e, como resultado, o fluxo diminui. Após o relaxamento, o qual ocorre mediante a redução da pressão, o fluxo de permeado geralmente não retorna totalmente ao seu valor original, uma vez que o processo de deformação é muitas vezes irreversível (MULDER, 1996).

3.5.1.6. Fluxo crítico, fluxo limite, pressão crítica e pressão limite

À medida que a pressão aplicada é aumentada, ocorre a formação de uma camada de solutos – torta ou camada de gel – na superfície da membrana de ultrafiltração e o chamado fluxo limite ou *plateau*, o qual não pode ser ultrapassado, é atingido. Uma vez que uma camada de solutos se formou sobre a membrana, o aumento da pressão aplicada não resulta em um aumento do fluxo de permeado, mas apenas no aumento da espessura dessa camada de solutos (BAKER, 2012).

O melhor desempenho de uma membrana de ultrafiltração ou microfiltração é obtido quando a pressão aplicada é mantida abaixo da pressão crítica. Com o decorrer do processo, o material na superfície da membrana pode tornar-se compacto ou precipitar, formando uma camada de material depositado que tem uma permeabilidade mais baixa e, em seguida, o fluxo diminui em relação ao valor inicial. Quando a operação em fluxo constante tornou-se comum na década de 1990, o termo fluxo crítico foi definido como o fluxo em que a camada de solutos na superfície da membrana começa a ser formada (BAKER, 2012). A pressão crítica corresponde ao fluxo crítico e a pressão limite, ao fluxo limite, os quais são esquematizados na Figura 13.

Figura 13. Representação esquemática do efeito da pressão sobre uma membrana de UF: formação da camada de gel e efeito sobre o fluxo de permeado.



Fonte: adaptado de Baker (2012).

Conforme Tarleton e Wakeman (2006), é importante que seja verificada a relação entre o fluxo de permeado e a pressão transmembrana para identificar a pressão ótima de operação, pois não haverá ganho em qualquer aspecto do processo de separação por membranas ao permitir que a curva atinja um patamar constante. Nessa condição, o fluxo do permeado e o percentual de transmissão do soluto podem diminuir, os custos de operação aumentarão e a limpeza da membrana será mais difícil de ser realizada.

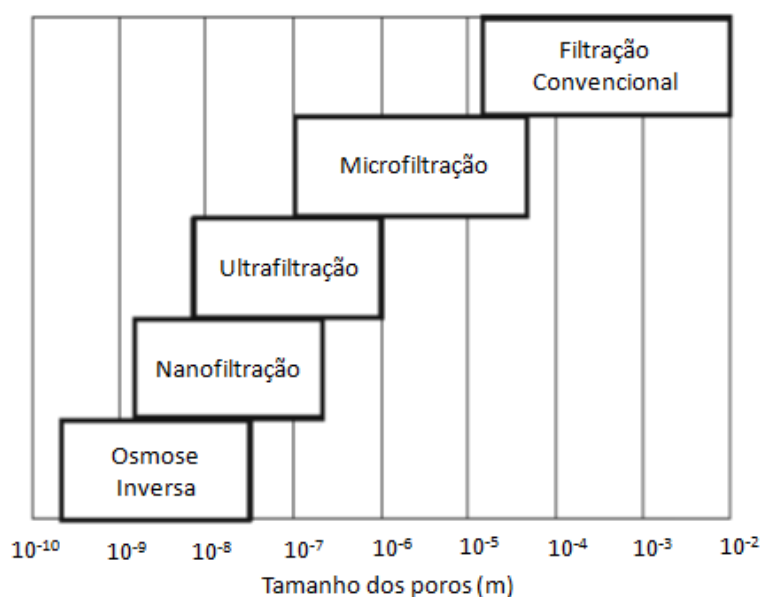
3.5.3. Microfiltração e ultrafiltração

A microfiltração é um processo de separação por membrana que mais se assemelha à filtração convencional. As dimensões dos poros das membranas de microfiltração variam entre 0,05 e 0,1 μm , tornando o processo adequado para retenção de suspensões e emulsões. Fabricantes de membranas de microfiltração informam o tamanho de poro nominal, o qual é

determinado com base nas menores partículas que uma membrana pode rejeitar com uma eficiência de 90 a 99 %, dependendo do fabricante (MULDER, 1996; YOON, 2015).

A ultrafiltração é um processo de separação por membrana situada entre a nanofiltração e a microfiltração. Os tamanhos dos poros das membranas utilizadas variam entre 1 nm e 0,05 μm . A ultrafiltração é normalmente usada para reter macromoléculas e colóides de uma solução, sendo o limite inferior solutos com massas molares de alguns milhares de daltons. As membranas utilizadas na ultrafiltração podem ser consideradas como membranas porosas em que a rejeição é determinada principalmente pelo tamanho e forma dos solutos em relação ao tamanho dos poros da membrana, e em que o transporte do solvente é diretamente proporcional à pressão aplicada. Contudo, as membranas de ultrafiltração são caracterizadas por possuírem uma estrutura assimétrica: no topo da membrana há uma camada seletiva mais densa, com tamanho de poros e porosidade da superfície menores e, conseqüentemente, uma maior resistência hidrodinâmica quando comparadas às membranas de microfiltração (MULDER, 1996). A Figura 14 mostra um esquema de classificação dos processos de separação por membranas, considerando o tamanho médio de poros das membranas.

Figura 14. Classificação dos processos de separação por membranas.



Fonte: adaptado de Ghosh (2009).

A fim de escolher uma membrana de ultrafiltração adequada para determinado processo, utiliza-se o conceito de massa molar de corte (MMC), que é definido como a massa molar que é rejeitada em, pelo menos, 90 % pela membrana (MULDER, 1996). O tamanho de poros de uma membrana não é um valor absoluto, pois há sempre uma distribuição de tamanho de poros. Contudo, os valores de MMC são apenas uma indicação aproximada, uma vez que a concentração da alimentação, a pressão aplicada, as características moleculares, a carga e a absorção podem também ter um impacto na rejeição (DE BOER, 2014).

Para otimizar as condições de operação das membranas de microfiltração, é essencial assegurar que os parâmetros estruturais como a porosidade (da superfície) seja tão elevada quanto possível e com a distribuição do tamanho dos poros mais estreita possível. Frequentemente, as membranas inorgânicas são usadas em vez de membranas poliméricas devido à sua excelente resistência térmica e química. Além disso, o tamanho de poros daquelas pode ser melhor controlado e, conseqüentemente, a distribuição do tamanho dos poros é geralmente mais estreita (MULDER, 1996).

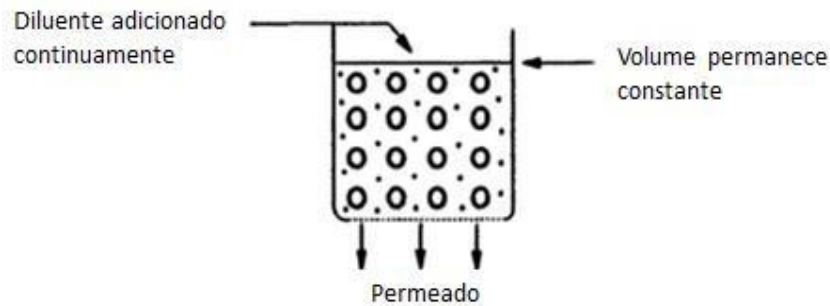
3.5.3. Diafiltração

A diafiltração é um modo de operação que consiste na remoção de espécies dissolvidas através da membrana para melhorar a recuperação do material no permeado ou para melhorar a pureza da corrente retida. A diafiltração é geralmente utilizada na recuperação de antibióticos de seus caldos de fermentação, na remoção de lactose das proteínas do soro de leite, na dessalinização de fluidos de processos químicos, entre outros (MERRY, 1996). A diafiltração pode ser operada de dois modos: contínuo ou descontínuo.

A diafiltração contínua é o modo de operação no qual se emprega a diluição a volume constante para lavar a solução de alimentação, adicionando o diluente no sistema na mesma taxa que o permeado deixa o sistema com a finalidade de remover os solutos contaminantes. Dessa forma, o volume da solução no tanque é mantido constante durante a operação. Esse modo de operação é particularmente útil se a concentração do soluto retido for muito elevada para permitir operações eficazes de ultrafiltração ou diafiltração

descontínua para realizar a concentração (CHERYAN, 1998). A diafiltração contínua é ilustrada na Figura 15.

Figura 15. Representação esquemática do modo de operação em diafiltração contínua.

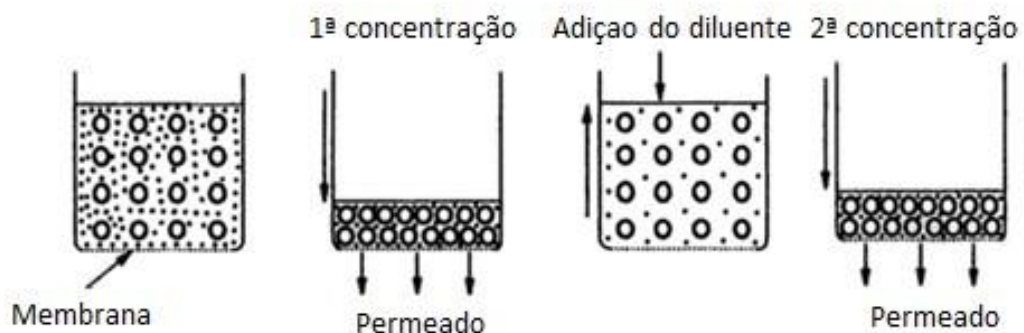


Fonte: adaptado de Cheryan (1998).

A diafiltração em concentrações baixas produz fluxos de permeado mais elevados, mas o volume que tem de ser removido também é grande. Em soluções mais concentradas, o fluxo de permeado é baixo, porém o volume a ser removido também é baixo. Há uma concentração intermediária ótima para a diafiltração contínua, que resulta no menor tempo para remover um determinado volume de permeado (TARLETON, WAKEMAN, 2006).

A diafiltração descontínua é o modo de operação no qual o diluente é adicionado de forma intermitente. O processo inicia com a pré-concentração e, após, o diluente é adicionado ao tanque de alimentação até retornar ao volume inicial. Essas duas etapas são repetidas tantas vezes quanto forem necessárias. Finalmente, é realizada uma última concentração até atingir o volume desejado. A Figura 16 ilustra a diafiltração descontínua.

Figura 16. Representação esquemática do modo de operação em diafiltração descontínua.



Fonte: adaptado de Cheryan (1998).

O número de volumes de diluente necessário depende da quantidade de sais ou de outras moléculas pequenas que precisam ser removidos e da permeabilidade desses solutos através da membrana (TARLETON; WAKEMAN, 2006).

3.5.4. Aplicação de processos de separação por membranas envolvendo soluções contendo proteínas e desafios

Segundo Ghosh (2009), do ponto de vista operacional, a ultrafiltração pode ser utilizada para processos envolvendo soluções contendo proteínas com o objetivo de concentrar (remoção de solvente), dessalinizar (remoção de compostos de baixa massa molar), clarificar (remoção de partículas) e fracionar (separação de proteínas de uma mistura).

Concentração, dessalinização e clarificação são operações bem estabelecidas na indústria desde 1970. No entanto, o fracionamento de macromoléculas utilizando ultrafiltração é uma operação significativamente mais desafiadora e ainda um campo em desenvolvimento. As principais vantagens da ultrafiltração em relação a outras tecnologias de separação são a alta taxa de transferência de produto, a relativa facilidade de aumento de escala, e a facilidade de limpeza e sanitização dos equipamentos (GHOSH, 2009).

O fracionamento de macromoléculas com massas molares próximas utilizando ultrafiltração é um grande desafio devido, principalmente, à ampla distribuição de tamanho de poros das membranas de ultrafiltração. Isso implica que o fracionamento baseado puramente no tamanho não é viável utilizando as membranas disponíveis atualmente. O desenvolvimento de membranas avançadas com distribuições de tamanho de poros estreitas poderia tornar o fracionamento mais viável. Com as membranas disponíveis no momento, outros fatores têm de ser levados em consideração para realizar o fracionamento das proteínas, tais como a modificação da membrana, interações soluto-soluto e interações soluto-membrana (GHOSH, 2009).

Ainda, de acordo com Ghosh (2009), os principais desafios que precisam ser abordados para realizar o fracionamento de proteínas são os seguintes:

- desenvolvimento de membranas melhores e métodos de modificação de membranas;

-
- controle da polarização por concentração;
 - controle do *fouling*;
 - compreensão dos parâmetros operacionais e físico-químicos no transporte de proteínas através das membranas de ultrafiltração;
 - entendimento da função das interações proteína-proteína na ultrafiltração;
 - desenvolvimento de processos orientados especificamente para o fracionamento destas macromoléculas.

Alguns avanços já vêm ocorrendo para possibilitar o fracionamento das proteínas com massas molares próximas. A filtração tangencial de alto desempenho, conhecida como HPTFF (*High Performance Tangential Flow Filtration*) é uma tecnologia emergente que pode ser usada para separar espécies com tamanhos próximos usando membranas semipermeáveis. A HPTFF é um método de purificação que explora as diferentes características de tamanho e carga das biomoléculas. Moléculas que diferem menos de três vezes em tamanho podem ser separadas mediante o uso de membranas carregadas positiva ou negativamente combinadas com a otimização das condições físico-químicas da solução e condições de escoamento do fluido (CHRISTY *et al.*, 2002).

Estudos envolvendo a utilização de membranas com carga, mediante modificação das membranas pelo método patenteado por van Reis (2006) vem sendo realizados com o objetivo de realizar o fracionamento de proteínas de tamanhos próximos, como as proteínas do soro de leite BLG e CMP, LF e BSA, ALA e BLG (ARUNKUMAR; ETZEL, 2013; BHUSHAN; ETZEL, 2009; VALIÑO *et al.*, 2014). A permeabilidade das proteínas com carga de mesma natureza da membrana é consideravelmente mais baixa devido à repulsão eletrostática. Essas interações repulsivas reduzem não apenas a passagem das proteínas através da membrana, mas também o *fouling* (CHRISTY *et al.*, 2002).

3.4. Revisão de trabalhos sobre o fracionamento das proteínas do soro de leite

A seguir são apresentados alguns trabalhos realizados com o objetivo de fracionar as proteínas do soro de leite abordando diferentes métodos, como ajuste de parâmetros físico-

químicos, adição de carga nas membranas ou realização do tratamento para promover a agregação proteica da ALA, permitindo sua separação das demais proteínas.

Bhushan e Etzel (2009) realizaram um estudo em que examinaram a utilização de membrana com carga positiva para aumentar a seletividade do processo de ultrafiltração e possibilitar o fracionamento das proteínas do soro de leite. Ao adicionar carga positiva nas membranas de ultrafiltração e ajustar o pH da solução, foi possível permear as proteínas que possuíam pouca ou nenhuma carga, como o CMP, e reter proteínas com carga positiva, como a BLG. A adição de carga na membrana aumentou a seletividade em mais de 600 % em comparação ao uso da membrana sem carga, sendo os valores de pH 3 e 4 as condições que apresentaram as melhores seletividades, ao passo que o maior fluxo de permeado foi atingido ao ajustar a solução em pH 3. Ao adicionar cloreto de sódio ao soro, não foi observada a mesma separação utilizando membranas com carga e ajuste de pH apenas, porém foi observado um aumento do fluxo de permeado. Segundo os autores, a adição de sal causou uma espécie de blindagem das proteínas e da membrana, fazendo com que a membrana com carga não fosse diferente da membrana sem carga. Já o aumento no fluxo de permeado verificado pela adição de sal pode ter ocorrido pela redução do diâmetro hidrodinâmico das proteínas devido ao colapso da dupla camada elétrica causado pelo aumento da condutividade elétrica da solução e redução do bloqueio dos poros da membrana pelas proteínas.

Arunkumar e Etzel (2013) estudaram o fracionamento das proteínas do soro de leite, ALA e BLG, através de ultrafiltração de fluxo tangencial utilizando membrana de celulose regenerada composta de 300 kDa adicionada de carga positiva, e ajustando o pH e a força iônica da solução. Os experimentos foram realizados a partir de uma solução contendo uma mistura binária de ALA e BLG (50:50) e foi verificado que as melhores condições para fracionar as proteínas foram em pH 4,3 e condutividade elétrica de $8,0 \text{ mS cm}^{-1}$. Essa estratégia possibilitou atingir um aumento de 490 % para a seletividade da ALA em comparação com a membrana sem adição de carga e, ao utilizar uma configuração de escoamento em dois estágios, a ALA obtida apresentou 87 % de pureza. A adição de carga positiva à membrana permitiu o fracionamento seletivo das proteínas do soro de leite que são cerca de 15 - 20 vezes menores que a massa molar de corte da membrana (MMC), possibilitando superar o conflito existente entre a permeabilidade e a seletividade, o qual é

inerente aos sistemas de membranas. De acordo com os autores, esse estudo demonstrou que a pureza cromatográfica pode ser obtida no fracionamento de proteínas sem o uso de cromatografia, mas apenas adicionando carga à membrana de ultrafiltração juntamente com uma configuração em estágios.

Toro-Sierra, Tolkach e Kulozik (2013) realizaram o fracionamento das proteínas do soro de leite por meio de um método otimizado em escala piloto para a produção de isolados de ALA e BLG. O método compreendeu os seguintes passos: (1) precipitação térmica seletiva da ALA utilizando citrato de sódio como agente complexante do íon cálcio e pH 3,4, (2) envelhecimento das partículas formadas, (3) separação da BLG nativa a partir do precipitado através de microfiltração e ultrafiltração, (4) purificação da BLG, (5) ressolubilização do precipitado, e (6) purificação da ALA. Foram produzidas frações de proteína com uma pureza de 91,3 % para ALA e 97,2 % para a BLG. Em relação aos rendimentos, foi possível alcançar valores entre 60,7 % e 80,4 % para a ALA e valores entre 80,2 % e 97,3 % para a BLG.

Fernández *et al.* (2011) estudaram o comportamento do CMP em um processo de fracionamento de proteínas do soro de leite com base na precipitação térmica seletiva da ALA em meio ácido. Três diferentes ácidos (clorídrico, cítrico e láctico) e diferentes parâmetros de operação (concentração de proteína, temperatura e pH) foram considerados para realizar a precipitação. Sob condições de precipitação ótimas obtidas para a ALA (pH 4, 55 °C, concentração inicial de ALA de cerca de 12 g L⁻¹), o CMP apresentou um comportamento bastante semelhante ao observado para a BLG, permanecendo no sobrenadante. Em relação aos ácidos utilizados, o ácido cítrico mostrou maior capacidade de precipitação da ALA. No entanto, em pH inferior a 3,5, a quantidade de CMP precipitada aumentou até 72 %, quando o ácido cítrico foi adicionado. Esse comportamento pode ser devido ao fato do CMP estar próximo do seu ponto isoelétrico, permitindo a obtenção de um sobrenadante enriquecido em BLG, estando praticamente livre das demais proteínas do soro de leite doce.

Valiño *et al.* (2014) avaliaram a separação de uma mistura binária contendo as proteínas BSA (pI 5,0) e LF (pI 9,0) utilizando membranas de ultrafiltração de 100 kDa com carga positiva, negativa e sem carga. A influência das seguintes variáveis operacionais de separação sobre a seletividade de separação foi analisada: (1) razão da concentração inicial de BSA / LF, (2) pH da solução baseado nos pontos isoelétricos das proteínas, e (3) a carga da

membrana de celulose regenerada composta. A razão de concentração BSA / LF de 4,0 / 1,0, a mesma do soro de leite, resultou na melhor condição de separação. Sob as condições ótimas, utilizando a membrana com carga positiva e solução com pH 5,0, a LF foi completamente retida pela membrana e um permeado enriquecido em BSA foi obtido, sendo observado um fluxo de permeação de BSA de $30,31 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Em contraste, a BSA foi completamente retida pela membrana carregada negativamente e solução com pH 9,0, produzindo um permeado enriquecido em LF, porém com um fluxo de permeação de apenas $1,07 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Lucena *et al.* (2007) estudaram a precipitação da ALA mediante a acidificação do soro de leite e concentrados proteicos com diferentes teores de proteína utilizando três ácidos diferentes: ácido clorídrico, ácido cítrico e ácido láctico. Os dois ácidos orgânicos foram capazes de complexar o íon Ca^{2+} , fazendo com que a ALA passasse do seu estado nativo, denominado *holo*-ALA, para o estado *apo*-ALA, o qual apresenta caráter hidrofóbico e, por isso, precipita. No entanto, quando o ácido clorídrico foi utilizado, a precipitação ocorreu devido à desnaturação irreversível das proteínas. A concentração de proteína inicial ótima foi cerca de 12 g L^{-1} . A temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 4,0 e razão molar de ácido orgânico/ Ca^{2+} superior a 9 foram as condições ótimas para efetuar a precipitação. Quando o processo de precipitação foi realizado em pH próximo do ponto isoelétrico da ALA combinado com a complexação do íon cálcio, foi observada a precipitação da BSA e Igs juntamente com a ALA, enquanto que a BLG permaneceu em solução devido à estabilização da proteína em baixas concentrações de Ca^{2+} .

Alomirah e Alli (2004) avaliaram um processo de fracionamento da ALA e BLG a partir de amostras comerciais de soro líquido (*liquid whey* - LW), concentrado proteico do soro de leite (WPC) e isolado proteico do soro de leite (WPI). O processo baseou-se na solubilidade da BLG em pH baixo e presença de sal, na fraca capacidade de ligação entre a ALA e o cálcio abaixo de pH 3,9 e na facilidade de quelação do cálcio utilizando agentes complexante (ácido cítrico, hexametáfosfato de sódio, EDTA e EGTA), os quais provocam a desestabilização e precipitação da ALA isenta de cálcio. O processo incluiu ainda aquecimento a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e centrifugação. Os sequestrantes citrato de sódio e hexametáfosfato de sódio foram mais eficazes para promover a separação da BLG e ALA. A recuperação da BLG variou entre 47 e 69 %, com purezas que variaram de 84 a 95 %, e conteúdos de proteína ente

40 e 99 %, dependendo da fonte de proteína utilizada (LW, WPC ou WPI) e do agente complexante. O rendimento da ALA sem ajuste do pH variou entre 23 e 89 %, com purezas que variaram de 83 a 90 %, e conteúdo de proteína na faixa de 65 a 96 %. Com o ajuste do pH para 7,5, o rendimento da ALA ficou na faixa de 11 a 43 %, com pureza que variou de 68 a 73 %, e conteúdo de proteína na faixa de 44 a 81 %. No entanto, os teores de cinzas de algumas das frações de proteínas ficaram relativamente elevados.

Bramaud, Aimar e Daufin (1997) investigaram a precipitação seletiva da ALA em um valor de pH em torno do seu ponto isoelétrico (4,2), utilizando ácido cítrico e citrato de sódio como agente complexante do íon cálcio, sob tratamento térmico, para realizar o fracionamento das proteínas do soro de leite. Nessas condições, a BLG permaneceu solúvel, enquanto que a BSA e Igs coprecipitaram. A utilização de citrato diminuiu a concentração do cálcio livre e deslocou o fenômeno de precipitação para uma faixa de temperatura menor. Independente do teor de citrato utilizado, as curvas de precipitação da BSA e ALA se intersectaram em temperatura de aproximadamente 45 °C. Para o tratamento térmico inferior a 40 °C, um enriquecimento seletivo da ALA na fase precipitada foi observado, sendo a temperatura de cerca de 35 °C adequada para a obtenção da ALA com maior pureza no precipitado e, conseqüentemente, menor desnaturação térmica das proteínas do soro de leite.

Almécija *et al.* (2007) investigaram o efeito do pH para realizar o fracionamento das proteínas do soro de leite clarificado utilizando uma membrana cerâmica de 300 kDa e operando em modo de diafiltração contínua. Em relação ao fluxo de permeado, os maiores valores foram alcançados ao ajustar o pH do soro para 3 (68 a 85 L m⁻² h⁻¹), 9 (91 a 87 L m⁻² h⁻¹) e 10 (89 a 125 L m⁻² h⁻¹), ao passo que os menores fluxos de permeado foram observados nos valores de pH próximos dos pontos isoelétricos das proteínas majoritárias do soro de leite, pH 4 (40 a 25 L m⁻² h⁻¹) e 5 (51 a 25 L m⁻² h⁻¹). Para a ALA e a BLG, a soma dos rendimentos do concentrado e permeado foi de cerca de 100 % em todos os casos, indicando que não ocorreu perda dessas proteínas. Após 4 diavolumes, o rendimento de concentrado para a ALA variou de 43 %, em pH 9, a 100 %, em pH 4, enquanto que para BLG o rendimento variou de 67 %, em pH 3, a 100 %, em pH 4. Em contraste, as proteínas BSA, IgG e LF foram retidas na sua maior parte, com melhoria de até 60 % em relação a pureza, em pH 9,0, em comparação com o soro original.

3.5. Considerações finais

O soro de leite é o coproduto da produção de queijos que contém proteínas de elevada qualidade. Devido ao grande volume de soro gerado, é necessária a realização de mais pesquisas que possibilitem aproveitar todo o seu potencial para gerar novos ingredientes de maior valor agregado, tornando-o atraente para que investimentos no setor sejam realizados e, assim, aproveitá-lo integralmente, especialmente em um país como o Brasil, que gera um grande volume de soro, mas que acaba sendo desperdiçado, muitas vezes de forma inadequada, e necessitando importar as proteínas do soro para atender às necessidades internas.

Embora ainda haja espaço para os concentrados e isolados proteicos do soro de leite, as pesquisas mais recentes mostram uma tendência em realizar o fracionamento das proteínas para aproveitar melhor todas as propriedades que cada uma dessas frações oferece. Os processos de separação por membranas continuam sendo a principal forma para obter os produtos concentrados e isolados proteicos a partir do soro, e para a obtenção das diferentes frações proteicas não será diferente, principalmente quando é necessário realizar a produção dessas proteínas em escala industrial para atender a demanda da indústria de alimentos. Para que o fracionamento seja possível, é preciso levar em consideração as características da solução contendo as proteínas e da membrana a ser utilizada, visto que o tamanho próximo das proteínas torna o processo um grande desafio. Os PSM também poderão ser combinados com outras formas de processamento prévios para que o sistema de membranas seja operado da melhor forma possível. O desenvolvimento de novas membranas ou modificação de membranas já existentes para aplicações envolvendo soluções contendo proteínas também parece ser um caminho a ser avaliado, não deixando de lado o controle dos parâmetros físico-químicos da solução, uma vez que as interações proteína-proteína e proteína-membrana afetam diretamente o desempenho dos PSM.

Capítulo 4 - Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentadas as matérias-primas, as soluções, os reagentes, os equipamentos utilizados, e a descrição dos experimentos e das análises realizadas neste trabalho. Todos os experimentos e as análises foram realizados no Laboratório de Processos de Separação por Membranas – LASEM e na Central Analítica do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

4.1. Matéria-Prima

4.1.1. Soro de leite em pó

O soro de leite em pó utilizado neste trabalho foi obtido da empresa Hexus Food Ingredients (Portão, RS), a qual comercializa o soro de leite em pó fabricado pela Pic-Nic (Tapejara, PR).

A utilização do soro de leite em pó neste trabalho se deve a sua maior estabilidade em comparação ao soro de leite *in natura*, podendo ser armazenado pelo período de 12 meses. Dessa forma, o risco de desenvolvimento microbiológico é minimizado e os custos com transporte e armazenamento são reduzidos.

O soro de leite em pó apresenta as seguintes características: pó uniforme, sem grumos, cor amarelada, sabor agradável, odor não rançoso e semelhante ao soro de leite fluido. A composição química é apresentada na Tabela 7, segundo a especificação técnica do produto fornecida pela empresa que comercializa o produto.

Tabela 7. Composição química do soro de leite em pó Pic-Nic.

Componente	Quantidade (%)
Carboidratos (Lactose)	73
Proteínas	11
Gorduras Totais	1,5
Cinzas	11
Umidade	2,5

Fonte: adaptado do fabricante.

4.1.2. Isolado proteico do soro de leite

A proteína isolada do soro de leite utilizada neste trabalho também foi obtida da Hexus Food Ingredients (Portão, RS), a qual comercializa a proteína isolada do soro de leite Provon[®] 292, fabricada pela Glanbia Nutritionals (Monroe, WI, EUA).

A proteína isolada do soro de leite foi utilizada devido ao seu maior teor de proteínas e à sua maior pureza em comparação ao soro de leite em pó. Além disso, a utilização desse produto possibilita a realização direta dos experimentos com o objetivo de fracionar as proteínas majoritárias do soro sem ter que passar pelo processo prévio de concentração das proteínas a partir do soro de leite.

A proteína isolada do soro de leite se caracteriza como um pó homogêneo sem grumos de cor branca a amarelada, sabor e odor próprios. A informação nutricional da proteína Provon[®] 292 é apresentada na Tabela 8, conforme a especificação técnica do produto fornecida pela empresa.

Tabela 8. Informação nutricional da proteína isolada Provon® 292 da Ganblia Nutritional (porção de 100 g).

Componente	Quantidade (por porção de 100 g)
Calorias	371 kcal
Carboidratos	1 g
Proteínas	88,5 g
Gorduras Totais	0,87 g
Colesterol	1,9 mg
Fibra Alimentar	-
Cálcio	464 mg
Sódio	201 mg

Fonte: adaptado do fabricante.

De acordo com o fabricante, a Provon® 292 é uma proteína isolada obtida a partir do soro de leite doce por meio de processos de separação por membranas, resultando em um isolado proteico altamente puro, nutricionalmente superior e não desnaturado. Esse produto passa por um processo de instantaneização que lhe permite uma fácil dispersão em soluções e, ainda, apresenta baixo teor de lactose e gordura. De acordo com a especificação técnica do produto, esse isolado proteico também é estável, podendo ser armazenado pelo período de até 2 anos.

4.2. Reagentes

Os reagentes utilizados na realização dos experimentos e análises deste trabalho estão listados na Tabela 9.

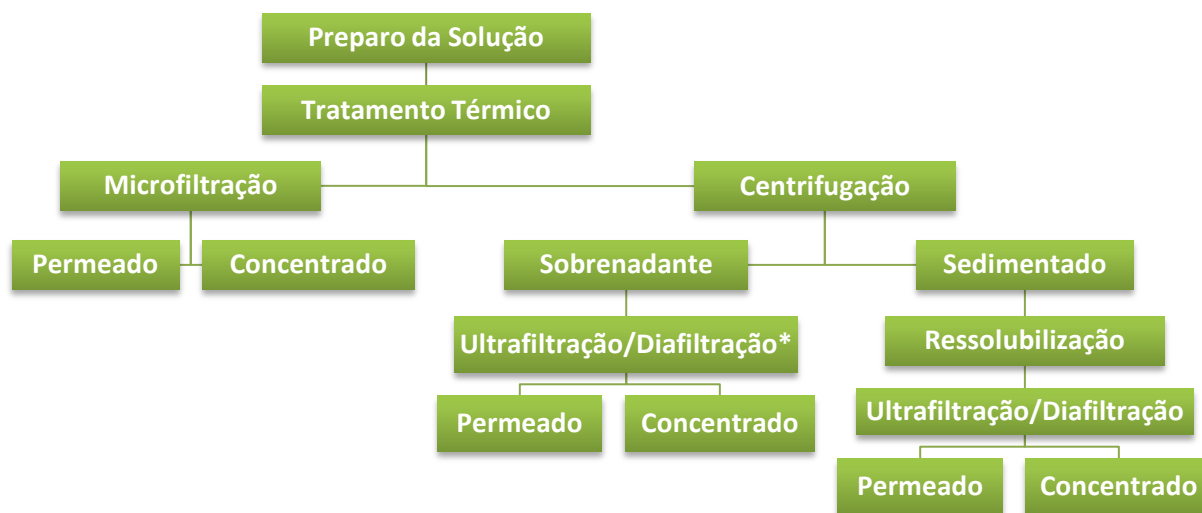
Tabela 9. Lista de reagentes utilizados nos experimentos e análises.

Reagente	Marca
2-mercaptoetanol P.S.	Dinâmica
Ácido acético glacial P.A.	Qhemis
Ácido cítrico anidro P.A.	Qhemis
Ácido clorídrico P.A.	Vetec
Acrilamida	GE Healthcare
Albumina do soro bovino	Sigma-Aldrich
Álcool etílico P.A.	Dinâmica
Azul de bromofenol	Vetec
Bis-acrilamida	Amershan Biosciences
Carbonato de sódio anidro	Fmaia
Citrato de sódio P.A.	Synth
Cloreto de cálcio P.A.	Dinâmica
Coomassie azul brilhante G 250	Merck
Dodecil sulfato de sódio	Merck
Glicerina P.A.	Dinâmica
Glicina P.A.	Dinâmica
Hidróxido de sódio P.A.	Vetec
Hipoclorito de sódio	Qboa
Marcador molecular padrão de ampla faixa	Bio-rad
Persulfato de amônio P.A.	Dinâmica
Reagente de Folin & Ciocalteu	Sigma-Aldrich
TEMED	GE Healthcare
TRIS	USB

4.3. Experimentos

A metodologia empregada para realizar o fracionamento das proteínas majoritárias do soro de leite é apresentada na Figura 17 na forma de um fluxograma. Cada uma das etapas é detalhada a seguir.

Figura 17. Fluxograma da metodologia experimental utilizada para fracionar as proteínas do soro de leite e do isolado proteico do soro de leite.



*Diafiltração foi realizada somente no pH que apresentou melhor comportamento do fluxo de permeado.

4.3.1. Preparo da solução

O preparo das soluções de soro de leite e de proteína isolada do soro de leite é detalhado a seguir.

4.3.1.1. Solução de soro de leite

Para o preparo da solução de soro de leite, solubilizou-se o soro de leite em pó em água destilada à temperatura ambiente com o auxílio de um agitador magnético. Citrato de sódio foi utilizado como agente complexante do íon cálcio e adicionado à solução ainda sob agitação. Após, ácido cítrico foi adicionado à solução ainda sob agitação para que o pH fosse ajustado para próximo de 4,0, conforme utilizado por Fernández *et al.* (2011). A quantidade de citrato de sódio adicionada foi calculada de forma que a solução final, após ajuste do volume, contivesse 0,15 M desse sal, conforme o estudo de Alomirah e Alli (2004). e a concentração de soro de leite em pó fosse igual a 6 % (m v⁻¹), que corresponde, aproximadamente, à concentração de sólidos totais do soro de leite *in natura*.

4.3.1.2. Solução de isolado proteico do soro de leite

Para o preparo da solução de proteína isolada, utilizou-se água destilada à temperatura ambiente sob leve agitação manual, a fim de evitar a formação de espuma, seguida de repouso até que fosse verificada a completa solubilização da proteína. Em seguida, foi adicionado citrato de sódio e ácido cítrico 3,0 M foi utilizado para o ajustar o pH da solução para aproximadamente 4,0, conforme Fernández *et al.* (2011), sob leve agitação manual para evitar a formação de espuma. Essa solução foi preparada de forma que a concentração de isolado proteico do soro de leite fosse igual a 6 % (m v⁻¹), similar ao teor de sólidos no soro de leite, e contivesse 0,15 M de citrato de sódio, conforme Alomirah e Alli (2004).

4.3.1.3. Características físico-químicas da água

A água destilada utilizada no preparo das soluções de todos os experimentos e análises apresentou condutividade elétrica entre 2,0 e 4,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e pH 5,7, aproximadamente.

4.3.2. Tratamento térmico

O tratamento térmico foi realizado tanto para a solução de soro de leite como para a solução de isolado proteico do soro de leite a fim de que ocorresse a agregação da proteína ALA, tornando-a insolúvel. Após o processamento térmico, as soluções foram submetidas a dois processos distintos, a fim de verificar o processo mais adequado para atingir o objetivo do trabalho: microfiltração ou centrifugação, sendo o sobrenadante e o sedimentado submetidos ao processo de ultrafiltração.

O tratamento térmico ao qual as soluções foram submetidas antes da MF ou centrifugação foi adaptado do método utilizado por Fernández *et al.* (2011). A solução foi aquecida a 55 °C durante 1 h e 30 min sob agitação (Agitador Mecânico Fisatom, modelo 711, velocidade 2).

Para avaliar a quantidade de proteína, bem como as proteínas presentes em cada fração

(sobrenadante e sedimentado) após a realização da etapa de centrifugação, o tratamento térmico foi realizado da mesma forma descrita anteriormente, porém sem a utilização de agitação, utilizando tubos Falcon de 50 mL fechados a fim de evitar a perda de água por evaporação ao aquecer a solução a 55 °C durante 1 h e 30 min.

4.3.3. Microfiltração

A microfiltração foi utilizada para reter a proteína ALA, a qual formou agregados proteicos e permear a proteína BLG.

4.3.3.1. Módulo e membranas

O módulo tubular utilizado foi fabricado pela Andritz Separation, Indústria e Comércio de Equipamentos de Filtração Ltda. As membranas de microfiltração utilizadas eram feitas de cerâmica, tubular monocanal com dois diferentes tamanho de poro nominal: 0,05 μm e 0,8 μm . A membrana de 0,05 μm tinha área de 0,00456 m^2 ; a membrana de 0,8 μm , 0,00451 m^2 .

Figura 18. Fotografias da membrana de MF: (A) vista lateral e (B) seção transversal.



4.3.3.2. Compactação das membranas

A compactação foi realizada com o objetivo de verificar que a queda de fluxo do permeado ao longo do processo ocorre somente devido aos fenômenos de polarização por

concentração e *fouling*.

Antes da realização de cada experimento, as membranas foram compactadas utilizando água destilada na pressão de $1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$ e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A membrana foi considerada compactada ao observar que o fluxo tinha se tornado constante com o decorrer do tempo.

4.3.3.3. Determinação da permeância hidráulica

Após compactadas e antes de cada experimento, as permeâncias hidráulicas das duas membranas de microfiltração utilizadas foram determinadas realizando medidas de fluxo de permeado utilizando água destilada nas pressões de 1,50; 1,25; 1,00; 0,75; 0,50 e $0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$ na temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Para cada pressão foi esperado entre 10 e 15 min para que ocorresse a estabilização do sistema e, então, a medida do fluxo de permeado foi realizada. Essa medição do fluxo de permeado foi realizada em triplicata para cada pressão, para cada membrana e para cada uma das soluções utilizadas. A permeância pode ser determinada plotando os dados de fluxo de permeado *versus* pressão, em que a permeância corresponde ao coeficiente angular da equação de primeiro grau obtida.

4.3.3.4. Determinação da pressão de operação

A determinação da pressão de operação para cada membrana e solução utilizada foi realizada a fim de verificar a pressão mais adequada para a realização dos experimentos, em que os efeitos da polarização por concentração e *fouling* fossem minimizados. Em todos os experimentos de MF para determinar a pressão de operação, o sistema operou em modo de reciclo total para que a concentração se mantivesse constante durante todo o experimento

Após o preparo da solução e formação dos agregados proteicos de ALA, a solução foi transferida para o tanque de alimentação do sistema de microfiltração. Este experimento foi realizado na temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e, para cada pressão, optou-se inicialmente por utilizar velocidade de escoamento constante para todas as pressões e, após os primeiros experimentos

com a primeira membrana, passou-se a utilizar a velocidade de escoamento máxima para cada pressão testada. A avaliação do fluxo de permeado em cada pressão foi realizada medindo-se o fluxo de permeado a cada 5 min durante 30 min, totalizando 6 medidas de fluxo de permeado para cada pressão. Os códigos dos experimentos de MF, as soluções utilizadas para cada membrana e a velocidade de escoamento utilizada em cada pressão – constante ou máxima – são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Velocidade de escoamento utilizada para determinar a pressão de operação para cada solução e membrana.

Código do experimento*	Membrana	Solução	Velocidade de escoamento**
MF1-A e MF1-B	0,05 μm	Isolado proteico do soro de leite 6 %	Constante
MF2-A e MF2-B	0,8 μm	Isolado proteico do soro de leite 6 %	Máxima
MF3-A e MF3-B	0,8 μm	Soro de leite 6 %	Máxima

*A se refere à primeira réplica e B se refere à segunda réplica de cada experimento.

**Velocidade de escoamento utilizada para cada pressão: constante (mesma velocidade para todas as pressões, $0,99 \text{ m s}^{-1}$) e máxima (velocidade máxima alcançada pelo sistema ao ajustar cada pressão).

A relação entre a velocidade máxima alcançada para cada pressão utilizada nos experimentos é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11. Relação entre a velocidade máxima para cada pressão.

Pressão (kgf cm^{-2})	Velocidade máxima (m s^{-1})
0,25	0,99
0,50	1,20
0,75	1,41
1,0	1,59
1,25	1,77

4.3.4. Centrifugação

A centrifugação foi utilizada para separar a proteína ALA que formou agregados proteicos após ajuste do pH, adição do agente complexante e realização do tratamento térmico. Essa fração proteica pode ser recuperada no sedimentado, ao passo que a proteína BLG permanece principalmente no sobrenadante.

A solução de soro de leite, após a formação dos agregados proteicos, foi transferida para tubos falcon de 50 mL e centrifugada a 6000 rpm durante 30 min (centrífuga Cientec CT-5000R) e à temperatura ambiente. Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi separado da proteína depositada no fundo dos tubos. Quando necessário, o sobrenadante foi separado da fração sedimentada com o auxílio de uma peneira doméstica devido ao desprendimento de pequenos pedaços dessa fração.

Nesta etapa, duas novas frações foram obtidas: o sobrenadante, o qual apenas teve o pH ajustado posteriormente quando necessário, e o sedimentado, que foi posteriormente ressolubilizado.

4.3.5. Resselubilização do sedimentado

A proteína sedimentada obtida na etapa de centrifugação foi solubilizada por meio de ajuste do pH e adição de cloreto de cálcio para que retornasse à sua forma solúvel.

Os tubos Falcon contendo a fração sedimentada foram lavados com água destilada e transferidos para um béquer. Adicionou-se o cloreto de cálcio, o qual causa uma leve redução do pH, e ajustou-se o pH da solução entre 8 e 9 utilizando hidróxido de sódio. A solução foi mantida sob agitação até que o pH se mantivesse constante e os agregados proteicos fossem completamente solubilizados. Em seguida, foi feito o ajuste do volume da solução para que o volume fosse o mesmo da solução inicial (1 L). Após, foi adicionado hidróxido de sódio à solução, sob agitação, para ajuste do pH final em 10.

4.3.6. Ultrafiltração e diafiltração

A ultrafiltração foi utilizada para concentrar a proteína BLG presente no sobrenadante e remover os solutos de pequena massa molar, tanto os presentes naturalmente no soro de leite, quanto os que foram adicionados. A fração sedimentada também foi submetida a um processo de concentração com a mesma membrana de ultrafiltração. No entanto, essa fração necessitou passar por uma etapa prévia para que ocorresse a sua ressolubilização, conforme descrito no item 4.3.5.

4.3.6.1. Módulo e membrana

O módulo do tipo tubular utilizado também foi utilizado na etapa de ultrafiltração. A membrana utilizada também foi fabricada pela Andritz Separation, Indústria e Comércio de Equipamentos de Filtração Ltda, feita de cerâmica, tubular monocanal com massa molar de corte de 5 kDa e área de 0,00440 m².

Figura 19. Fotografias das membranas de UF e MF: (A) vista lateral das membranas de 5 kDa (inferior), 0,05 µm (centro) e 0,8 µm (superior) e (B) seção transversal da membrana de 5 kDa (direita), 0,05 µm (centro) e 0,8 µm (esquerda).



4.3.6.2. Compactação

Antes da realização de cada experimento, a membrana foi compactada utilizando água destilada na pressão de 2,0 kgf cm⁻² e temperatura de 25 °C até atingir fluxo constante.

4.3.6.3. Determinação da permeância hidráulica

Após compactada e antes de cada experimento, a permeância da membrana foi determinada por meio de medidas de fluxo de permeado com água destilada nas pressões de 2,00; 1,50; 1,00 e 0,50 kgf cm⁻², em ordem decrescente, na temperatura de 25 °C. Os demais passos foram realizados da mesma forma descrita no item 4.3.3.3.

4.3.6.4. Determinação da pressão de operação

A determinação da pressão de operação para a membrana de 5 kDa utilizando o soro de leite em pó (sem adição de qualquer reagente ou ajuste de pH), o sobrenadante e a solução obtida a partir do sedimentado ressolubilizado foi realizada a fim de verificar a pressão mais adequada para a realização dos experimentos. O sistema foi operado em modo de reciclo total em todos os experimentos de UF para determinar a pressão de operação.

Esses experimentos foram realizados da mesma forma que foram feitas as determinações das pressões de operação das membranas de microfiltração (item 4.3.3.4), porém, ao utilizar a membranas de UF, deixou-se que a solução circulasse no sistema sem aplicação de pressão durante 20 min para que ocorresse uma estabilização térmica do sistema e ambientação da membrana em contato com a solução de trabalho. Para o sobrenadante avaliou-se o efeito de diferentes valores de pH a fim de trabalhar com a condição em que o fluxo de permeado se mantivesse o mais alto possível. Os valores aproximados de pH para cada uma das soluções analisadas são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de pH das soluções utilizadas nos experimentos de determinação da pressão de operação.

Solução	pH			
Soro de leite em pó 6 %	6,35*			
Sobrenadante	3,0	4,0**	7,0	10,0
Sedimentado ressolubilizado	10,0			

*pH aproximado ao reconstituir o soro de leite em pó com água destilada na concentração de 6 % (m v⁻¹).

**pH aproximado do sobrenadante após a centrifugação sem necessidade de ajuste.

A relação entre a velocidade máxima alcançada para cada pressão é a mesma apresentada na Tabela 11 do item 4.3.3.4.

Para fins de comparação entre os fluxos de permeado, a ultrafiltração foi realizada com a solução de soro de leite em pó 6 % ($m v^{-1}$). Para o experimento que atingiu o maior fluxo de permeado ao trabalhar com o sobrenadante e também para o sedimentado ressolubilizado em pH 10, a ultrafiltração foi combinada com a diafiltração.

4.3.6.5. Diafiltração

Para realizar a remoção de sais, ácido e outros compostos de pequena massa molar, foi realizada a diafiltração com água destilada nos experimentos que apresentaram os melhores fluxos de permeado para cada fração obtida após a centrifugação e ajuste de pH.

A diafiltração foi realizada adicionando 4 diavolumes de 250 mL, totalizando 1 L de água adicionada. Em relação aos permeados, foram coletados 250 mL a partir da solução inicial, mais 4 volumes de 250 mL, totalizando 1,25 L de permeado. Os permeados foram identificados conforme a Tabela 13, que também apresenta informação sobre as soluções iniciais e o concentrado.

Tabela 13. Informações sobre cada uma das soluções e correntes envolvidas no processo de ultrafiltração e diafiltração.

Corrente	Informações
Solução inicial	Sobrenadante ou sedimentado ressolubilizado
Pré-DF	Permeado da solução inicial (antes da adição de água)
DF1	Permeado após a adição do primeiro volume de 250 mL
DF2	Permeado após a adição do segundo volume de 250 mL
DF3	Permeado após a adição do terceiro volume de 250 mL
DF4	Permeado após a adição do quarto volume de 250 mL
Concentrado	Solução final após a coleta do permeado DF4

Nos experimentos que a diafiltração não foi realizada, apenas 200 mL de permeado foram coletados.

4.3.6.6. Determinação da tendência ao *fouling*

A tendência ao *fouling* foi determinada de forma similar ao experimento realizado para determinar a permeância das membranas. Após a realização dos experimentos de UF utilizando uma das soluções contendo proteínas, o sistema foi enxaguado com água destilada para remoção do concentrado que permaneceu dentro do sistema. Em seguida, foi removido o máximo possível da água de enxágue e adicionado 1 L de água destilada ao tanque de alimentação. Foram aplicadas as pressões de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 kgf cm⁻², em ordem crescente, com tempo de estabilização entre 10 e 15 minutos para cada pressão, a 25 °C e o sistema operando em recirculação total. As medidas de fluxo de permeado foram realizadas em triplicata. A tendência ao *fouling* foi calculada de acordo com a Equação 5.

$$Fouling (\%) = \left(1 - \frac{K_{PSuja}}{K_{PLimpa}} \right) \times 100 \quad (5)$$

em que K_{PSuja} é permeância hidráulica da membrana após a realização de cada experimento com uma das soluções contendo proteínas e K_{PLimpa} é a permeância hidráulica da membrana limpa.

4.3.6.7. Identificação dos experimentos de UF

A Tabela 14 apresenta as informações sobre os experimentos realizados e seus respectivos códigos, forma de identificação utilizada neste trabalho.

Tabela 14. Informações sobre os experimentos utilizando a membrana de ultrafiltração de 5 kDa.

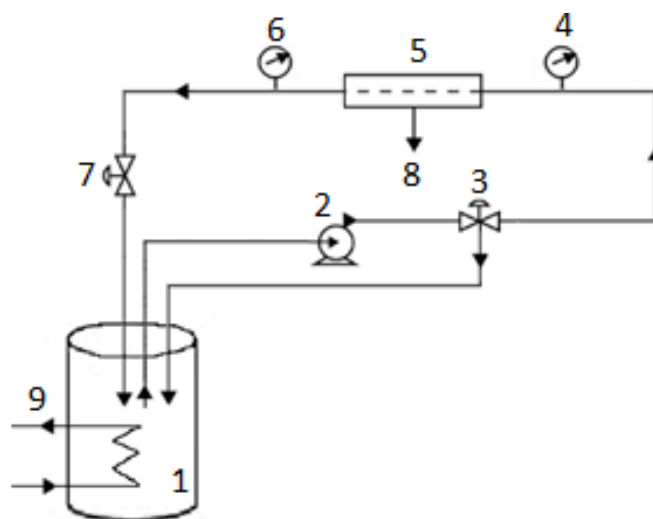
Código do Experimento*	Solução	Descrição
UF1-A e UF1-B	Soro de leite 6 %	Determinação da pressão de operação
UF2-A e UF2-B	Sobrenadante pH 4	Determinação da pressão de operação
UF3-A e UF3-B	Sobrenadante pH 3	Determinação da pressão de operação
UF4-A e UF4-B	Sobrenadante pH 7	Determinação da pressão de operação
UF5-A e UF5-B	Sobrenadante pH 10	Determinação da pressão de operação
UF6-A e UF6-B	Sedimentado ressolubilizado pH 10	Determinação da pressão de operação
UF7-A e UF7-B	Soro de leite 6 %	Concentração
UF8-A e UF8-B	Sobrenadante pH 4	Concentração
UF9-A e UF9-B	Sobrenadante pH 10	Concentração e purificação
UF10-A e UF10-B	Sedimentado ressolubilizado pH 10	Concentração e purificação

*A se refere a primeira réplica e B se refere a segunda réplica dos experimentos.

4.4. Sistema de microfiltração e de ultrafiltração

Na Figura 20 está apresentado um esquema detalhado do sistema de separação por membranas utilizado.

Figura 20. Representação esquemática do sistema de bancada para realização dos experimentos de MF e UF.



Cada parte identificada no sistema é detalhada a seguir conforme a numeração recebida:

1- tanque de alimentação e retorno do concentrado (capacidade de 1 L);

2- bomba diafragma (Shurflo, modelo nº 8030-813-239);

3- válvula para regular velocidade e pressão. Quando o sistema foi operado com a velocidade máxima em cada pressão, o controle da pressão foi feito apenas por essa válvula;

4- manômetro (antes do módulo);

5- módulo de MF e UF;

6- manômetro (após o módulo);

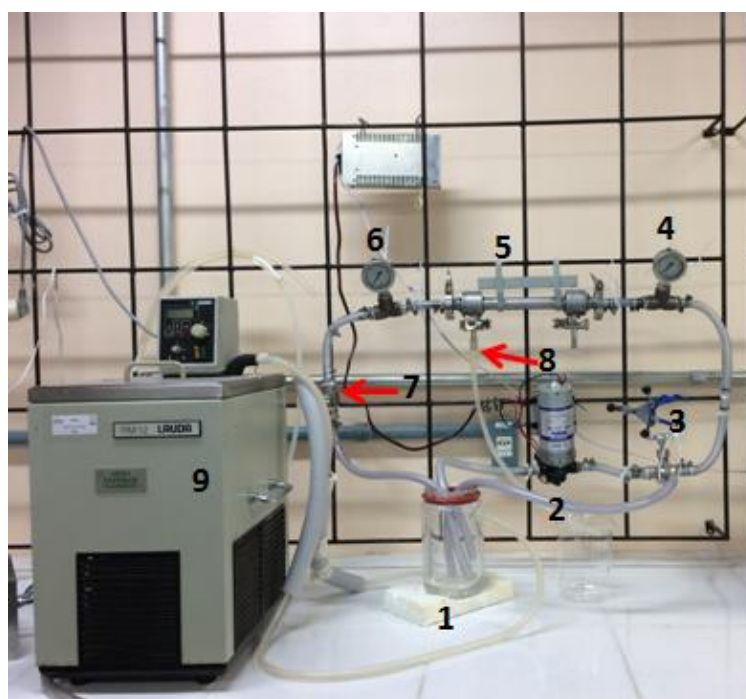
7- válvula para regular velocidade e pressão (no experimento em que a velocidade de operação foi a mesma em todas as pressões, essa válvula foi fechada para ajustar a velocidade e pressão juntamente com a válvula 3. Quando os experimentos foram realizados utilizando a velocidade máxima, a válvula 7 foi mantida totalmente aberta, sendo a pressão ajustada apenas pela válvula 3. Em todos os casos em que operou-se com a velocidade máxima, a escolha de determinada pressão resultou na mesma velocidade de escoamento);

8- corrente de permeado;

9- banho termostático para controle da temperatura da solução durante o processo.

Na Figura 21 está apresentada uma fotografia do sistema construído para a realização dos experimentos de MF e UF.

Figura 21. Fotografia do sistema de UF e MF construído para realização dos experimentos.



4.5. Limpeza das membranas

Após a realização de cada experimento, foi utilizado o protocolo descrito a seguir para realizar a limpeza das membranas.

Enxágue do sistema e membrana: após a remoção do concentrado do sistema, cerca de 8 a 10 L de água destilada à temperatura ambiente foi adicionada gradativamente ao sistema. As mangueiras de retorno foram imersas em outros recipientes para que a água não fosse recirculada. Esse procedimento foi realizado para remover os resíduos que se encontram dentro do sistema e sobre a membrana. O volume utilizado foi suficiente para que a água saísse do sistema com aspecto límpido.

Limpeza alcalina do sistema e membrana: após a remoção da água de enxágue do sistema, adicionou-se 1 L de solução de hidróxido de sódio 0,5 % (m v^{-1}) em temperatura entre 50 e 55 °C e pressão de 0,25 kgf cm^{-2} . Essa solução foi recirculada no sistema por aproximadamente 30 min, porém com o permeado sendo coletado em outro recipiente.

Limpeza cloro-alcalina do sistema e membrana: ao decorrer dos experimentos, foi observado que a limpeza não estava mais possibilitando alcançar os mesmos valores iniciais da permeância hidráulica. Por esse motivo, foi adicionado hipoclorito de sódio à solução alcalina para auxiliar na sanitização do sistema e tentar recuperar a permeância inicial. A concentração de hipoclorito variou entre 0,02 e 0,025 %, a concentração de hidróxido de sódio foi de 0,5 % e o volume utilizado foi de 2 L de solução, o qual foi adicionado gradativamente ao sistema, com recirculação da solução, porém sem o retorno do permeado.

Enxágue do sistema: após a remoção da solução alcalina ou cloro-alcalina, foi utilizado entre 8 e 10 L de água destilada à temperatura ambiente para remover os resíduos dessas soluções.

Limpeza ácida: após a remoção da água de enxágue do sistema, adicionou-se 1 L de solução de ácido cítrico na concentração de 0,5 % (m v^{-1}). Essa solução foi recirculada no sistema à temperatura entre 50 e 55 °C e pressão de 0,2 kgf cm^{-2} durante aproximadamente 20 min. Quando os experimentos foram realizados com a solução feita a partir da proteína sedimentada, devido à adição de cloreto de cálcio, foi utilizada 1 L de solução de ácido cítrico 1 % (m v^{-1}) nas mesmas condições. Essa solução não teve o permeado retornado para o sistema.

Enxágue do sistema: após a remoção da solução ácida, foram utilizados de 8 a 10 L de água destilada à temperatura ambiente para remover os resíduos dessa solução.

Limpeza da membrana com ultrassom: após a finalizada a limpeza química, a membrana foi colocada em banho de ultrassom a 50 °C durante 1 h.

Limpeza da membrana com cloro: após a limpeza utilizando o ultrassom, a membrana foi submersa em solução de hipoclorito de sódio com concentração entre 1 e 1,25 % (m v^{-1}) durante 1 h.

Enxágue da membrana: após a sanitização da membrana, ela foi enxaguada com água destilada e armazenada em água destilada sob refrigeração até sua utilização no experimento seguinte.

Limpeza enzimática: nos experimento finais foi observada uma dificuldade persistente em recuperar a permeância da membrana somente com o protocolo descrito anteriormente. Devido a isso, foi utilizada uma enzima proteolítica para auxiliar na limpeza da membrana. A enzima utilizada foi a Alcalase[®] 2.4 L FG - EC 3.4.21.62 (Novozymes), a 50 °C, pH 8,0, pressão de 0,25 kgf cm⁻² e recirculação total da solução. Quando a limpeza enzimática foi utilizada, ela foi realizada após o primeiro enxague do sistema e membrana, e antes da limpeza cloro-alkalina.

4.6. Análises

4.6.1. Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), um método colorimétrico, e os resultados expressos em g L⁻¹. Como esse método apresenta o resultado na forma de concentração de proteína da solução e não pode ser aplicado diretamente à fração sedimentada, foi preparada uma solução contendo essa fração, resultando no mesmo volume da solução inicial e denominada como sedimentado ressolubilizado. Nenhum ajuste foi necessário para o sobrenadante, solução de soro de leite, permeados e concentrados. Contudo, para a realização da leitura no espectrofotometro (T80 UV VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd), cada solução ou corrente obtida foi diluída de forma a ficar dentro da curva padrão utilizando a proteína BSA e comprimento de onda de 750 nm.

As amostras de cada solução – soro de leite, sobrenadante, sedimentado ressolubilizado, permeados, concentrados – foram congeladas a -18 °C até o momento da análise.

4.6.2. Eletroforese (SDS-PAGE)

A técnica de eletroforese SDS-PAGE permite a visualização das proteínas com diferentes massas molares presentes nas diferentes soluções de proteínas devido às diferentes velocidades de migração das proteínas no gel de poliacrilamida. Para essa análise, foi utilizado o equipamento Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Os géis foram preparados utilizando placas de vidro com espaço de 1,5 mm. As concentrações de BIS/acrilamida nos géis de empilhamento e de separação foram de 4 % e 15 %, respectivamente. As soluções de soro de leite e seus derivados (sobrenadante e sedimentado ressolubilizado) foram diluídas 2,5 vezes. Em relação às correntes obtidas após a realização dos PSM, os permeados não foram diluídos, ao passo que os concentrados foram diluídos 2,5 vezes. Uma alíquota de cada amostra foi misturada com a solução de tratamento – 25 % (v v⁻¹) de TRIS 6 % (m v⁻¹) em pH 6,8; 40 % (v v⁻¹) de dodecil sulfato de sódio 10 % (m v⁻¹); 20 % (v v⁻¹) de glicerina; 1 % (v v⁻¹) de 2-mercaptoethanol; 5 % (v v⁻¹) de água destilada – e solução de azul de bromofenol 1 % (m v⁻¹) na proporção 3:3:1 (amostra:solução de tratamento:azul de bromofenol). Em cada raia do gel, foi adicionada uma alíquota de 20 µL da mistura contendo a amostra, a solução de tratamento e a solução de azul de bromofenol. Para que a migração das proteínas ocorresse no gel de empilhamento, foi utilizada tensão de 80 V durante cerca de 30 min. Para a migração no gel de separação, aplicou-se tensão de 110 V durante 1 h e 40 min, aproximadamente. Após, os géis foram colocados em uma solução contendo etanol 40 % (v v⁻¹), ácido acético 7 % (v v⁻¹) e corante coomassie azul brilhante Blue G 250 0,025 % (m v⁻¹) para corar as bandas de proteínas. A remoção do corante em excesso foi realizada utilizando solução contendo etanol 50 % (v v⁻¹), ácido acético 10 % (v v⁻¹) e água destilada 40 % (v v⁻¹), seguida por outra solução contendo etanol 5 % (v v⁻¹), ácido acético 7 % (v v⁻¹) e água destilada 88 % (v v⁻¹) até que apenas as bandas permanecessem coradas. Os géis foram, então, armazenados em água destilada até serem fotografados.

As amostras de cada solução ou corrente obtidas durante os experimentos foram congeladas a -18 °C até o momento da análise de eletroforese.

4.6.3. Medição de pH, condutividade elétrica e turbidez

Para a caracterização das diferentes frações obtidas com o pré-tratamento, utilizou-se o condutivímetro Digimed DM31, o pHmetro Digimed DM20 e o turbidímetro Policontrol AP-2000. Todos os equipamentos foram calibrados de acordo com as instruções do fabricante antes de realizar as medições.

A determinação da condutividade elétrica foi utilizada, pois ela fornece uma medida indireta da concentração de íons presentes na solução.

Capítulo 5 - Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados envolvendo os experimentos de agregação proteica seguida de microfiltração ou centrifugação combinada com ultrafiltração, em que foram avaliadas, inicialmente, as pressões de operação para cada membrana e solução utilizada, bem como o pH, no caso da ultrafiltração, para possibilitar um processo de separação por membrana com um fluxo de permeado adequado. Após a escolha entre microfiltração e centrifugação combinada com ultrafiltração, são apresentados e discutidos os experimentos nas condições em que o fluxo de permeado se mostrou mais elevado, o qual foi utilizado como parâmetro de escolha. Todos os dados experimentais encontram-se nos Apêndices A, B, C e D.

5.1. Microfiltração

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados relacionados ao tempo de compactação e a permeância hidráulica obtida, assim como a variação relativa da permeância para as membranas de MF de tamanho de poro nominal de 0,05 e 0,8 μm .

Tabela 15. Dados dos experimentos envolvendo as membranas que antecederam a determinação da pressão de operação - permeância, tempo total de compactação e variação relativa da permeância.

Membrana	Experimento	Tempo total de compactação	Permeância (L cm ² kgf ⁻¹ m ⁻² h ⁻¹)	Variação relativa da permeância*
0,05 µm	MF1-A	5 h	699,6	-
0,05 µm	MF1-B	3 h e 50 min	801,9	+14,6 %
0,8 µm	MF2-A	4 h	2621	-
0,8 µm	MF2-B	2h	2862	+9,2 %
0,8 µm	MF3-A	4h	2359,6	-
0,8 µm	MF3-B	3h	4015,6	+70,2 %

* Variação relativa da permeância do experimento B em relação ao experimento A correspondente.

Como pode ser observado na Tabela 15, a membrana de MF de 0,8 µm apresentou maior permeância que a membrana de 0,05 µm e isso se deve ao maior tamanho de poro da membrana de 0,8 µm, porém esses valores não significam que uma membrana seja mais adequada que a outra para o processo. Embora o fluxo tenha sido escolhido como parâmetro de seleção para determinar a pressão de operação e realizar o fracionamento, a retenção das proteínas também é importante e, portanto, deve ser avaliada quando utilizada a solução de trabalho. Tanto a membrana de 0,05 µm quanto a de 0,8 µm apresentaram um aumento da permeância ao comparar cada experimento B com o experimento A correspondente. Mesmo que os tempos de compactação tenham sido diferentes, sendo, em alguns casos, superiores ao tempo necessário para que a compactação fosse atingida, o fluxo de permeado se manteve constante, indicando a estabilização mecânica da membrana. Os gráficos de compactação das membranss de MF podem ser visulizados no Apêndice A (Figuras A1, A3 e A5). Vale ressaltar que as membranas já haviam sido utilizadas em trabalhos anteriores, podendo, assim, ainda conter algum resíduo de outras soluções, como também resíduos das soluções utilizadas neste trabalho.

Ao comparar o experimento MF2-B com o experimento MF3-A, em que a mesma membrana foi utilizada, observou-se uma queda na permeância, mostrando que a limpeza

entre esses experimentos não foi muito eficiente, porém a limpeza entre os experimentos MF3-A e MF3-B recuperou a permeância da membrana, sendo observado um aumento de 70 %. Em todos os experimentos, as membranas foram limpas antes da primeira utilização e após a realização de cada experimento.

5.1.1. Determinação da pressão de operação

A seguir são apresentados os resultados dos experimentos para determinar a pressão de operação utilizando as membranas de MF e as soluções de isolado proteico e soro de leite.

5.1.1.1. Solução de isolado proteico do soro de leite

Os resultados de fluxo permeado em diferentes pressões para a determinação da pressão de operação utilizando as membranas de MF e solução de isolado proteico do soro do leite 6 % (m v^{-1}) estão apresentados nas Figuras 22 e 23.

Figura 22. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de MF de $0,05 \mu\text{m}$, solução de isolado proteico 6 % (m v^{-1}), velocidade de escoamento de $0,99 \text{ m s}^{-1}$ e temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$.

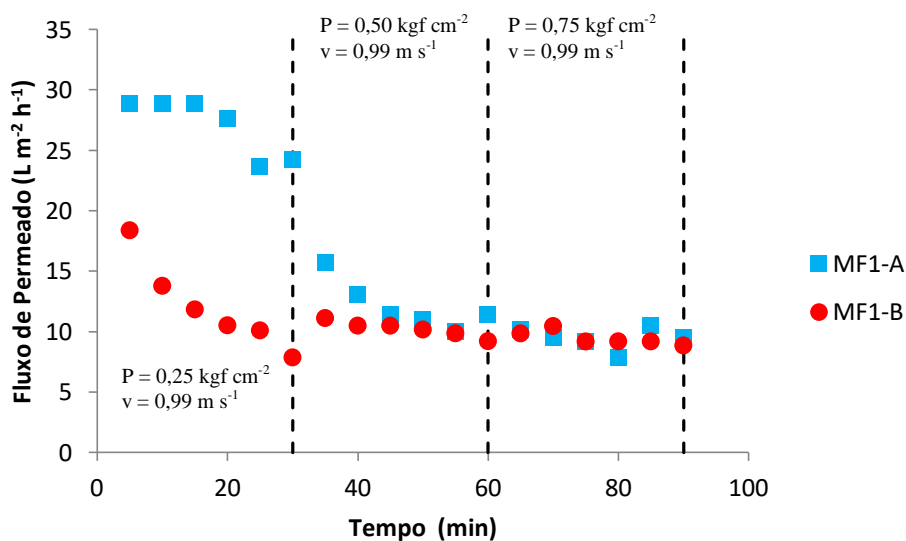
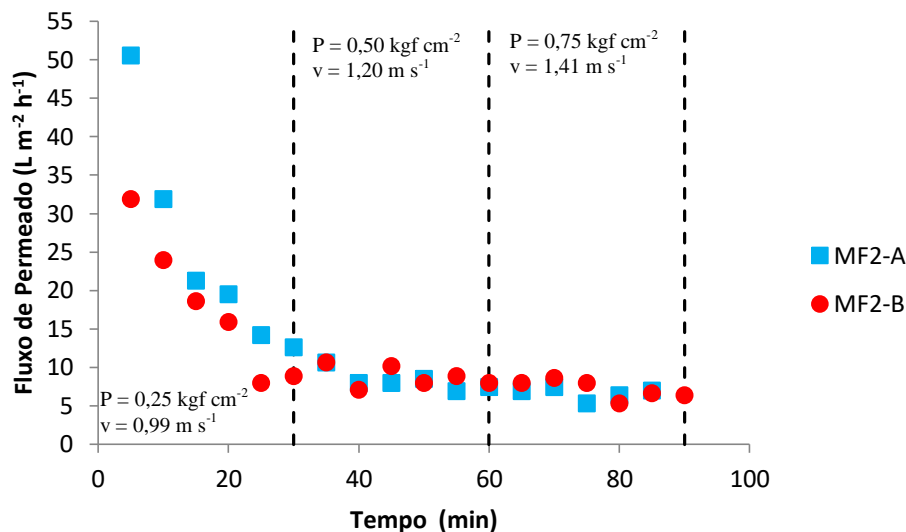


Figura 23. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de MF de 0,8 μm , solução de isolado proteico 6 % (m v^{-1}), velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.



Os gráficos apresentados nas Figuras 22 e 23 mostram que o fluxo de permeado para a solução de isolado proteico 6 % (m v^{-1}), independentemente da membrana utilizada, inicia o processo com um valor baixo, o que demonstra ocorrência do fenômeno de polarização por concentração. É observada, ainda, a queda do fluxo de permeado já na pressão de 0,25 kgf cm^{-2} , indicando que o *fouling* está acontecendo. Em relação à Figura 22, a diferença de fluxo de permeado observada durante os 30 min iniciais pode ter ocorrido devido a um baixo controle da velocidade de escoamento da solução, que acabou afetando o fluxo de permeado, além dos PSM apresentarem baixa repetibilidade. À medida que a pressão é aumentada, não é observado o aumento no fluxo de permeado como se esperava, pois o aumento da pressão aumenta a quantidade de solutos que chegam à superfície da membrana, o que pode intensificar ainda mais o fenômeno de polarização por concentração e *fouling*, causando, assim, um aumento da espessura dessa camada de solutos sobre a superfície da membrana e, conseqüentemente, a queda do fluxo de permeado.

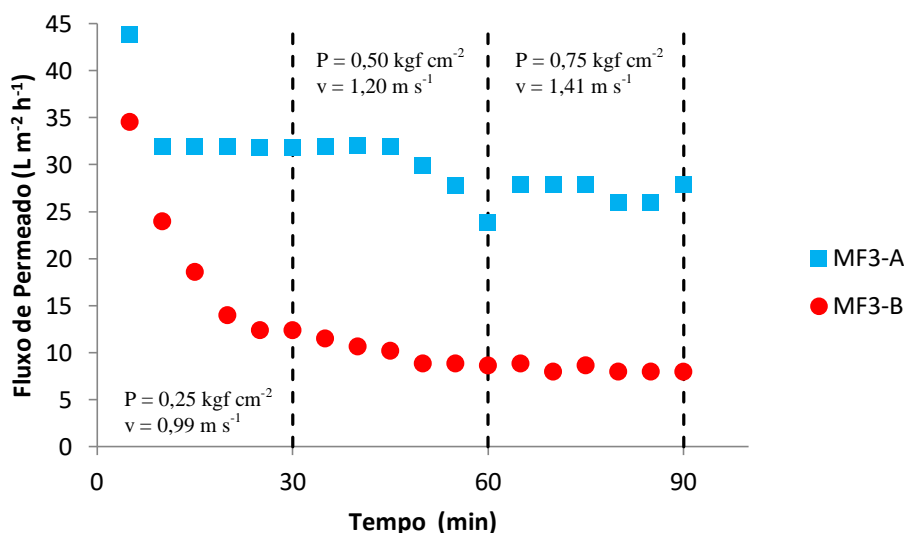
A partir da pressão de 0,5 kgf cm^{-2} , observou-se que o fluxo de permeado se estabilizou em 10 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ e 5 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$, aproximadamente, para as membranas de 0,05 μm e 0,8 μm , respectivamente, valores baixos devido aos fenômenos inerentes em PSM. O menor fluxo de permeado final observado para a membrana de 0,8 μm pode ter ocorrido devido ao

aumento da pressão forçar a passagem das proteínas para dentro dos poros desta membrana, uma vez que os seus poros são maiores que os da membrana de 0,05 μm . Como houve interação entre as proteínas, os agregados proteicos podem ter causado o bloqueio dos poros.

5.1.1.2. Solução de soro de leite

Como o fluxo de permeado da solução de isolado proteico 6 % (m v^{-1}) se mostrou muito baixo para as duas membranas de microfiltração testadas, decidiu-se avaliar se o mesmo aconteceria com a solução de soro de leite em pó 6 % (m v^{-1}), concentração próxima a do soro de leite *in natura*. A hipótese a ser avaliada aqui foi se o baixo fluxo de permeado estava acontecendo devido ao alto teor de proteína presente no isolado proteico do soro de leite, o qual contém cerca de 90 % de proteína, e que, conseqüentemente, estaria formando muitos agregados proteicos que estariam se depositando sobre a superfície da membrana. Como o soro de leite em pó utilizado contém um teor de proteína inferior, aproximadamente 11 %, haveria menos agregados proteicos se acumulando sobre a superfície da membrana e, talvez, um fluxo de permeado maior pudesse ser alcançado. A Figura 24 apresenta a determinação da pressão de operação utilizando solução de soro em pó 6 % (m v^{-1}).

Figura 24. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de MF de 0,8 μm e solução de soro de leite 6 % (m v^{-1}) com velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e na temperatura de 55 °C.



De acordo com a Figura 24, o fluxo de permeado também foi baixo ao utilizar a solução de soro de leite em pó 6 % (m v^{-1}). Embora o primeiro experimento (MF3-A) tenha apresentado um comportamento do fluxo de permeado mais estável, aproximadamente $32 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, na pressão de $0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$ observou-se uma pequena queda do fluxo, porém se estabilizando novamente por volta de $28 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. O experimento MF3-B apresentou comportamento similar ao das soluções de isolado proteico, evidenciando a ocorrência da polarização por concentração e *fouling* já na pressão mais baixa de $0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$ e apresentando um fluxo inferior a $15 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ após 30 min devido à intensificação desses fenômenos presentes em PSM. Com o aumento da pressão, observou-se ainda uma queda do fluxo de permeado em pressões mais elevadas, resultando em um fluxo de permeado inferior a $10 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ na pressão de $0,50 \text{ kgf cm}^{-2}$, o qual se manteve estável na pressão de $0,75 \text{ kgf cm}^{-2}$. Da mesma forma explicada anteriormente, a diferença de fluxo de permeado observada entre os dois experimentos pode ter ocorrido devido a um baixo controle da velocidade de escoamento da solução, além dos PSM apresentarem baixa repetibilidade.

Considerando que os resultados com a membrana de MF de $0,8 \mu\text{m}$ não foram adequados para a solução de soro de leite em pó, sendo os fluxos de permeado tão baixos quanto os obtidos ao utilizar a solução de isolado proteico, foi decidido não avaliar o comportamento da solução de soro de leite em pó utilizando a membrana de MF de $0,05 \mu\text{m}$. No entanto, por ter um tamanho de poro menor, a membrana de $0,05 \mu\text{m}$ dificultaria a entrada de proteína que formou agregados nos poros da membrana e, por isso, a membrana de $0,05 \mu\text{m}$ possibilitaria alcançar um fluxo de permeado um pouco maior, mas não alto o suficiente para realizar o processo. Com os resultados obtidos até aqui, fica evidente que essa solução não parece ser adequada para a realização do experimento com membrana de MF, seja pela presença dos agregados proteicos, seja pela interações eletrostáticas que ocorrem entre proteína-proteína ou proteína-membrana, necessitando de outra abordagem.

Para que a microfiltração possa ser utilizada como foi proposto neste trabalho, seria necessário avaliar uma membrana com área de filtração maior, bem como um sistema que permitisse atingir uma maior velocidade de escoamento da solução. Uma maior velocidade de escoamento poderia evitar que os agregados proteicos e outros solutos presentes na solução se acumulassem sobre a superfície da membrana ou que, pelo menos, o acúmulo deles sobre a

membrana fosse minimizado, possibilitando alcançar um fluxo de permeado maior para que o processo se tornasse viável. Devido ao baixo fluxo, a retenção das proteínas pela membrana não foi avaliada.

Toro-Sierra, Tolkach e Kulozik (2013) realizaram o fracionamento das proteínas ALA e BLG a partir do isolado do soro de leite na concentração de 15 % (m v⁻¹), em pH 3,4, presença de citrato e utilizando uma membrana de MF de 0,1 µm (posteriormente as correntes obtidas foram submetidas à UF) e conseguiram obter ambas as frações de proteína com pureza superior a 90 %. Embora o resultado seja muito bom, o trabalho desses pesquisadores não informa a performance do fluxo de permeado durante a MF. Contudo, os autores realizaram um processo interessante que talvez possa influenciar de forma positiva o processo: após a realização do aquecimento para formar os agregados de ALA, a solução foi deixada em repouso durante 24 h para que os agregados proteicos se tornassem maiores, podendo contribuir para a diminuição do *fouling*.

De acordo com Marshall, Munro e Tragardh (1993), a remoção de compostos de elevada massa molar, seja mediante pré-filtração, seja por outros meios, resulta numa melhora no fluxo de permeado tanto em UF como em MF. Os agregados de proteína podem potencialmente bloquear os poros maiores da membrana, resultando numa perda de fluxo de permeado desproporcional e, ainda, podendo atuar como iniciadores ou catalisadores para a formação de uma camada de proteínas na superfície da membrana, originando o *fouling*.

Diante dos resultados obtidos com o emprego da microfiltração e devido às limitações do sistema, foi decidido que a separação dos agregados proteicos deveria ser feita por meio de um processo que antecederesse o processo de separação por membranas. Dessa forma, optou-se por utilizar a centrifugação combinada com a ultrafiltração.

5.2. Centrifugação

A etapa envolvendo a centrifugação foi utilizada para separar as proteínas insolúveis que correspondem aos agregados proteicos formados durante o tratamento térmico, resultando em duas frações proteicas: uma no sedimento, o qual contém os agregados proteicos, e outra

no sobrenadante, o qual contém as proteínas que não formam agregados proteicos nessas condições. Na Tabela 16 são apresentados os resultados da concentração de proteínas em cada uma das frações obtidas após a centrifugação.

Tabela 16. Concentração de proteína e pH da solução de soro de leite em pó 6 % (m v^{-1}) e das frações obtidas, sobrenadante e sedimentado ressolubilizado, após a realização da formação de agregados proteicos e centrifugação.

Solução	Experimento A		Experimento B	
	Concentração de proteína (g L^{-1})*	pH**	Concentração de proteína (g L^{-1})*	pH**
Soro de leite 6 %	$6,9 \pm 0,3$	4,02	$6,6 \pm 0,4$	4,01
Sobrenadante	$3,7 \pm 0,2$	3,99	$3,8 \pm 0,3$	3,97
Sedimentado ressolubilizado	$1,5 \pm 0,3$	10,12	$1,5 \pm 0,2$	10,03

*Para a análise de concentração de proteína, foi utilizada a solução do soro de leite reconstituído em pH 6,35.

**Para análise de pH, foi utilizada a solução de soro de leite em pH em torno de 4,00 e presença de citrato de sódio.

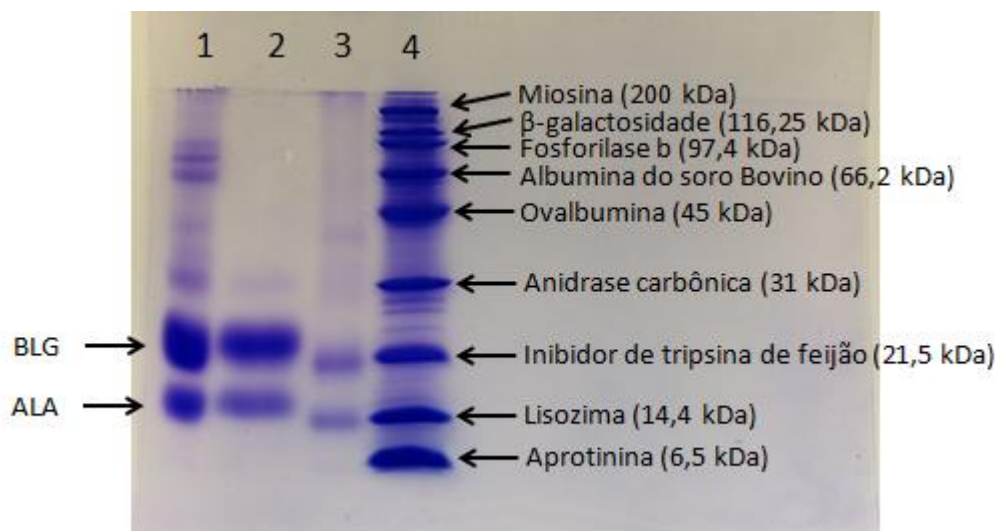
Conforme pode ser observado na Tabela 16, verifica-se que a maior parte das proteínas permaneceram no sobrenadante, representando cerca de 50 % das proteínas provenientes da solução de soro de leite. Quanto à concentração de proteína na fração sedimentada e ressolubilizada, cerca de 20 % das proteínas da solução de soro de leite 6 % (m v^{-1}) permaneceram nessa fração. No entanto, é possível que o teor no sedimentado ressolubilizado possa ser maior do que os valores apresentados, pois houve uma dificuldade em ressolubilizar a proteína sedimentada, mesmo com a adição de cloreto de cálcio e ajuste do pH para próximo de 10. Foi observada a presença de precipitado no fundo dos tubos contendo as amostras para análise e também de agregados proteicos ao agitar os tubos com o objetivo de homogeneizar a solução, dificultando a coleta das alíquotas para a análise. Segundo Chatterton (2001 *apud* CHATTERTON *et al.*, 2006), a complexação do cálcio da ALA causa uma alteração irreversível na sua estrutura, porém outros trabalhos afirmam se tratar de um processo reversível, como Bramaud, Aimar e Daufin (1997) e Toro-Sierra,

Tolkach e Kulozik (2013). De qualquer forma, a dificuldade observada em ressolubilizar essa fração proteica pode estar relacionada às condições empregadas neste trabalho.

No que diz respeito ao pH, a realização do aquecimento e centrifugação não causou alteração no valor do pH do sobrenadante quando comparado com a solução inicial de soro de leite. Como a fração que sedimentou precisou ser ressolubilizada, o que exigiu ajuste do pH, os valores de pH para essa fração diferiram bastante em relação à solução de soro de leite.

Como a concentração de proteínas se refere a todas as proteínas presentes na solução, a eletroforese das soluções foi realizada com o objetivo de verificar qualitativamente as proteínas presentes em cada fração obtida e é apresentada na Figura 25.

Figura 25. Resultados da análise de eletroforese para a solução inicial de soro de leite 6 % em pH 6,35 (sem pré-tratamento) e as diferentes frações obtidas após a agregação proteica e centrifugação: (1) soro do leite 6 % ($m v^{-1}$), (2) sobrenadante, (3) sedimentado ressolubilizado, (4) marcador de massa molar.



De acordo com o perfil eletroforético das soluções obtidas após a formação dos agregados proteicos e centrifugação, apresentado na Figura 25, pode ser observado que a BLG permaneceu principalmente no sobrenadante (2), mas sua presença também pode ser visualizada no sedimentado ressolubilizado (3), embora com uma banda de menor tamanho e intensidade. Como a BLG não é afetada pela adição de agente complexante de cálcio, sua presença no sedimentado pode ter ocorrido devido ao aprisionamento dessa proteína durante a

formação dos agregados proteicos de ALA. Em relação à ALA, o pré-tratamento não promoveu uma boa separação, já que ela pode ser visualizada tanto no sobrenadante como no sedimentado ressolubilizado e isso pode ter acontecido devido à quantidade de citrato utilizada ter sido insuficiente para complexar todo o cálcio presente na solução de soro de leite. Além disso, não foi possível visualizar a presença do CMP, que, caso fosse possível visualizá-lo na análise de eletroforese, deveria aparecer na parte inferior do gel, abaixo da ALA, assim como também não foi possível visualizar as proteínas BSA e Igs nas raias 2 e 3 na parte superior do gel, sendo possível verificar a presença de BSA (66 kDa) somente na raia 1. Conforme o estudo realizado por Fernández *et al.* (2011), a BLG, assim como o CMP, duas das proteínas majoritárias do soro de leite doce, permaneceram principalmente na fração correspondente ao sobrenadante ao realizar esse mesmo tratamento em pH 4, enquanto que as proteínas BSA e Igs coprecipitaram juntamente com a ALA, sendo ainda observado que quanto maior a concentração inicial de proteína, maior a concentração das proteínas BLG e CMP na fração sedimentada devido ao aprisionamento delas nos agregados proteicos de ALA. Em relação às proteínas de maior massa molar, BSA e Igs, conforme os trabalhos de Bramaud, Aimar e Daufin (1997) e Fernández *et al.* (2011), foi observado que a BSA e Igs coprecipitaram juntamente com a ALA sedimentada.

Toro-Sierra, Tolkach e Kulozik (2013) observaram que quanto maior a concentração de citrato para realizar a formação de agregados proteicos de ALA em meio ácido, maior é a redução da concentração final da ALA da solução e mais rapidamente a concentração dessa proteína é reduzida da solução.

Em relação a cada solução obtida com o tratamento realizado, o aspecto visual de cada uma é apresentado na Figura 26 em comparação com a solução de soro de leite.

Figura 26. Aspecto visual das soluções de soro de leite 6 % (m v^{-1}) em pH 6,35 (sem pré-tratamento), sedimentado, ressolubilizado e sobrenadante.



A Figura 26 apresenta a diferença existente entre cada uma das soluções devido à diferente composição relativa das proteínas e, possivelmente, a outros componentes do soro de leite. A solução de soro de leite 6 % apresenta aspecto opaco e cor amarelada. Ao ressolubilizar a fração sedimentada, verificou-se uma mudança na coloração da solução, passando a apresentar uma coloração branca semelhante a cor do leite. O sobrenadante, por sua vez, apresentou cor amarelo-esverdeada com aspecto translúcido. Na Tabela 15, são apresentados os valores de turbidez de cada uma das soluções.

Tabela 17. Resultados de turbidez para as soluções de soro de leite 6 % (m v^{-1}), sobrenadante e sedimentado ressolubilizado.

Solução	Turbidez (NTU)	
	Experimento A	Experimento B
Solução de soro de leite 6 %	> 917	> 917
Sobrenadante	148	160
Sedimentado ressolubilizado	> 917	> 917

Em relação à turbidez apresentada na Tabela 17, tanto a solução de soro de leite 6 %, como o sedimentado ressolubilizado apresentaram valores superiores ao valor máximo do padrão utilizado na calibração do turbidímetro (> 917 NTU), ao passo que o sobrenadante apresentou valores de 148 e 160 NTU para os experimentos A e B, respectivamente. Um valor de turbidez menor é um indicativo de que a ocorrência de *fouling* na membrana será menor durante a realização da ultrafiltração e, conseqüentemente, o fluxo de permeado diminuirá mais lentamente. Além disso, em futuras aplicações em escala industrial, a área de membrana poderá ser menor e a frequência da limpeza química reduzida, minimizando o uso de produtos químicos e aumentando o tempo de vida útil da membrana.

5.3. Ultrafiltração

A ultrafiltração do sobrenadante e do sedimentado ressolubilizado foi realizada partindo da determinação da pressão de operação e da escolha do melhor pH, simultaneamente, para realizar a concentração e purificação das proteínas. Também foi realizado o experimento com a solução de soro de leite 6 % a fim de compará-lo com os resultados obtidos para as demais soluções. Os gráficos dos experimentos de compactação das membranas e determinação da permeância hidráulica são apresentados no Apêndice A (a partir da Figura A7).

5.3.1. Determinação da pressão de operação

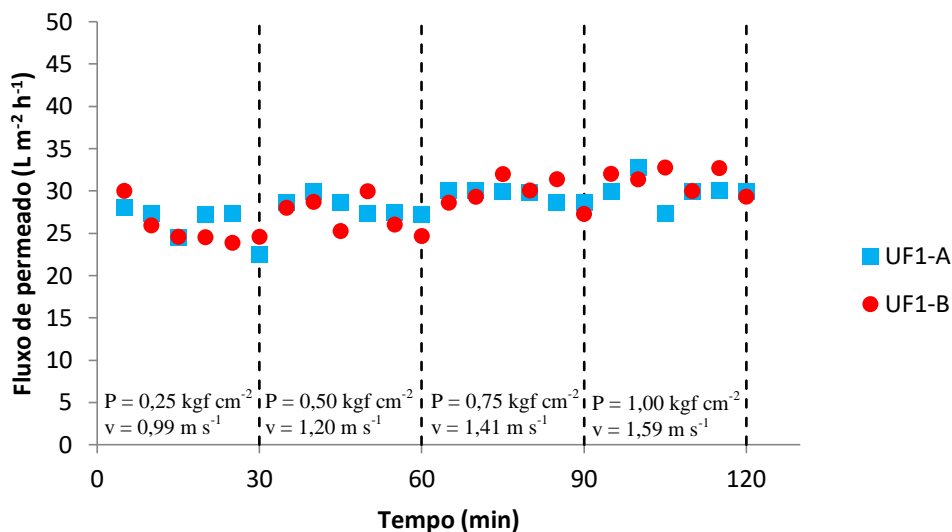
A seguir são apresentados os resultados da determinação da pressão de operação mediante a utilização da membrana de UF de 5 kDa para as diferentes soluções contendo proteínas utilizadas neste trabalho.

5.3.1.1. Solução de soro de leite

Para o processo de UF com a solução de soro de leite em pó 6 %, a pressão de

operação foi determinada em experimentos de medidas de fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões aplicada, conforme é apresentado na Figura 27.

Figura 27. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução de soro de leite 6 % (m v^{-1}), velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.



De acordo com a Figura 27, ao utilizar a solução de soro de leite sem adição de qualquer reagente ou ajuste de pH, foi observado que o fluxo de permeado apresentou um comportamento estável independente da pressão aplicada, mantendo-se ao redor de $30 \text{ L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ e, dessa forma, a pressão de $0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$ se mostrou a mais adequada para realizar o experimento de concentração a fim de avaliar a comportamento do fluxo de permeado.

5.3.1.2. Solução sobrenadante

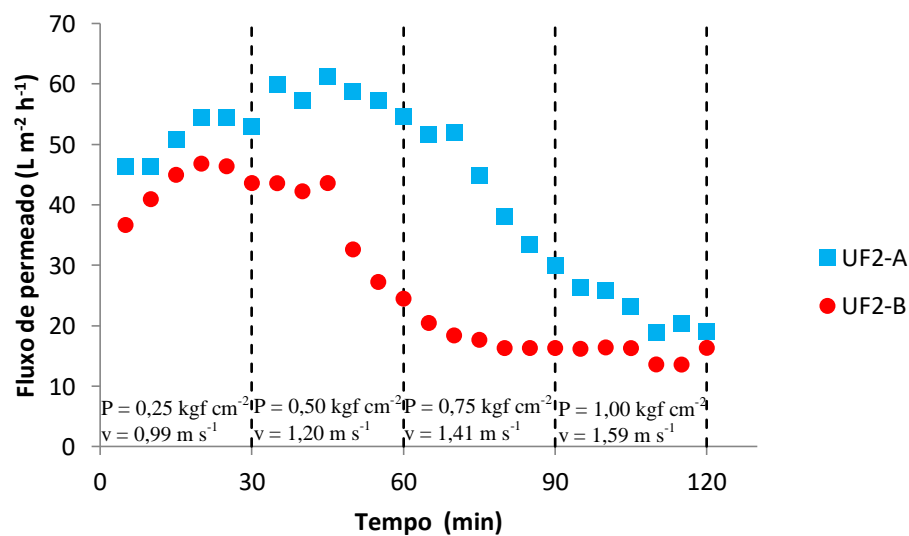
Inicialmente, decidiu-se trabalhar com o sobrenadante, pois essa fração contém as proteínas já solubilizadas e necessita apenas de ajuste do pH, simplificando a realização dos experimentos. A determinação da pressão de operação do sobrenadante foi feita para os pH 3, 4, 7 e 10. Dessa forma, poderia ser verificada a melhor pressão para cada condição de pH e

realizar a ultrafiltração somente no pH e pressão que o fluxo de permeado se mostrasse mais elevado.

- **Sobrenadante pH 4**

A determinação da pressão de operação no processo de UF para o sobrenadante em pH 4, ou seja, sem necessidade de qualquer ajuste após a centrifugação, é apresentada na Figura 28.

Figura 28. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 4, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.



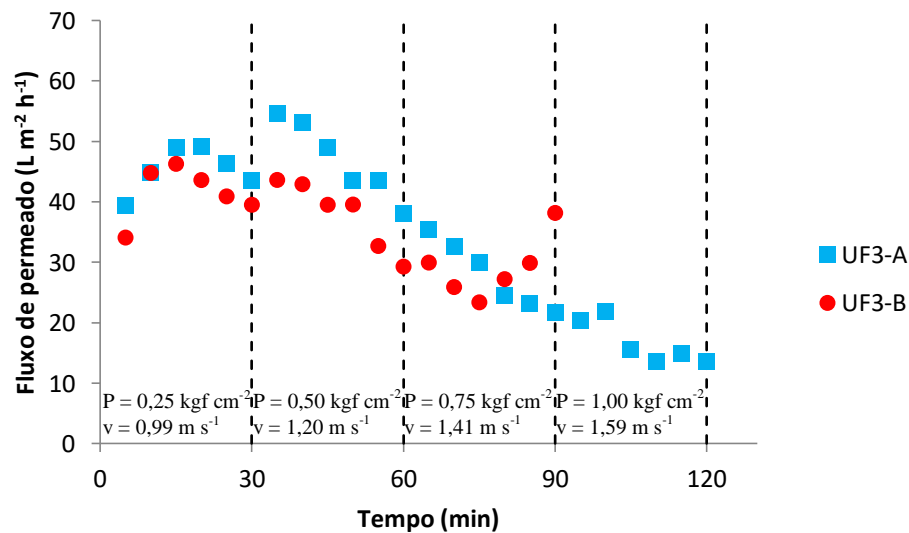
A análise da Figura 28 mostra que o fluxo de permeado aumentou ao longo do experimento na pressão de 0,25 kgf cm⁻². Ao passar para a pressão de 0,50 kgf cm⁻², foi observado um comportamento relativamente estável do fluxo de permeado para o experimento UF2-A e queda do fluxo para o experimento UF2-B. A partir da pressão de 0,75 kgf cm⁻², o fluxo de permeado do experimento UF2-A começou a diminuir. Dessa forma, pode-se verificar que a polarização por concentração foi intensificada nas pressões de 0,50 kgf cm⁻² e 0,75 kgf cm⁻², além de *fouling* ter ocorrido devido à queda acentuada do fluxo

e, por isso, a pressão de $0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$ foi considerada a mais adequada para concentrar as proteínas do sobrenadante em pH 4,0.

• Sobrenadante pH 3

O mesmo procedimento foi realizado para a solução sobrenadante em pH 3, o qual foi ajustado por meio da adição de ácido cítrico após a centrifugação. A determinação da pressão de operação do processo de UF para esse pH é apresentada na Figura 29.

Figura 29. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 3, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$.



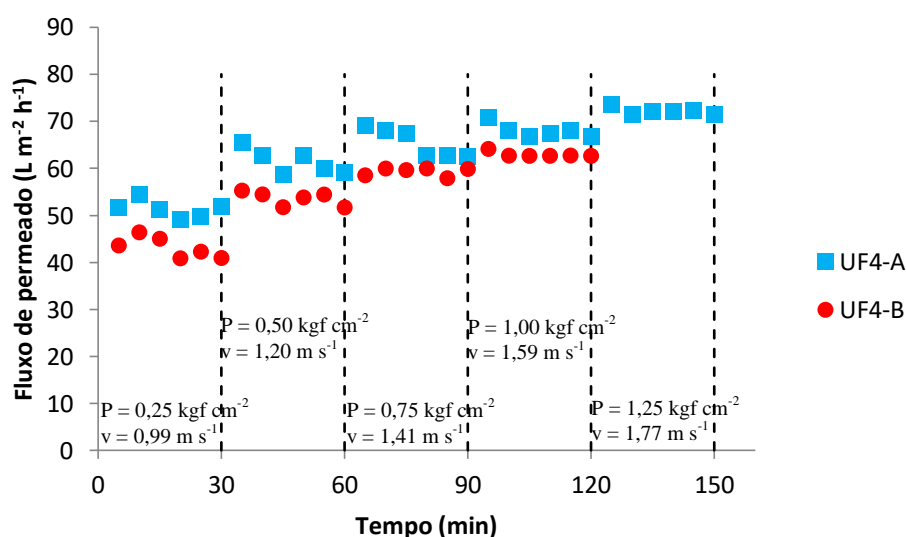
Conforme a Figura 29, foi observado que a polarização por concentração ocorre a partir da pressão de $0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, sendo caracterizada pelo baixo fluxo de permeado e também por sua queda, que já inicia entre 15 e 20 min de experimento. A queda do fluxo de permeado fica evidente a partir da pressão de $0,50 \text{ kgf cm}^{-2}$ possivelmente devido ao *fouling* já estar ocorrendo. Ao realizar o experimento UF3-B, embora seja observada uma tendência de aumento do fluxo de permeado ao final da pressão de $0,75 \text{ kgf cm}^{-2}$, ao passar para a pressão de $1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$, foi observada a ausência de fluxo de permeado após os primeiros 5 minutos nessa pressão para realizar a medida do fluxo e, por isso, foi decidido finalizar o

experimento, pois a continuação do experimento nessa pressão poderia agravar o *fouling* e dificultar a limpeza da membrana. De qualquer forma, a pressão de operação para a realizar a ultrafiltração utilizando o sobrenadante em pH 3,0 deveria ser $0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, condição em que foi registrado um fluxo entre 40 e $45 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, aproximadamente, após 30 minutos de experimento.

• Sobrenadante pH 7

Os resultados do fluxo permeado para determinar a pressão de operação da solução sobrenadante em pH 7, ajustado com hidróxido de sódio após a centrifugação, é apresentado na Figura 30.

Figura 30. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 7, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$.



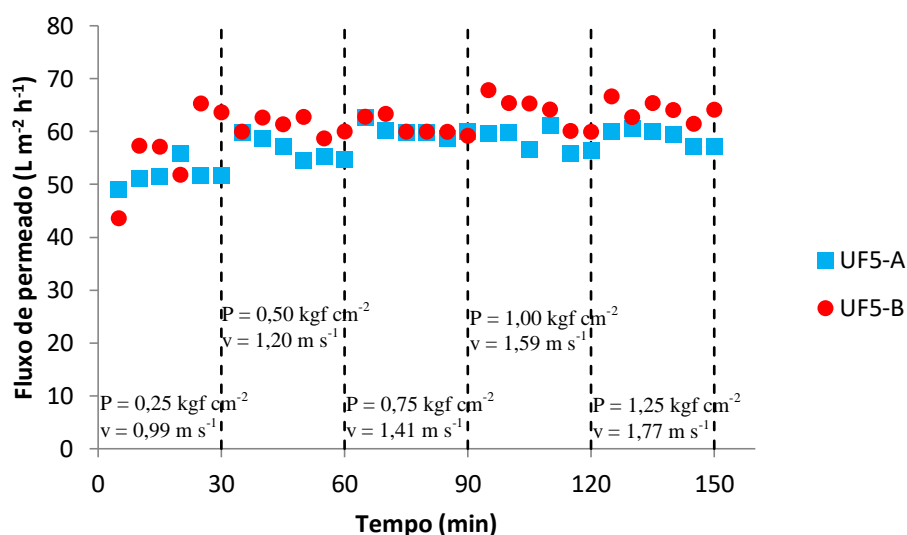
Ao determinar a pressão de operação do sobrenadante em pH 7, conforme a Figura 30, foi verificado um aumento do fluxo de permeado à medida que a pressão foi aumentada, além de um comportamento mais estável em cada pressão quando comparado aos experimentos anteriores. Em relação ao experimento UF4-B, não foi avaliado o comportamento do fluxo de permeado na pressão de $1,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, pois, após a realização do experimento UF4-A, foi

verificada uma dificuldade em recuperar o fluxo normal da membrana após a realização da limpeza utilizando o protocolo adotado, exigindo repetição do procedimento de limpeza para que o fluxo fosse recuperado. Para a realização do experimento com essa solução, a pressão de $1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$ pode ser utilizada já que não é observada a ocorrência de polarização por concentração ou *fouling* intensos como observado para os valores de pH testados anteriormente. Nessa condição, foi verificado um fluxo de permeado entre 60 e $70 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

• Sobrenadante pH 10

Na Figura 31 estão apresentados os resultados de fluxo permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação no experimento de UF para a determinação da pressão de operação da solução sobrenadante em pH 10, o qual foi ajustado com hidróxido de sódio após a centrifugação.

Figura 31. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução sobrenadante em pH 10, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$.



De acordo com a Figura 31, verificou-se que a solução sobrenadante em pH 10 não apresentou queda do fluxo de permeado à medida que a pressão foi aumentada, mostrando uma polarização por concentração pouco intensa. Entretanto, a partir da pressão de

0,50 kgf cm⁻², o fluxo apresenta um comportamento estável de aproximadamente 60 L m⁻² h⁻¹, o que demonstra que a pressão crítica possivelmente foi atingida. Dessa forma, ao trabalhar com sobrenadante em pH 10, a pressão mais adequada parece ser a de 0,50 kgf cm⁻², já que não se observou incremento no fluxo com aumento da pressão. Além disso, conforme a solução será concentrada, os fenômenos de polarização por concentração e *fouling* tenderão a ser intensificados, podendo formar uma camada mais compacta de proteína sobre a membrana, dificultando tanto a remoção de compostos de baixa massa molar como a limpeza posterior.

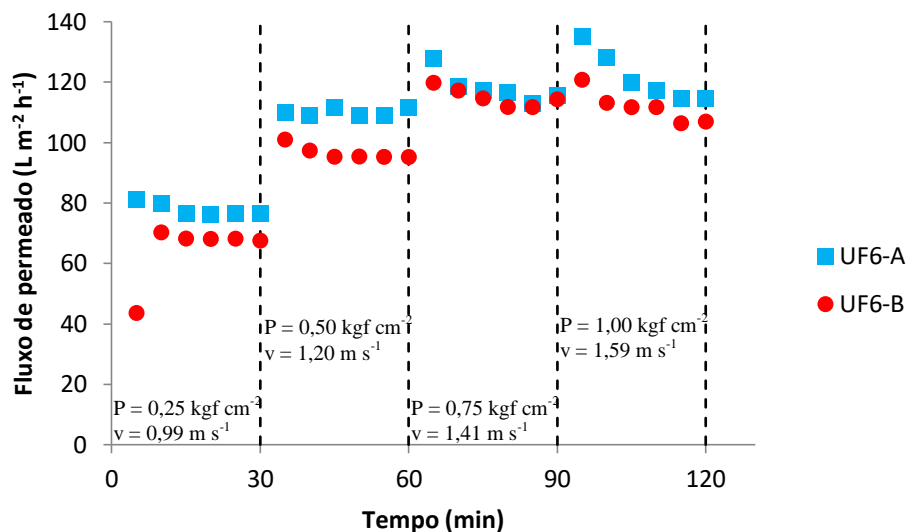
Diante dos resultados obtidos ao avaliar o efeito da pressão e do pH sobre o fluxo de permeado, duas condições foram escolhidas: pH 4 e pH 10. Embora o pH 4 não tenha apresentado um comportamento satisfatório em relação ao fluxo de permeado, sendo, inclusive, inferior ao observado para o sobrenadante em pH 7, ele corresponde à situação em que o sobrenadante não necessita ter o pH ajustado, diminuindo o consumo de reagentes e uma etapa a menos no processo. Ainda, como os agregados proteicos foram eliminados na etapa de centrifugação, seria possível avaliar se o baixo fluxo de permeado se deveria a esses agregados proteicos ou às interações eletrostáticas que ocorrem devido ao pH do meio. Por outro lado, o sobrenadante em pH 10 foi escolhido por ter apresentado um fluxo de permeado superior aos demais. Além disso, ao realizar a diafiltração utilizando água destilada como solvente para lavagem das proteínas que serão concentradas e purificadas, o pH diminuirá devido ao pH levemente ácido da água. Como o pH 7 também apresentou um fluxo de permeado adequado para o processo, decidiu-se avaliar a hipótese de que o fluxo se manteria elevado nessa faixa de pH, tornando o processo mais rápido, mesmo que isso implique em um maior gasto de hidróxido de sódio para elevar o pH até 10.

5.3.1.3. Solução de sedimentado ressolubilizado

Com os resultados obtidos para o sobrenadante e a necessidade de elevar o pH para ressolubilizar as proteínas presentes no sedimentado, foi decidido realizar o experimento com essa fração apenas em pH 10. Os resultados de fluxo permeado em função da pressão para

diferentes intervalos de tempo utilizados para a determinação da pressão de operação estão apresentados na Figura 32.

Figura 32. Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes pressões de operação para o experimento com a membrana de UF de 5 kDa, solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10, velocidade de escoamento máxima alcançada em cada pressão e temperatura de 55 °C.



De acordo com os dados da Figura 32, o sedimentado ressolubilizado apresentou aumento do fluxo de permeado conforme a pressão foi aumentada, porém foi verificada uma leve queda do fluxo na pressão de $0,75 \text{ kgf cm}^{-2}$. Na pressão de $1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$, a queda do fluxo de permeado se tornou mais evidente, apresentando um valor próximo aos observados no fim do experimento com a pressão de $0,75 \text{ kgf cm}^{-2}$. Com base nesses resultados, foi decidido operar na pressão de $0,50 \text{ kgf cm}^{-2}$, em que foi observado um fluxo entre 95 e $110 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, aproximadamente, pois embora tenha ocorrido o aumento do fluxo após essa pressão, foi verificada uma leve queda e, da mesma forma que foi explicado para o sobrenadante, à medida que a solução será concentrada, os fenômenos que causam a queda do fluxo do permeado podem ser intensificados, reduzindo a eficiência do processo de separação e recuperação do fluxo de permeado após a limpeza da membrana.

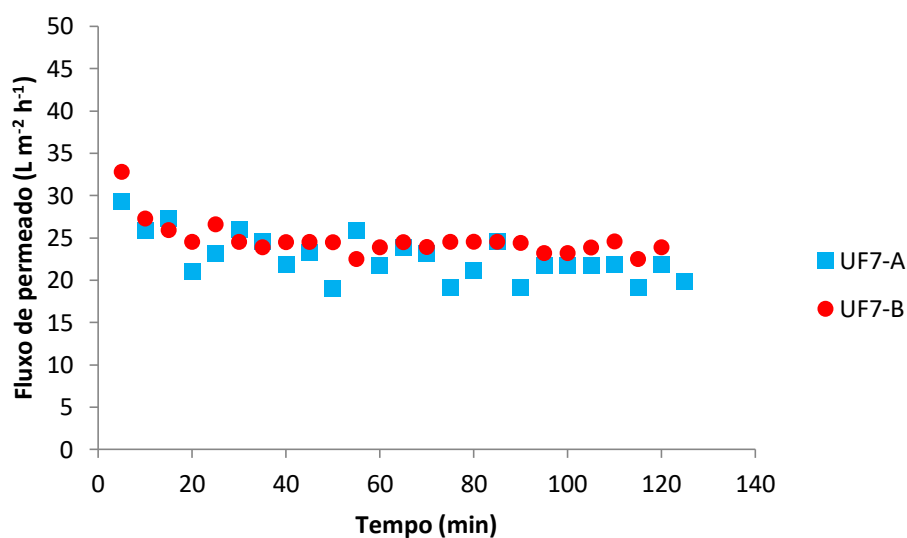
5.3.2. Concentração

A seguir é apresentado o comportamento do fluxo de permeado para cada uma das soluções que apresentaram os melhores valores de fluxo de permeado (sobrenadante em pH 10 e sedimentado ressolubilizado em pH 10), além da solução de soro de leite 6 % e sobrenadante em pH 4.

5.3.2.1. Soro de leite

A solução de soro de leite em pó 6 % (m v^{-1}) foi concentrada com o objetivo de verificar o comportamento do fluxo de permeado sem a realização do pré-tratamento ou ajuste de pH, e o resultado desse experimento é apresentado na Figura 33.

Figura 33. Comportamento do fluxo de permeado em função do tempo durante a UF da solução de soro de leite em pó 6 % (m v^{-1}), utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.



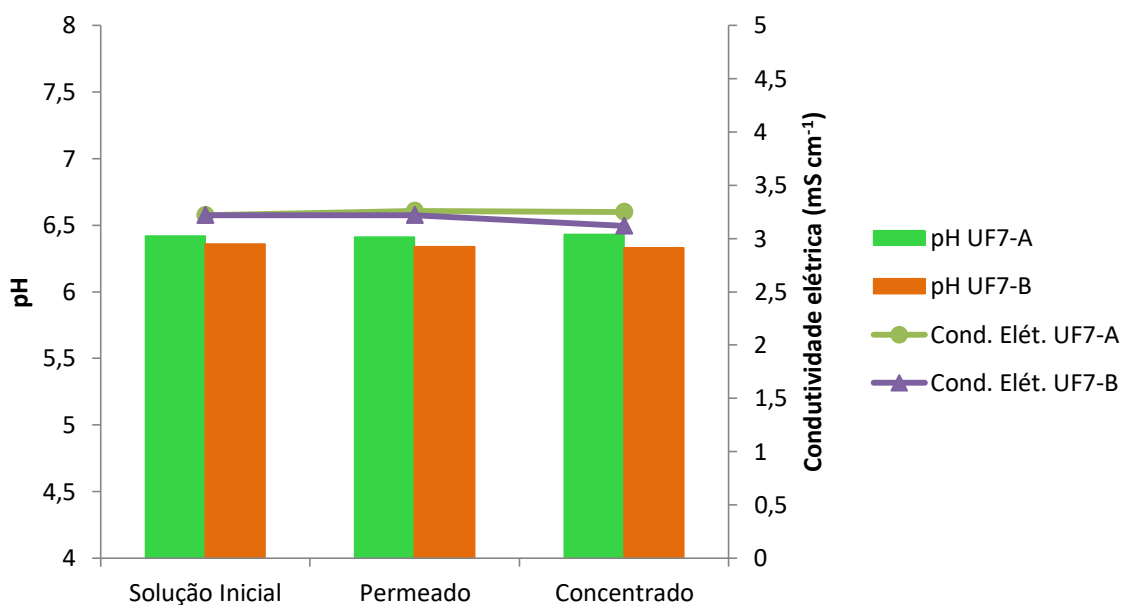
Pela análise da Figura 33, uma leve queda do fluxo de permeado pode ser observada no início do experimento, a qual pode ser explicada pelo depósito de solutos que ocorre sobre a superfície da membrana logo que a pressão é aplicada, caracterizando o fenômeno de polarização por concentração. Contudo, à medida que a solução é concentrada, observa-se que

o fluxo de permeado se mantém estável, variando entre 20 e 25 L m⁻² h⁻¹, demonstrando que para essa solução, embora a polarização por concentração seja evidente pelo baixo fluxo de permeado, a extensão do processo não evidencia a ocorrência de *fouling*. Caso o *fouling* estivesse ocorrendo, seria observada uma queda contínua do fluxo de permeado.

Para fins de comparação, o comportamento do fluxo de permeado ao longo da concentração e purificação das proteínas presentes nas frações obtidas após a centrifugação (sobrenadante em pH 4 e 10, e sedimentado ressolubilizado em pH 10) será apresentado juntamente com o fluxo de permeado da solução de soro de leite.

No que diz respeito ao pH e à condutividade elétrica, os resultados das análises para cada corrente obtida em comparação com a solução inicial são apresentados na Figura 34

Figura 34. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução de soro de leite em pó 6 % (m v⁻¹) e das diferentes correntes obtidas após a UF utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.



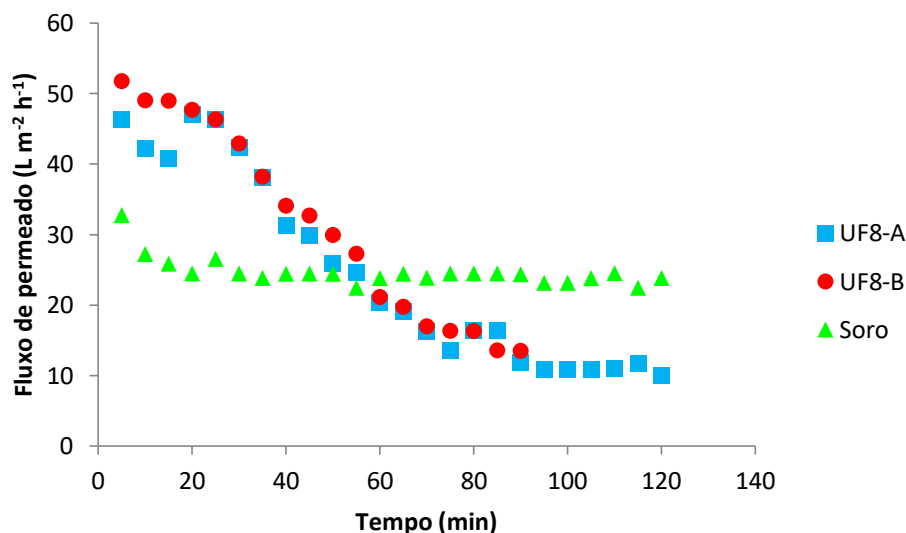
De acordo com os dados da Figura 34, as análises de pH e condutividade elétrica das diferentes correntes mostram que a membrana é permeável aos íons presentes na solução uma vez que o permeado e o concentrado apresentaram os mesmos valores que foram registrados para a solução inicial. Dessa forma, pode ser verificado que na solução de soro de leite em pH

6,35, as proteínas que se concentram próximas à superfície da membrana – polarização por concentração – não estão impedindo a passagem dos íons durante a UF.

5.3.2.2. Solução sobrenadante em pH 4

O comportamento do fluxo de permeado da solução sobrenadante em pH 4 é apresentado na Figura 35.

Figura 35. Comportamento do fluxo de permeado em função do tempo durante a UF da solução sobrenadante em pH 4 (UF8-A e UF9-B) em comparação com a solução de soro de leite 6 % ($m v^{-1}$), utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.



Ao realizar a concentração do sobrenadante em pH 4, observa-se que, inicialmente, a solução apresentou um fluxo de permeado superior ao da solução de soro de leite, porém, à medida que o sobrenadante foi concentrado, o fluxo de permeado diminuiu e, após 60 minutos de experimento atingiu um valor inferior ao observado para a solução de soro de leite. Pela análise do comportamento do fluxo de permeado do sobrenadante em pH 4, fica evidente a ocorrência de *fouling*, demonstrando que apesar do sobrenadante apresentar uma concentração de proteína inferior à da solução de soro de leite, devido ao pH 4 utilizado para realizar a ultrafiltração, as proteínas podem estar interagindo entre si (interação proteína-proteína) e se acumulando sobre a membrana ou interagindo com a membrana (interação proteína-membrana), dificultando a permeação da solução pela membrana. Além disso, essas

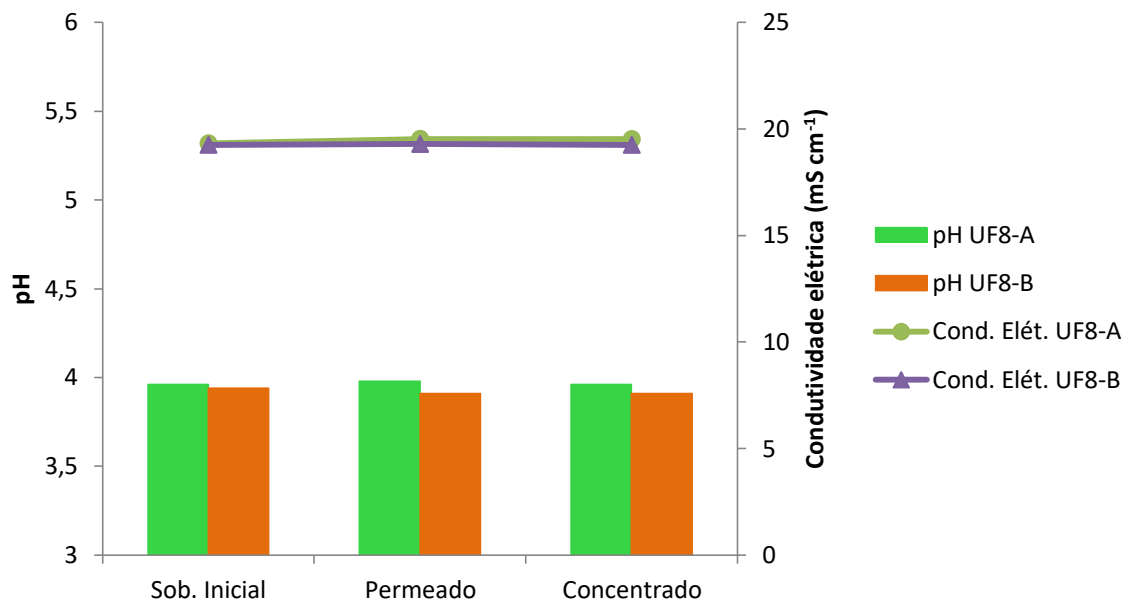
interações podem ter sido intensificadas conforme a solução foi concentrada, afetando o fluxo de permeado de forma negativa, visto que, após 80 minutos de experimento, o fluxo é 80 % inferior ao fluxo observado inicialmente para o sobrenadante. Próximo ao fim do experimento, o fluxo de permeado do sobrenadante se estabiliza em torno de $10 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, mas ainda assim um valor muito baixo para a realização do processo.

Nigam, Bansal e Chen Mayank Omprakash (2008), verificaram que o fluxo de permeado de uma solução contendo 1 % de concentrado proteico de soro de leite foi maior do que o fluxo da solução contendo 2 % do mesmo concentrado, mas, em ambos os casos, foram inferiores ao fluxo de permeado da solução contendo 3 % do concentrado proteico. Quando a concentração da solução foi mais elevada, as interações intermoleculares foram afetadas de tal modo que a deposição sobre a membrana foi menor, resultando no maior fluxo para a solução de maior concentração. Além disso, embora uma solução de concentração mais elevada proporcione maior força motriz para a formação de depósitos sobre a membrana, ela também aumenta a viscosidade da solução que auxilia na remoção dos depósitos que se formam na superfície da membrana através de forças hidrodinâmicas.

Almécija *et al.* (2007) avaliaram o fluxo de permeado para o soro de leite em diferentes valores de pH e relataram que os menores valores de fluxo de permeado ocorreram em pH 4 e 5, faixa de pH em que as proteínas majoritárias do soro de leite, BLG e ALA, além da proteína BSA, estão próximas de seus pontos isoelétricos. Nesse ponto, as proteínas encontram-se essencialmente sem carga, predominando a ocorrência de *fouling* devido à deposição de agregados dessas proteínas, possivelmente explicando a diminuição acentuada do fluxo de permeado durante a maior parte do processo. Ainda de acordo com os mesmos pesquisadores, um fluxo de permeado estável também foi alcançado perto do fim do processo, provavelmente devido às forças cisalhantes da corrente de concentrado sobre a membrana.

As análises de pH e de condutividade elétrica durante o processo de ultrafiltração do sobrenadante em pH 4 são apresentados na Figura 36 e possibilitam verificar se a membrana causou retenção de íons.

Figura 36. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução sobrenadante em pH 4 e das diferentes correntes obtidas após a UF utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$.



Em relação aos valores de pH e condutividade elétrica, pode ser observado na Figura 36 que esses parâmetros foram mantidos constantes, demonstrando que a retenção para os íons de pequeno tamanho presentes na solução é praticamente nula, sendo esse comportamento o mesmo observado para a solução de soro de leite 6 %. Além disso, mesmo que tenha ocorrido o acúmulo de proteínas sobre a membrana e interações entre proteínas e membrana, a passagem dos íons não foi afetada, possivelmente pelo fato da camada de proteína na superfície não estar muito compactada em razão da baixa pressão utilizada no processo.

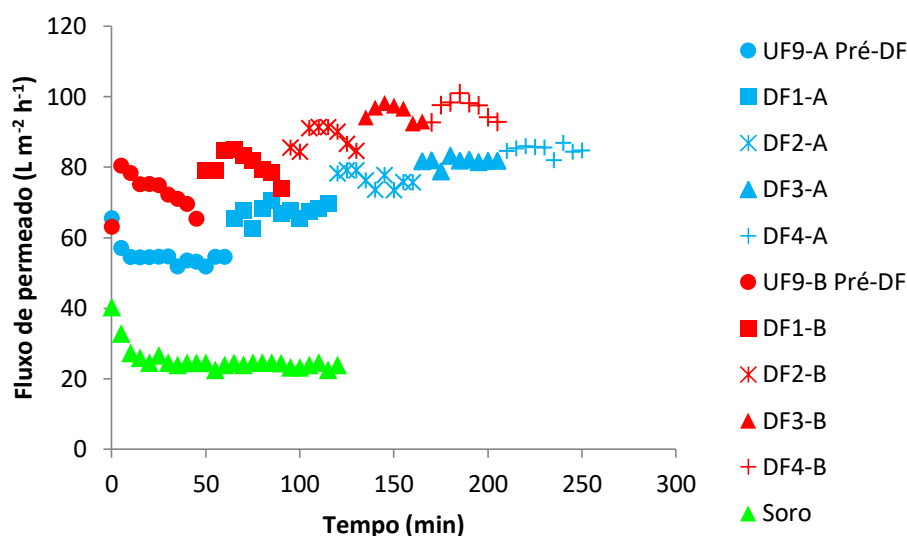
Como o fluxo de permeado ao trabalhar com o sobrenadante em pH 4 foi baixo, além de mostrar que o *fouling* é favorecido nessa condição, a diafiltração não foi realizada, pois a adição de água aumentaria o pH para a faixa entre 4 e 5, região em que predomina o ponto isoelétrico das proteínas BLG, ALA e BSA. Além disso, segundo Nigam, Bansal e Chen (2008), o *fouling* se manifesta economicamente sob a forma de perda de produtividade devido à redução da eficiência do processo, aumento do custo dos produtos para limpeza e problemas de contaminação devido ao crescimento de micro-organismos, justificando, no caso do

sobrenadante em pH 4 do presente trabalho, a interrupção do processo após coletar 200 mL de permeado.

5.3.2.2. Solução sobrenadante em pH 10

O comportamento do fluxo de permeado do sobrenadante em pH 10 durante o processo de UF/DF é apresentado na Figura 37.

Figura 37. Comportamento do fluxo de permeado durante a UF /DF (5 kDa) do sobrenadante em pH 10 (UF9-A e UF9-B), nas condições de $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ °C}$ comparado com o fluxo de permeado durante a UF da solução de soro de leite 6 % em pH 6,35 (UF7-B), nas condições de $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ °C}$.



Conforme se observa na Figura 37, a realização da UF do sobrenadante em pH 10 apresentou fluxo de permeado superior ao do soro de leite 6 % (m^{-1}), sendo cerca de 3 vezes maior antes de iniciar a diafiltração. Observa-se ainda que ao realizar a diafiltração, à medida que água foi adicionada, o fluxo de permeado aumentou, confirmando não apenas a hipótese levantada ao escolher o pH 10 em vez do pH 7 de que o fluxo se manteria alto nessa faixa de pH, como também mostrando esse comportamento incomum em PSM, uma vez que a tendência é o fluxo de permeado diminuir conforme o processo avança em decorrência do *fouling*, o qual é agravado pelo aumento da concentração da solução. Como a redução do

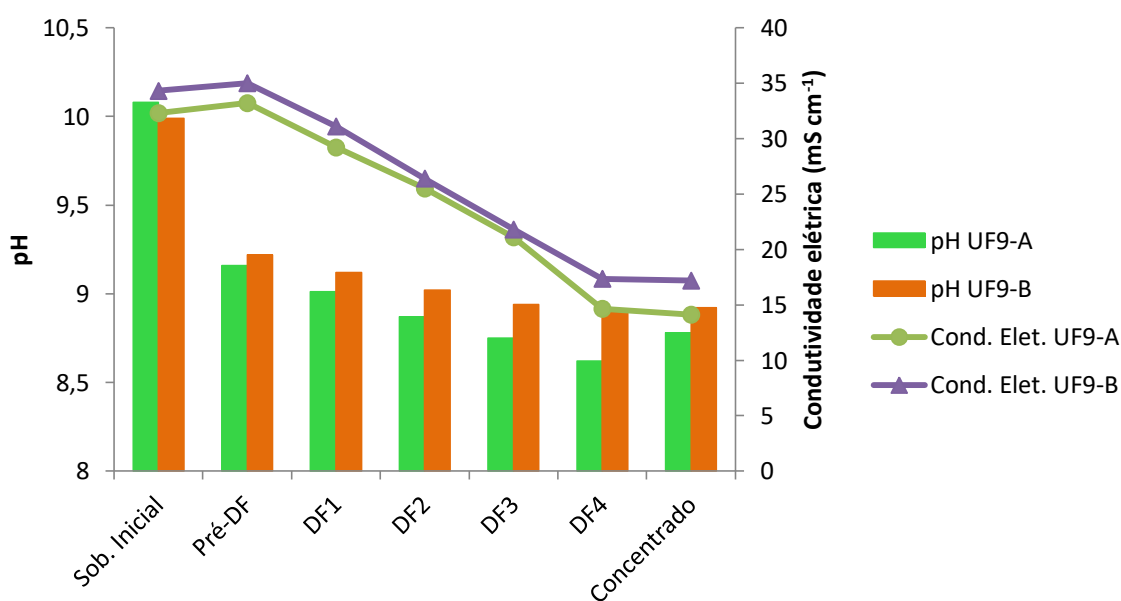
fluxo de permeado é um dos fatores limitantes em PSM, tanto do ponto de vista técnico como econômico, o comportamento observado mostra que é interessante realizar o processo com o pH inicial do sobrenadante ajustado em 10.

Almécija *et al.* (2007) também observaram um fluxo de permeado para o soro de leite em pH 10 com o mesmo comportamento ascendente durante o PSM. De acordo com esses pesquisadores, no pH 10, tanto as proteínas como a membrana cerâmica apresentam carga negativa, fazendo com que o *fouling* não seja favorecido por causa da repulsão eletrostática.

De acordo com Marshall, Munro e Tragardh (1993), a operação com uma membrana de carga semelhante à da proteína pode aumentar o fluxo de permeado se a polarização por concentração for minimizada e, ao utilizar membranas de tamanho de poros maiores, pode ser possível obter uma maior seletividade da proteína.

Na Figura 38 estão apresentados os valores de pH e de condutividade elétrica das diferentes correntes obtidas durante processo de concentração operando no modo diafiltração.

Figura 38. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução sobrenadante em pH 10 e das diferentes correntes obtidas após a UF/DF utilizando membrana de 5 kDa nas condições de $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.



Conforme os resultados de pH da Figura 38, observa-se que o pH do permeado Pré-DF é inferior ao do sobrenadante inicial (Sob. Inicial) antes mesmo de iniciar a diafiltração, porém era esperado que o pH fosse o mesmo. Isso pode estar relacionado a um efeito tamponante das proteínas retidas ou a uma possível repulsão eletrostática que ocorreu entre os íons OH^- e a membrana que pode ter adquirido carga negativa no pH 10, fazendo com que esses íons, mesmo com tamanho inferior ao tamanho dos poros da membrana, fossem retidos parcialmente pela membrana. Ao final do experimento UF9-B, o pH do concentrado é bastante próximo do permeado DF4, o que pode ter ocorrido devido a uma redução da carga adquirida pela membrana ao adicionar água para realizar a diafiltração, diminuindo os efeitos de repulsão eletrostática entre a membrana e os íons OH^- , porém ainda existindo diferença de pH entre o permeado DF4 e o Concentrado do experimento UF9-A. Com a realização de uma concentração e mais quatro diafiltrações, todas de 250 mL, foi possível reduzir o pH de 10,08 e 9,99 (Sob. Inicial) para 8,78 e 8,92 (Concentrado), respectivamente, para os experimentos UF9-A e UF9-B.

Shao e Zydney (2004) avaliaram a retenção de pequenas impurezas carregadas durante a ultrafiltração e verificaram que moléculas de tamanhos inferiores aos tamanhos dos poros da membrana foram retidas pela membrana com carga de mesma natureza da impureza devido à repulsão eletrostática. Essa exclusão eletrostática, no entanto, foi observada quando a força iônica da solução foi baixa, uma vez que maior concentração de íons na solução anula o efeito da exclusão eletrostática.

Em relação ao possível efeito tamponante das proteínas, de acordo com Christensen (1966), um tampão refere-se à minimização da alteração do pH quando é adicionado um ácido ou uma base, e cerca de um terço dos resíduos de aminoácidos contribuem com grupos tituláveis. No caso da BLG, os grupos tituláveis são indentificados como grupos carboxílicos na região ácida, imidazol e grupos amino terminais na região intermediária de pH, e entre pH 8,5 e 11,5 são indentificados os grupos aminos, fenólicos e sulfídricos da cadeia lateral dos aminoácidos.

No que diz respeito à condutividade elétrica apresentada na Figura 38, verifica-se que a remoção de sais ocorre de forma linear ao decorrer do processo, sendo esse comportamento observado ao analisar os permeados. Ao comparar a solução inicial com o permeado Pré-DF,

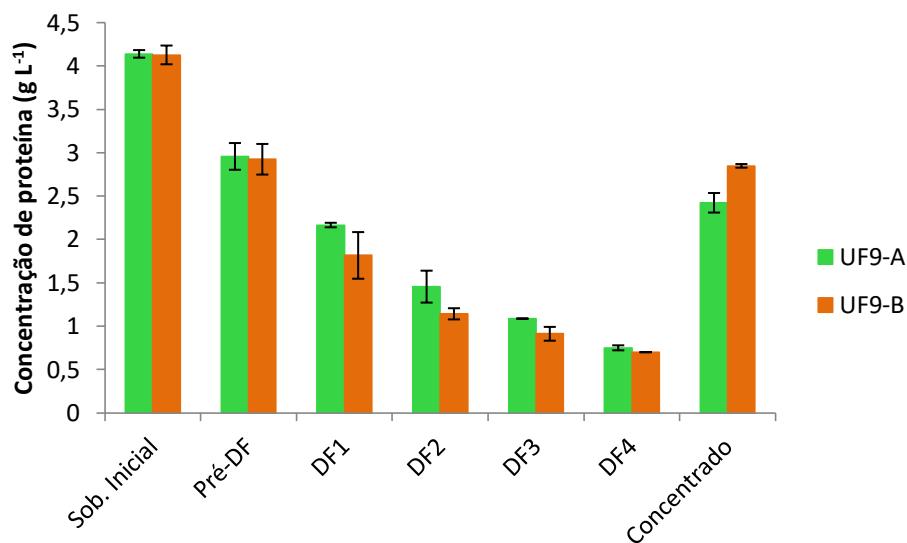
observa-se que a condutividade elétrica se mantém constante, indicando que os íons passaram livremente pela membrana devido ao seu tamanho bastante inferior quando comparados ao tamanho dos poros da membrana. Dessa forma, pode-se afirmar que a retenção desses sais pela membrana é igual a zero. Essa observação também pode ser confirmada ao comparar o permeado DF4 com o Concentrado, os quais apresentaram os mesmos valores de condutividade elétrica. Com o processo realizado, foi possível reduzir a condutividade elétrica de 32,3 e 34,3 mS cm⁻¹ (sobrenadante inicial) para 14,12 e 17,19 mS cm⁻¹ (concentrado), respectivamente, para os experimentos UF9-A e UF9-B, resultando numa redução de cerca de 50 %.

Com base nos resultados obtidos para a condutividade elétrica e relacionando-os com os resultados da Figura 37 (comportamento do fluxo de permeado), é possível que o fluxo de permeado tenha aumentado durante a diafiltração porque a remoção dos íons e adição de água que causou a diminuição da condutividade elétrica também diminuiu a força iônica do meio, fazendo com que as cargas das proteínas e da membrana estivessem mais expostas por estarem envolvidas por menos íons da solução, intensificando a repulsão eletrostática e minimizando o *fouling*. De acordo com Bhushan e Etzel (2009), ao realizar o fracionamento do CMP e BLG utilizando membranas carregadas positivamente, foi possível realizar o fracionamento quando a solução apresentou baixa condutividade elétrica, porém, ao adicionar NaCl (1 M) ao soro, foi observado que a membrana não foi seletiva para o processo, porque a adição de sal anulou o efeito das cargas das proteínas e da membrana devido aos íons terem formado uma espécie de blindagem ao redor das proteínas e da membrana carregadas.

Como o pH do soro de leite reconstituído utilizado neste trabalho foi de aproximadamente 6,35, mais diafiltrações precisariam ser realizadas para que esse valor fosse alcançado quando o sobrenadante inicial em pH 10 é utilizado, possibilitando ao mesmo tempo uma redução da condutividade elétrica pela remoção dos sais a cada nova diafiltração. Além disso, acredita-se que a lactose tenha permeado facilmente através da membrana com o decorrer da UF/DF por ser uma molécula sem carga e tamanho inferior ao tamanho dos poros da membrana, no entanto, isso precisa ser avaliado.

Na Figura 39 estão apresentados os resultados de concentração de proteínas ao longo do processo de concentração utilizando diafiltração.

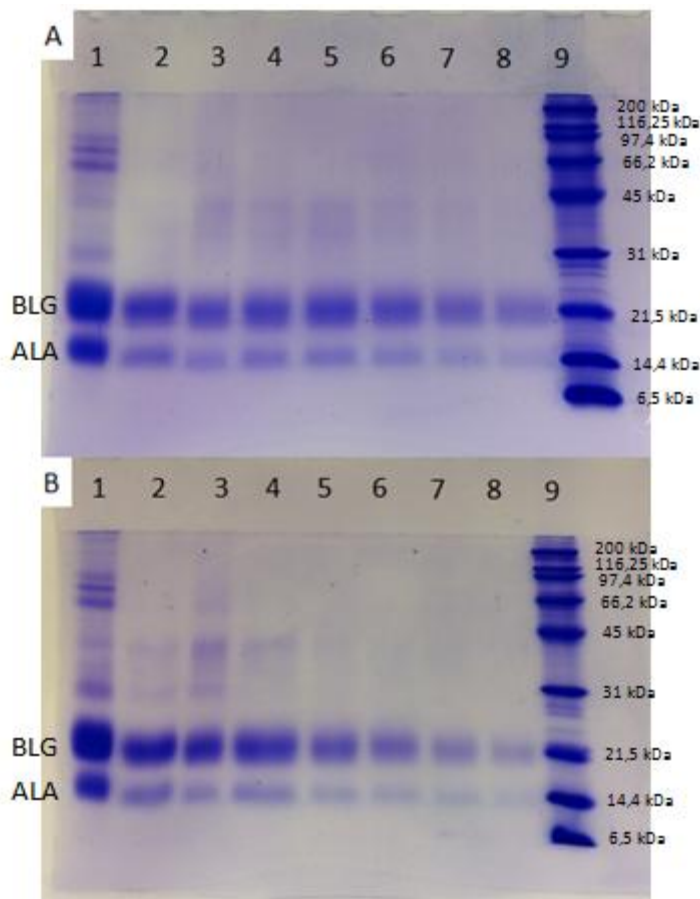
Figura 39. Concentração de proteína das diferentes correntes obtidas por meio da UF/DF utilizando a solução sobrenadante em pH 10.



Conforme os resultados da Figura 39 pode ser verificado que a membrana não reteve totalmente as proteínas, uma vez que a presença delas foi observada em todos os permeados. Com o decorrer das diafiltrações, a concentração das proteínas nos permeados diminuiu, possivelmente devido a menor concentração de proteínas na solução que foi parcialmente concentrada e permaneceu no tanque de alimentação, ou devido à maior exposição das cargas das proteínas e da membrana, aumentando a repulsão eletrostática. Além disso, o concentrado apresentou concentração de proteína menor que a do sobrenadante inicial (Sob. Inicial), mesmo tendo seu volume reduzido e, como as proteínas são maiores que a MMC da membrana, esse resultado corrobora a hipótese de a lactose ter passado facilmente através da membrana, como foi mencionado anteriormente.

Como não era esperado que ocorresse a passagem de proteínas através da membrana, a presença delas nos permeados pode ter ocorrido devido a uma ampla distribuição de tamanho de poros da membrana, a proteínas de tamanho inferior ou próximo a MMC da membrana (5 kDa) conseguirem permear a membrana, como PPs e CMP, ou, inclusive, a um desgaste da camada seletiva da membrana de ultrafiltração. A fim de verificar quais proteínas passaram através da membrana, foi realizada a eletroforese das diferentes correntes envolvidas ao longo de todo o processo, conforme é apresentado na Figura 40.

Figura 40. Eletroforese das diferentes correntes durante a UF/DF com a solução sobrenadante em pH 10. (A) UF9-A e (B) UF9-B; (1) soro de leite 6 %, (2) sobrenadante inicial, (3) concentrado, (4) Pré-DF, (5) DF1, (6) DF2, (7) DF3, (8) DF4, (9) marcador de massa molar.



Pela análise da eletroforese, Figura 40, observa-se a presença de BLG e ALA em todas as raias (colunas). Assim como observado na análise da concentração de proteínas (Figura 39), à medida que as diafiltrações foram realizadas, a concentração das proteínas nos permeados diminuiu, e que, na análise de eletroforese, pode ser verificada pela menor intensidade das bandas (manchas azuis) das raias 4, 5, 6, 7 e 8 (as alíquotas utilizadas nas análises dos permeados não foram diluídas). Com relação ao sobrenadante inicial (2) e concentrado (3), os quais foram diluídos 2,5 vezes, pode ser verificado que o concentrado apresentou bandas de coloração menos intensas, indicando conter menor quantidade de proteína, quando comparadas com as do sobrenadante inicial. Esse resultado também é confirmado pelos resultados obtidos pelo método de Lowry (Figura 39), no qual foi verificado perda de proteína de tal forma que o concentrado final apresentou menor concentração de

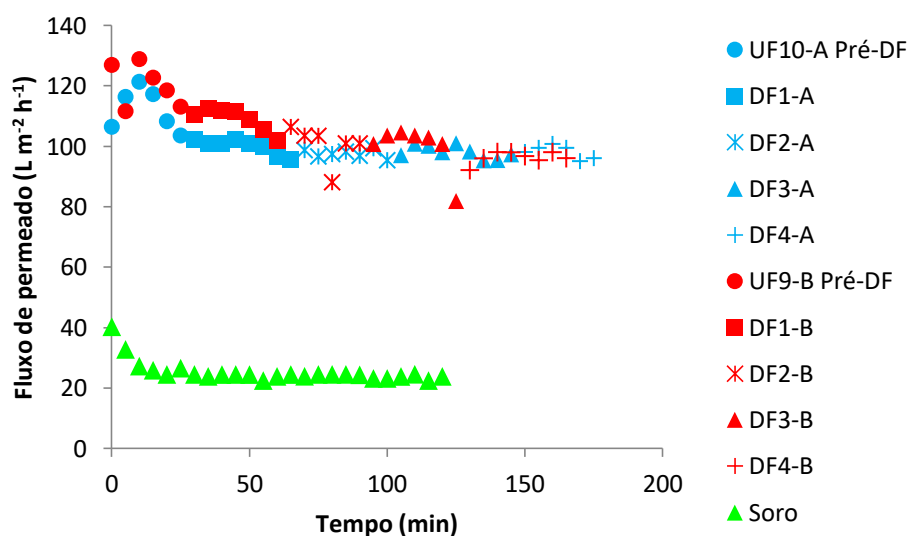
proteína que o sobrenadante inicial.

Ao relacionar os resultados das análises de concentração de proteína (Figura 39) e eletroforese (Figura 40) com os resultados do fluxo de permeado (Figura 37), o aumento do fluxo de permeado do sobrenadante ao longo das diafiltrações pode ter ocorrido não apenas devido à repulsão eletrostática entre proteínas e membrana, como também pelo efeito de diluição da solução que estava sendo concentrada, já que nos permeados foi verificada a presença de proteínas que deveriam ter sido retidas. Também pode ser observado que mesmo que as proteínas e a membrana estivessem carregadas negativamente, a repulsão eletrostática não foi suficiente para impedir a permeação das proteínas.

5.3.2.3. Sedimentado ressolubilizado pH 10

Os resultados de fluxo de permeado para o sedimentado ressolubilizado durante o processo de UF/DF estão apresentados na Figura 41.

Figura 41. Comportamento do fluxo de permeado durante a UF /DF (5 kDa) da solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10 (UF10-A e UF10-B), $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ comparado com o fluxo de permeado durante a UF da solução de soro de leite 6 % em pH 6,35 (UF7-B), $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

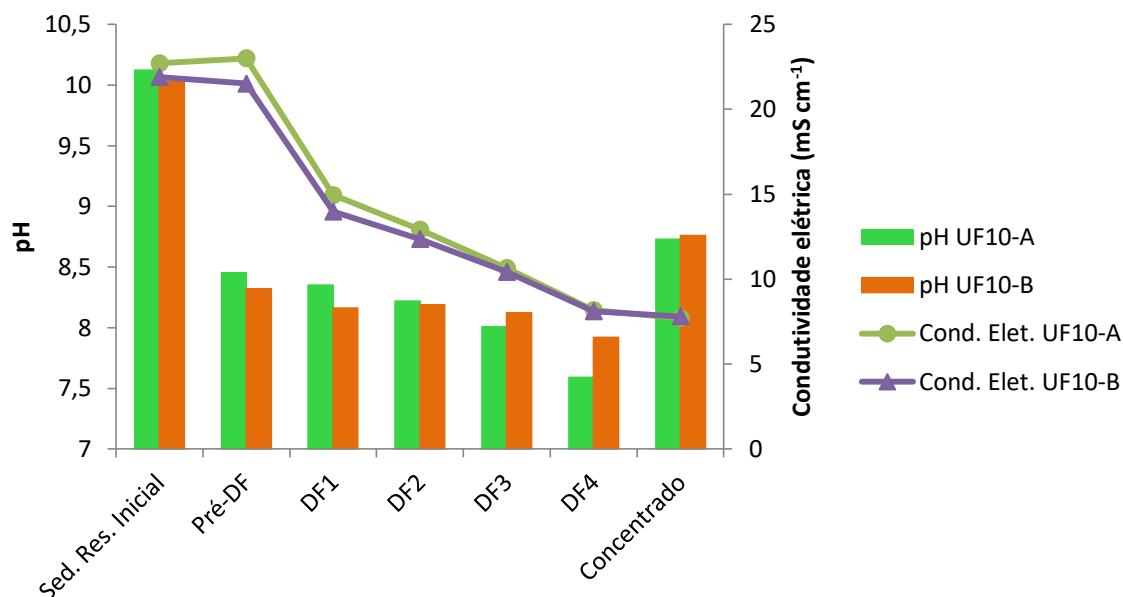


Pela análise dos resultados, de forma geral, observa-se que os fluxos de permeado das soluções de sedimentado ressolubilizado, experimentos UF10-A e UF10-B, se mostraram cerca de 5 vezes mais elevados que o fluxo de permeado da solução de soro de leite. Embora seja visualizado um aumento inicial do fluxo, atingido um valor entre 130 e 120 L m⁻²h⁻¹, seguido por queda nos primeiros minutos do experimento, utilizar a solução em pH 10 permitiu que o fluxo se mativesse elevado com a realização das diafiltrações, da mesma forma observada para o sobrenadante em pH 10 (Figura 37). No entanto, a solução de sedimentado ressolubilizado não apresentou o mesmo aumento do fluxo de permeado que foi observado para o sobrenadante conforme a realização das diafiltrações ocorria, mantendo-se estável em torno de 100 L m⁻² h⁻¹, aproximadamente.

No pH 10, as proteínas ALA e BLG encontram-se acima de seus pontos isoelétricos, apresentando cargas negativas, fazendo com que ocorra repulsão entre elas. Além disso, como foi utilizada a mesma membrana cerâmica de UF de 5 kDa, ela também pode ter adquirido carga negativa, resultando em pouca interação entre a membrana e as proteínas. Contudo, deve-se levar em conta que as análises mostraram que após a formação dos agregados proteicos com o agente complexante, aquecimento seguido por centrifugação, a maior parte das proteínas do soro de leite permaneceu na fração sobrenadante. Assim, o fluxo mais elevado do sedimentado ressolubilizado em pH 10 pode ter sido devido à sua menor concentração de proteínas quando comparada a do sobrenadante em pH 10 (Figura 37)

Na Figura 42 estão apresentados os resultados de pH e de condutividade elétrica para as diferentes correntes obtidas durante o processo de ultrafiltração e diafiltração.

Figura 42. Determinação do pH e da condutividade elétrica da solução sedimentado ressolubilizado em pH 10 e das diferentes correntes obtidas após a UF/DF utilizando membrana de 5 kDa, nas condições de $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.



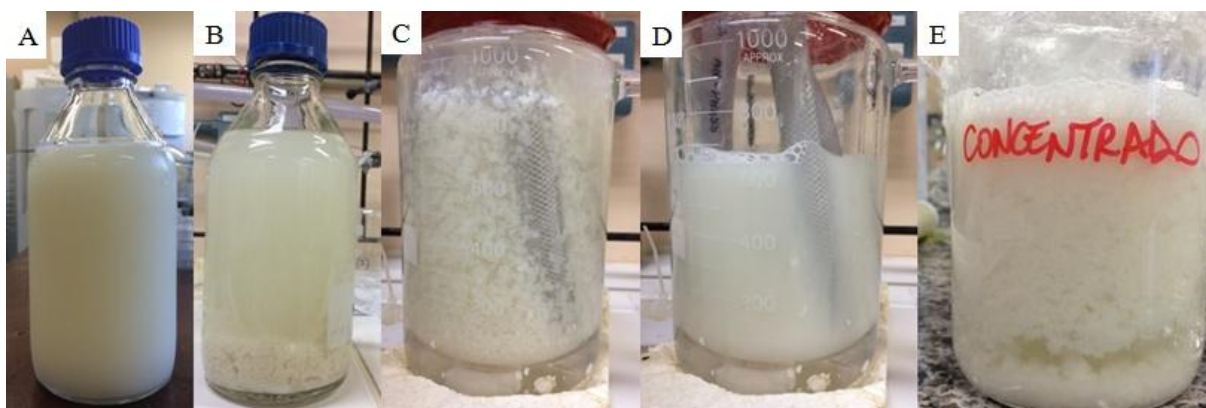
De acordo com os valores de pH observados na Figura 42, o permeado pré-DF apresentou valor inferior ao do sedimentado ressolubilizado inicial (Sed. Res. Inicial), sendo o mesmo comportamento observado para o processo com o sobrenadante (Figura 38). Esses resultados reforçam a hipótese de que a membrana pode ter adquirido carga negativa, causando a repulsão eletrostática dos íons OH^- , porém não pode ser desconsiderado que as proteínas possam ter atuado como um tampão na solução que estava sendo concentrada. Após a adição de água para realizar as diafiltrações, os valores de pH dos permeados DF1, DF2, DF3 e DF4 continuaram sendo reduzidos, embora de forma mais suave, mesmo com a adição de água que possui um pH levemente ácido. Ao final do experimento, o permeado DF4 apresentou pH 7,59 para UF10-A e pH 7,92 para UF10-B, inferior ao pH do concentrado, que apresentou valores de pH 8,73 e 8,76 para os experimentos UF10-A e UF10-B, respectivamente

Ao analisar os resultados da condutividade elétrica ao longo do processo, Figura 42, também foi verificado que a membrana não causou retenção dos íons presentes na solução, uma vez que a condutividade elétrica do sedimentado ressolubilizado inicial foi praticamente

a mesma do permeado Pré-DF, o qual corresponde ao primeiro permeado antes de adicionar água para realizar a diafiltração. Também pode ser observado que a membrana não reteve os íons pela comparação das condutividades elétricas dos permeados DF4 e dos concentrados, os quais apresentaram valores similares. Além disso, também foi observado que após o início da diafiltração, as condutividades elétricas dos permeados DF2, DF3 e DF4 são reduzidas de forma mais suave quando comparadas com a queda mais acentuada observada do permeado Pré-DF para o DF1, o que pode estar relacionado com um depósito de proteínas sobre a superfície da membrana que dificultou a passagem dos íons. Com o experimento realizado neste trabalho, foi possível reduzir a condutividade elétrica de 22,7 e 21,9 mS cm^{-1} (sedimentado resolubilizado inicial) para 7,70 e 7,81 mS cm^{-1} (concentrado), respectivamente, para os experimentos UF10-A e UF10-B, representando uma redução de cerca de 65 %.

Na Figura 43 estão apresentadas as fotografias da solução de sedimentado ressolubilizado em diferentes etapas do processo durante a realização dos experimentos.

Figura 43. Aspecto da solução correspondente ao sedimentado ressolubilizado pH 10 ao longo do experimento. (A) à temperatura ambiente; (B) a 55 °C; (C) a 55 °C no tanque de alimentação sem movimentação da solução; (D) a 55 °C no tanque de alimentação com movimentação da solução; (E) concentrado final.



Conforme as fotografias da Figura 43, observa-se a solução contendo o sedimentado ressolubilizado à temperatura ambiente e em pH 10 sem presença de agregados na Figura 43A. Na Figura 43B, pode ser verificado que a proteína formou agregados ao ser aquecida a 55 °C sem agitação e sedimentou. A Figura 43C mostra os agregados proteicos após a solução ser transferida para o tanque de alimentação a 55 °C, porém, ao ligar o sistema, que

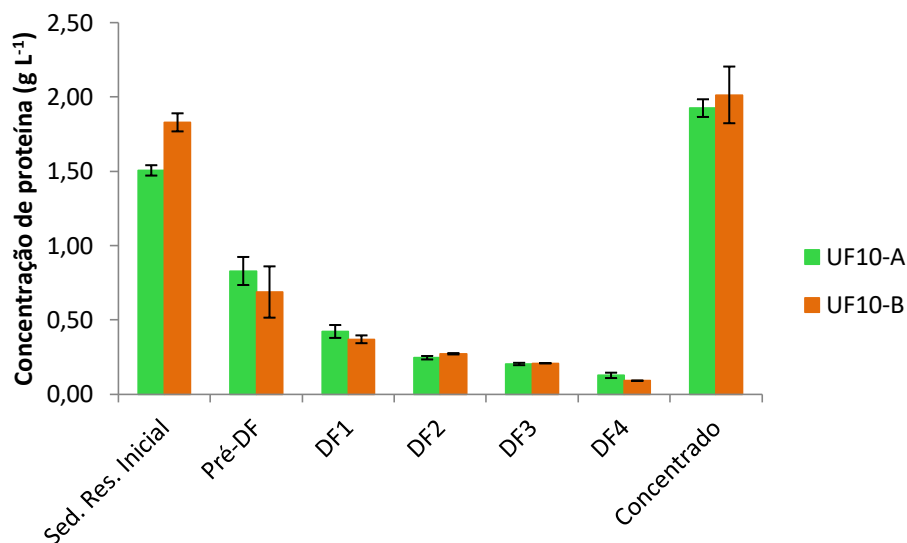
fez com que a solução fosse movimentada, Figura 43D, os agregados proteicos parecem ter sido ressolubilizados uma vez a solução apresentou o mesmo aspecto na Figura 43A. Entretanto, após a finalização dos experimentos, o concentrado ainda apresentou os agregados proteicos, mostrando que o método proposto para ressolubilizar essa fração proteica não foi adequado. Uma possível causa para isso é a quantidade de citrato que permaneceu no sedimentado ter complexado o cálcio adicionado, diminuindo a quantidade de cálcio disponível ou a quantidade de cloreto de cálcio adicionada ter sido insuficiente, fazendo com que a ALA não retornasse à sua forma nativa, forma *holo*, permanecendo na forma *apo*. Ainda, essa proteína pode ter sido desnaturada devido à temperatura utilizada no experimento somada ao pH alcalino.

Como foi observado que o aquecimento da solução fez com que os agregados proteicos fossem visualizados na solução, isso pode ter causado a formação de uma camada de proteínas sobre a superfície da membrana. Esse acúmulo de proteínas não reduziu apenas o fluxo de permeado após o aumento inicial (Figura 41), como também pode ter contribuído para menor permeação dos íons observada a partir do permeado DF1. Ainda, não pode ser descartada a hipótese dos íons terem ficado aprisionados no interior dos agregados proteicos formados e que foram liberados lentamente ao longo das diafiltrações.

De acordo com Pelegrine e Gasparetto (2005), em valores extremos de pH, seja ácido, seja básico, a proteína pode sofrer um desdobramento que expõe seus grupos hidrofóbicos. Dessa forma, o pH 10 utilizado no presente trabalho pode ter favorecido as interações hidrofóbicas entre as moléculas de ALA e, por isso, os agregados ainda puderam ser visualizados após a tentativa de ressolubilizar essa fração. Isso pode ser um indicativo de que a ressolubilização dessa fração seja mais adequada em pH alcalino mais baixo.

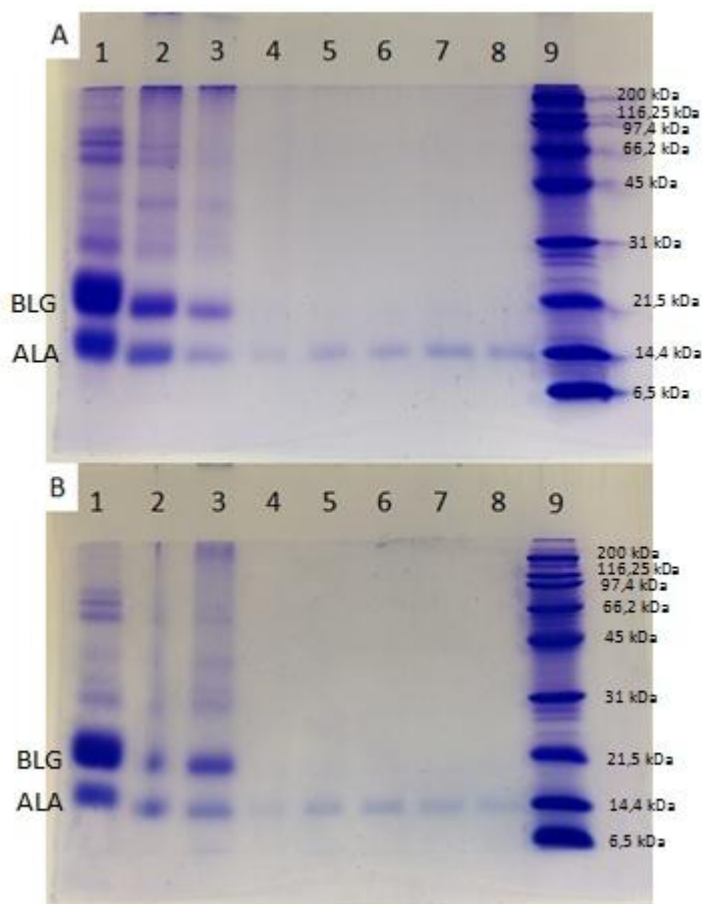
A concentração de proteína das diferentes correntes do processo de UF/DF com o sedimentado ressolubilizado é apresentada na Figura 44.

Figura 44. Concentração de proteína das diferentes correntes obtidas por meio da UF/DF utilizando a solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10.



De acordo com a Figura 44, pode ser observado que ocorreu a passagem de proteínas através da membrana. Contudo, ao trabalhar com o sedimentado ressolubilizado, a concentração de proteínas nos permeados é inferior aos observados para o processo realizado com a solução sobrenadante (Figura 39), o que pode ser devido à menor concentração de proteína da solução de sedimentado ressolubilizado. Além disso, a proteína dessa fração mostrou tendência de formar agregados, os quais são maiores que os poros da membrana, e, assim, diminuindo a perda de proteína nos permeados. Também pode ser observado que o concentrado final apresentou concentração de proteína maior que a do sedimentado ressolubilizado inicial (Sed. Res. Inicial), mesmo ocorrendo perda de proteínas nos permeados. Contudo, a perda de proteína não era desejada e não deveria ter ocorrido ao utilizar uma membrana com MMC de 5 kDa. A fim de verificar quais proteínas que permearam e quais foram retidas pela membrana, foi realizada a eletroforese de todas as correntes, conforme é apresentada na Figura 45.

Figura 45. Eletroforese das diferentes correntes durante a UF/DF com a solução de sedimentado ressolubilizado em pH 10. A) UF10-A e B) UF10-B. (1) soro de leite 6 %, (2) sedimentado ressolubilizado inicial, (3) concentrado, (4) Pré-DF, (5) DF1, (6) DF2, (7) DF3, (8) DF4, (9) marcador de massa molar.



Pela análise de eletroforese na Figura 45, verifica-se que a proteína que permeou a membrana foi a ALA, mesmo sendo observada a formação de agregados proteicos durante a UF, os quais deveriam dificultar a passagem dessa proteína através da membrana, além de não ser observada a presença de BLG nos permeados Pré-DF (4), DF1 (5), DF2 (6), DF3 (7) e DF4 (8). Entretanto, ao contrário do que foi observado na análise de proteínas pelo método de Lowry (Figura 44), as bandas de proteínas de ALA aparecem mais intensas nos permeados intermediários e finais do que no permeado Pré-DF (4), sendo que deveriam ser mais fracas pela menor concentração de proteínas nos permeados finais. O concentrado também apresentou bandas menos intensas do que o sedimentado ressolubilizado inicial, porém deveria ter bandas mais intensas em razão da maior concentração de proteína encontrada pelo

método de Lowry. De qualquer forma, a eletroforese foi utilizada como análise qualitativa e a formação de agregados após o processo dificultou a transferência das alíquotas para todas as análises envolvendo o sedimentado ressolubilizado, podendo ter afetado o resultado de qualquer uma dessas análises.

Relacionando o comportamento do fluxo de permeado (Figura 41) com a concentração de proteína (Figura 44) e eletroforese (Figura 45), é possível que o aumento do fluxo do permeado durante a diafiltração possa não ter ocorrido, porque a perda de proteína foi menor, quando comparada com o comportamento do fluxo de permeado do sobrenadante em pH 10 (Figura 37), não ocorrendo o efeito de diluição da solução que estava sendo concentrada ou, ainda, pelo efeito das forças cisalhantes sobre a superfície da membrana serem constantes durante quase todo o processo.

5.3.2.4. Determinação da tendência ao *fouling*

Após a realização dos experimentos com o soro de leite 6 %, sobrenadante em pH 4 e 10, e sedimentado ressolubilizado em pH 10, a permeância hidráulica da membrana de UF foi medida a fim de determinar a tendência ao *fouling* (Equação 5), e os resultados são apresentados na Tabela 18. Os gráficos para a obtenção de cada um dos parâmetros para determinar a tendência ao *fouling* são apresentados no Apêndice A (Figuras A20, A22, A24 e A26).

Tabela 18. Permeância (K_p) da membrana de 5 kDa antes da realização dos experimentos (limpa) e após a realização dos experimentos (suja) e tendência ao *fouling* gerado para as diferentes soluções submetidas ao processo de UF.

Solução / Experimento	K_{pLimpa}^*	K_{pSuja}^*	<i>Fouling</i> (%)
Soro de leite 6 % / UF7-A	314,8	43,9	86,1
Soro de leite 6 % / UF7-B	228,5	58,1	74,5
Sobrenadante pH 4 / UF8-A	375,0	13,5	96,4
Sobrenadante pH 4 / UF8-B	347,4	17,3	95,0

*Permeância em $L\ cm^2\ kgf^{-1}\ m^{-2}\ h^{-1}$.

(Continua)

Solução / Experimento	K_{PLimpa}^*	K_{PSuja}^*	<i>Fouling</i> (%)
Sobrenadante pH 10 / UF9-A	354,2	125,4	64,6
Sobrenadante pH 10 / UF9-B	307,8	133,8	56,5
Sedimentado ressolubilizado pH 10 / UF10-A	334,9	62,1	81,4
Sedimentado ressolubilizado pH 10 / UF10-B	317,0	48,7	84,6

* Permeância em $L\ cm^2\ kgf^{-1}\ m^{-2}\ h^{-1}$.

Conforme os dados da Tabela 18, o sobrenadante em pH 4 foi a solução que resultou em maior tendência ao *fouling*, com valores acima de 95 %. Esse resultado mostra que mesmo apresentando menor turbidez que o soro de leite e o sedimentado ressolubilizado, e as proteínas estando solúveis em pH 4, a carga adquirida pelas proteínas e pela membrana nesse meio pode ter afetado a interação entre elas, bem como a interação delas com a membrana, sendo essa hipótese corroborada pelo baixo fluxo de permeado durante o processo de UF. Ao realizar o experimento com o soro de leite, embora essa solução contenha maior teor de proteína e maior turbidez que o sobrenadante em pH 4, o *fouling* foi menor, variando de 74,5 a 86,0 %. A maior tendência ao *fouling* no experimento UF7-A (soro de leite) se deve, principalmente, à baixa permeância da membrana limpa no experimento 2, demonstrando que a membrana ainda continha resíduos do experimento anterior, mesmo seguindo o protocolo de limpeza. Por outro lado, ao ajustar o pH do sobrenadante para 10, além dos maiores fluxos de permeado observados, o *fouling* foi o mais baixo de todos os experimentos realizados, variando de 56,5 a 64,6 %, possivelmente pela carga de mesma natureza das proteínas e da membrana, dificultando a ocorrência de interações de qualquer tipo, seja proteína-proteína, seja proteína-membrana. Em relação ao sedimentado ressolubilizado em pH 10, a tendência ao *fouling* observada ficou próximo do encontrado para o experimento do soro de leite, entre 81,4 e 84,6 %, o que pode estar relacionado com a formação de agregados proteicos dessa fração após o aquecimento e que se depositaram sobre a membrana ou no interior dos poros de vidro à pressão. De qualquer forma, os resultados observados demonstram que o pH parece afetar mais fortemente o desempenho do fluxo de permeado, conforme observado nos resultados anteriores, e a tendência à formação de *fouling* ao trabalhar com soluções de proteínas do que a turbidez e a concentração de proteína, sugerindo que as forças

eletrostáticas possam exercer grande influência sobre os PSM envolvendo essas macromoléculas juntamente com o efeito estérico, mais comumente avaliado durante a realização da ultrafiltração.

O tipo de proteína predominante na solução também não pode ser desprezado na análise de *fouling*, pois mesmo que o sobrenadante contenha tanto ALA como BLG, uma vez que não ocorreu uma boa separação após a formação de agregados proteicos e centrifugação, os trabalhos de Bramaud, Aimar, Daufin (1997), Alomirah e Alli (2004), Lucena *et al.* (2007), Fernández *et al.* (2011), e Toro-Sierra, Tolkach e Kulozik (2013) relataram que a BLG permaneceu principalmente no sobrenadante e não foi observada formação de agregados proteicos nessa fração durante os experimentos, demonstrando possuir boa solubilidade em pH 10 e menor tendência de causar *fouling*. Por outro lado, a ALA, a qual tem a capacidade de formar agregados proteicos e possivelmente é a proteína majoritária no sedimentado do presente trabalho, mesmo com elevado fluxo de permeado em pH 10, demonstrou maior tendência ao *fouling*.

Embora a condutividade elétrica tenha sido medida, ela não foi controlada da mesma forma que o pH. Como as soluções sobrenadante e sedimentado ressolubilizado apresentaram diferentes valores de condutividade elétrica e a composição de sais era diferente em cada fração, é possível que isso tenha afetado a tendência ao *fouling*. Justificar qualquer resultado baseado na condutividade elétrica do experimento se torna difícil, pois não é apenas o seu valor absoluto que influencia a solubilidade da proteína, mas também o sal que é utilizado, conforme a série de Hofmeister (1888 *apud* BALDWIN, 1996). No sobrenadante havia predominantemente citrato de sódio, enquanto que foi necessário utilizar cloreto de cálcio na tentativa de ressolubilizar o sedimentado, não podendo desprezar a maior tendência de sais de cálcio formar *fouling*.

Capítulo 6 - Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, as conclusões apresentadas a seguir podem ser estabelecidas.

Os experimentos realizados mostraram que o fracionamento das proteínas do soro de leite mediante a utilização da microfiltração e nas condições empregadas não mostrou ser uma boa estratégia devido ao baixo fluxo de permeado obtido.

Ao realizar o procedimento para formação de agregados proteicos de ALA seguido por centrifugação, foi observado que o método utilizado favoreceu a presença de BLG e ALA tanto no sobrenadante como no sedimentado, possivelmente devido à utilização de quantidade insuficiente de citrato de sódio para complexar todo o cálcio e possibilitar que a maior parte de ALA fosse recuperada no sedimentado. Além disso, foi verificado que a maior parte das proteínas totais permaneceu no sobrenadante.

O ajuste do pH mostrou ser uma boa forma de melhorar o fluxo de permeado, possivelmente por afetar as interações proteína-proteína e proteína-membrana. Ao ajustar o pH para 10, o fluxo de permeado se manteve elevado durante todo o processo, apresentando um comportamento ascendente ao longo da diafiltração da fração correspondente ao sobrenadante. Além disso, os fluxos de permeado de ambas as frações foram superiores ao observado para a solução de soro de leite (pH 6,35).

As análises de condutividade elétrica mostraram que pequenos íons podem ser removidos da solução utilizando a membrana, podendo-se admitir que outras moléculas de baixa massa molar, como a lactose, também podem ser removidas.

Em relação ao pH, foi verificado que a corrente retida tendeu a manter o pH um pouco mais elevado, possivelmente devido a uma exclusão eletrostática dos íons OH^- ou a um efeito tamponante das proteínas retidas pela membrana.

Pela análise de proteínas das diferentes correntes obtidas, é possível que a camada seletiva da membrana já estivesse danificada devido à passagem de proteínas de massas molares maiores que a massa molar de corte da membrana.

Com o trabalho desenvolvido, foi possível verificar o efeito que o pH tem sobre uma solução contendo proteínas quando submetida a um processo de separação por membrana, porém é preciso cautela a fim de não comprometer as suas propriedades, principalmente no que diz respeito às tecnológicas e que ainda precisam ser avaliadas. Além disso, ao realizar alguma forma de pré-tratamento, seja mediante adição de agentes químicos, seja por meio da utilização de processos que antecedem os PSM, como a centrifugação, será possível obter não apenas um melhor desempenho do processo envolvendo o sistema de membrana como também um resultado global melhor. Contudo, esses pré-tratamentos necessitam ser melhor estudados e compreendidos antes da aplicação dos PSM.

Capítulo 7 - Sugestões para Trabalhos Futuros

Conforme as observações e dificuldades ao longo da realização deste trabalho, a seguir são apresentadas algumas sugestões e comentários para auxiliar na realização de trabalhos futuros.

- Utilizar o soro de leite desmineralizado ou parcialmente desmineralizado para que ocorra a formação de agregados proteicos. A menor quantidade de minerais no soro desmineralizado, dentre eles, o íon cálcio, talvez possibilite que uma menor quantidade do agente complexante citrato seja utilizada.
- Realizar a concentração das proteínas do soro de leite em pH 10 (inicial), sem adição de citrato ou qualquer outra forma de tratamento que anteceda a ultrafiltração para separar as proteínas, combinada com diafiltração para verificar o comportamento do fluxo de permeado. À medida que a diafiltração estará sendo realizada, o pH será reduzido juntamente com a remoção de lactose, sais do próprio soro e base adicionada.
- Avaliar diferentes quantidades de citrato para melhorar a separação das proteínas antes de realizar o aquecimento e a centrifugação.

-
- Avaliar a utilização de outras membranas cerâmicas ou uma membrana de MMC inferior a 5 kDa a fim de evitar a perda de proteína no permeado.
 - Avaliar o fator de concentração volumétrica juntamente com fluxo de permeado a fim de determinar o melhor momento para iniciar a diafiltração.
 - Avaliar o efeito da concentração de proteína, pH e condutividade elétrica utilizando a mesma solução para um melhor entendimento do efeito de cada parâmetro sobre o fluxo de permeado.
 - Avaliar diferentes protocolos de limpeza a fim de recuperar a permeância da membrana e minimizar a ocorrência de danos.
 - Estudar formas de melhorar a ressolubilização do sedimentado, como diferentes pH e concentrações de cloreto de cálcio. Além disso, a temperatura durante a ultrafiltração também pode ser avaliada a fim de evitar uma possível desnaturação das proteínas.
 - Avaliar as propriedades tecnológicas das proteínas presentes no sobrenadante e sedimentado.
 - Avaliar a utilização do sedimentado no desenvolvimento de produtos (após a centrifugação). Foi observado que essa fração apresenta um aspecto semelhante ao requeijão.

Referências

ALMÉCIJA, M. C. et al. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 288, n. 1-2, p. 28–35, 2007.

ALOMIRAH, H. F.; ALLI, I. Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 411–419, 2004.

ANAND, S.; KHANAL, S. N.; MARELLA, C. Whey and Whey Products. In: PARK, Y. W.; HAENHEIN, G. F. W. (Eds.). . **Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health**. 1. ed. Chichester: Wiley, 2013. p. 477–497.

ARUNKUMAR, A.; ETZEL, M. R. Fractionation of α -lactalbumin from β -lactoglobulin using positively charged tangential flow ultrafiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 105, p. 121–128, 2013.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 3. ed. Chichester: Wiley, 2012.

BALDWIN, R. L. How Hofmeister Interactions Affect Protein Stability. **Biophysical Journal**, v. 71, n. October, p. 2056–2063, 1996.

BHUSHAN, S.; ETZEL, M. R. Charged ultrafiltration membranes increase the selectivity of

whey protein separations. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 3, 2009.

BONNAILLIE, L. M.; TOMASULA, P. M. Whey Protein Fractionation. In: ONWULATA, C. I.; HUTH, P. J. (Eds.). . **Whey Processing, Functionality and Health Benefits**. 1. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 15–38.

BOYE, J. I.; MA, C.-Y.; HARWALKAR, V. R. Thermal Denaturation and Coagulation of Proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Eds.). . **Food Proteins and Their Applications**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 25–56.

BRAMAUD, C.; AIMAR, P.; DAUFIN, G. Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 4, p. 391–397, 1997.

CHATTERTON, D. E. W. et al. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin - Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1229–1240, 2006.

CHEISON, S. C. et al. Selective hydrolysis of α -lactalbumin by Acid Protease A offers potential for β -lactoglobulin purification in whey proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 117–122, 2012.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1998.

CHRISTENSEN, H. N. Proteins as Buffers. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 34–40, 1966.

CHRISTY, C. et al. High-performance tangential flow filtration: a highly selective membrane separation process. **Desalination**, v. 144, p. 133–136, 2002.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DE BOER, R. **From Milk By-Products to Milk Ingredients: Upgrading the Cycle**. 1. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014.

DE WIT, J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 597–608, 1998.

EL-SALAM, M. H. A.; BUCHHEIMH, W. Review Article Characteristics and Potential Uses of the Casein Macropeptide. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 327–341, 1996.

EMBRAPA. **Pesquisadores identificam composto benéfico para a saúde em soro de leite**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4989705/pesquisadores-identificam-composto-benefico-para-a-saude-em-soro-de-leite>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

ETZEL, M. R. Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 996–1002, 2004.

EUGENIA LUCENA, M. et al. Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates. Production of milk derivatives as a base for infant formulas. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 2, p. 310–316, 2006.

FARKYE, N. Y.; SHAH, N. Milk Proteins. In: USTUNOL, Z. (Ed.). . **Applied Food Protein Chemistry**. 1. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2015. p. 427–458.

FERNÁNDEZ, A. et al. Caseinomacropeptide behaviour in a whey protein fractionation process based on α -lactalbumin precipitation. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 02, p. 196–202, 2011.

FOX, P. F. Milk proteins as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p. 41–55, 2001.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Chemistry and Biochemistry of Milk Constituents. In: SIMPSON, B. K. (Ed.). . **Food Biochemistry and Food Processing**. 2. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. p. 442–464.

GHOSH, R. Ultrafiltration-Based Protein Bioseparation. In: PABBY, A. K.; RIZVI, S. S. H.; SASTRE, A. M. (Eds.). . **Handbook of Membrane Separations Chemical, Pharmaceutical, Food and Biotechnological Applications**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 497–511.

HELDMAN, D. R.; HARTEL, R. W. **Principles of Food Processing Autores**: 1. ed. New York: Chapman & Hall, 1997.

HUFFMAN, L. M.; FERREIRA, L. D. B. Whey - based Ingredients. In: CHANDAN, R. C.; KILARA, A. (Eds.). . **Dairy Ingredients for Food Processing**. 1. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2011. p. 179–198.

JELLEN, P. Dried Whey, Whey Proteins, Lactose and Lactose Derivative Products. In: TAMIME, A. Y. (Ed.). . **Dairy Powders and Concentrated Products**. Chichester: Blackwell Publishing, 2009. p. 255–267.

KATAOKA, M. et al. Structural characterization of the molten globule of alpha-lactalbumin by solution X-ray scattering. **Protein Science**, v. 6, n. 2, p. 422–430, 1997.

KEPPLER, J. K. et al. Differences in heat stability and ligand binding among β -lactoglobulin genetic variants A, B and C using (1)H NMR and fluorescence quenching. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1844, n. 6, p. 1083–93, 2014.

KONRAD, G.; KLEINSCHMIDT, T. A new method for isolation of native α -lactalbumin from sweet whey. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 1, p. 47–54, 2008.

KORHONEN, H. J. Health - Promoting Proteins and Peptides in Colostrum and Whey. In: MINE, Y.; LI-CHAN, E.; JIANG, B. (Eds.). . **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. 1. ed. Ames: Blackell Publishing, 2010. p. 151–168.

KURIYEL, R., FUSHIJIMA, M., JUNG, G. W. Advancements in Membrane Processes for Pharmaceutical Applications. In: PABBY, A. K., RIZVI, S. S. H., SASTRE, A. M. (Ed.). . **Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food and Biotechnological Applications**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. p. 409–425.

LOWRY, O. W. et al. Protein measurements with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUCENA, M. E. et al. α -lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 446–453, 2007.

-
- MADUREIRA, A. R. et al. Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1197–1211, 2007.
- MARSHALL, A. D.; MUNRO, P. A.; TRSGKDH, G. The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux , protein retention and selectivity: A literature review. v. 91, p. 65–108, 1993.
- MERRY, A. J. Editor: Scott , K., Hughes , R. In: SCOTT, K.; HUGHES, R. (Eds.). . **Industrial Membrane Separation Technology**. 1. ed. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 1996. p. 32–66.
- METSÄMUURONEN, S.; NYSTRÖM, M. Enrichment of α -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 337, n. 1-2, p. 248–256, 2009.
- MILLER, G. D.; JARVIS, J. K. .; MCBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.
- MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1996.
- NIGAM, M. O.; BANSAL, B.; CHEN, X. D. Fouling and cleaning of whey protein concentrate fouled ultrafiltration membranes. v. 218, n. September 2006, p. 313–322, 2008.
- O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.). . **Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects**. 4. ed. New York: Springer, 2013. v. 1Ap. 43–86.
- PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT**, v. 38, p. 77–80, 2005.
- PERMYAKOV, E. A.; BERLINER, L. J. α -lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, v. 473, n. 3, p. 269–274, 2000.
- PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 2,

p. 105–116, 2001.

SCHAAFSMA, G.; STEIJNS, J. M. Dairy Ingredients as a Source of Functional Foods. In: SCHMIDL, M. K.; LABUZA, T. P. (Eds.). **Essentials Of Functional Foods**. 1. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. p. 181–204.

SHAO, J.; ZYDNEY, A. L. Retention of Small Charged Impurities During Ultrafiltration. **Biotechnology and bioengineering**, v. 87, n. 1, p. 7–13, 2004.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2005.

SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R. **Introduction to Food Engineering**. 3. ed. Amsterdam: Academic Press, 2003.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold”. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695–704, 2008.

TARLETON, S.; WAKEMAN, R. **Solid/Liquid Separation: Scale-up of Industrial Equipment**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2006.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropetide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 13–20, 2005.

TORO-SIERRA, J.; TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from Whey Protein Isolate Using Selective Thermal Aggregation, an Optimized Membrane Separation Procedure and Resolubilization Techniques at Pilot Plant Scale. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 1032–1043, 2013.

USTUNOL, Z. Introduction to Food Proteins. In: USTUNOL, Z. (Ed.). . **Applied Food Protein Chemistry**. 1. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2015. p. 3–4.

VALIÑO, V. et al. Improved separation of bovine serum albumin and lactoferrin mixtures using charged ultrafiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 163–169, 2014.

-
- VAN REIS, R. D. **Charged filtration membranes and uses therefore**, US Patent 7001550 B2, 2006.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- WILDING, P.; LILLFORD, P. J.; REGENSTEIN, JOE, M. Functional Properties of Proteins in Foods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. April, p. 182–189, 1984.
- WYNN, P. C.; SHEEHY, P. A. Minor Proteins, Including Growth Factors. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.). . **Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects**. 4. ed. New York: Springer, 2013. p. 317–336.
- YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.
- YOON, S.-H. **Membrane Bioreactor Processes: Principles and Applications**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.
- ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, p. 658–663, 2006.

Apêndice A

Compactação e permeância das membranas

Figura A1. Compactação da membrana de microfiltração de 0,05 μm , água destilada, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 1,5\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos MF1-A e MF1-B.

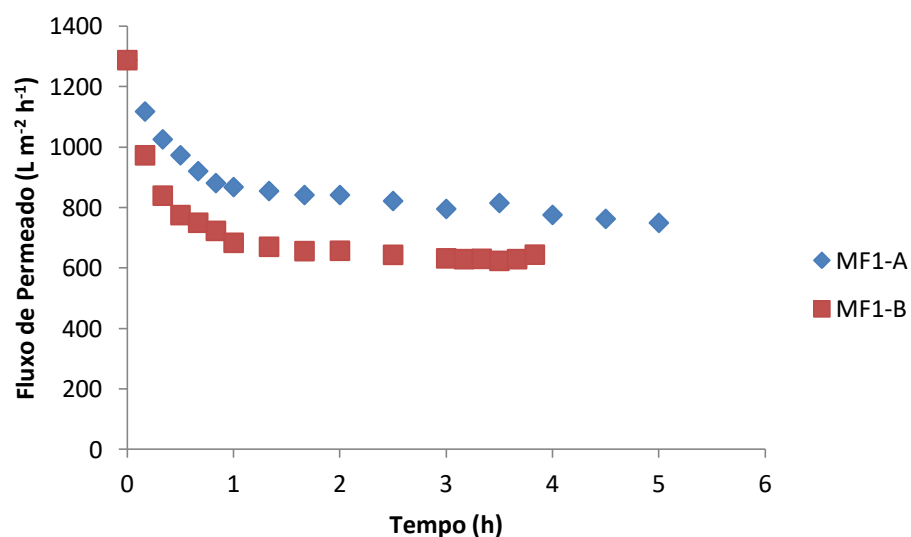


Figura A2. Determinação da permeância para a membrana de microfiltração de 0,05 μm , água destilada, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ e referente aos experimentos MF1-A e MF1-B.

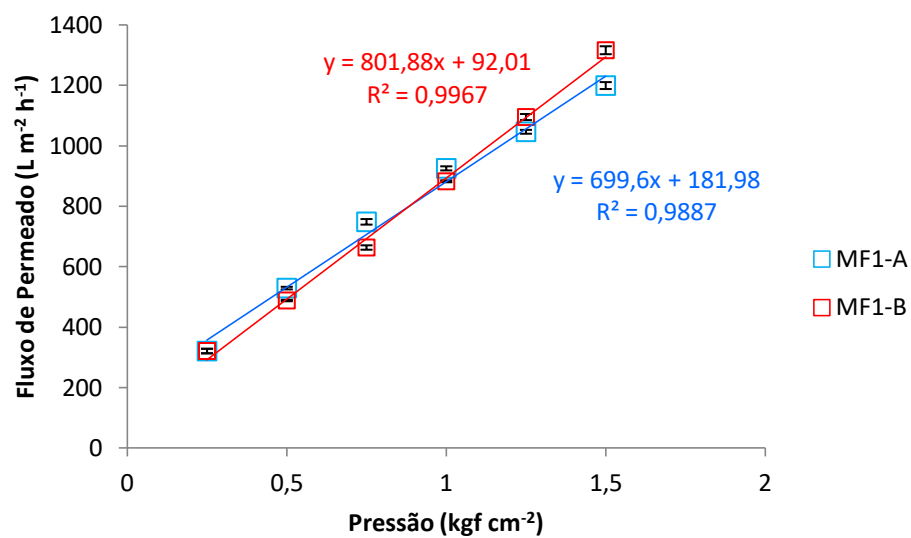


Figura A3. Compactação da membrana de microfiltração de 0,8 μm , água destilada, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 1,5\text{ kgf cm}^{-2}$ e referente aos experimentos MF2-A e MF2-B.

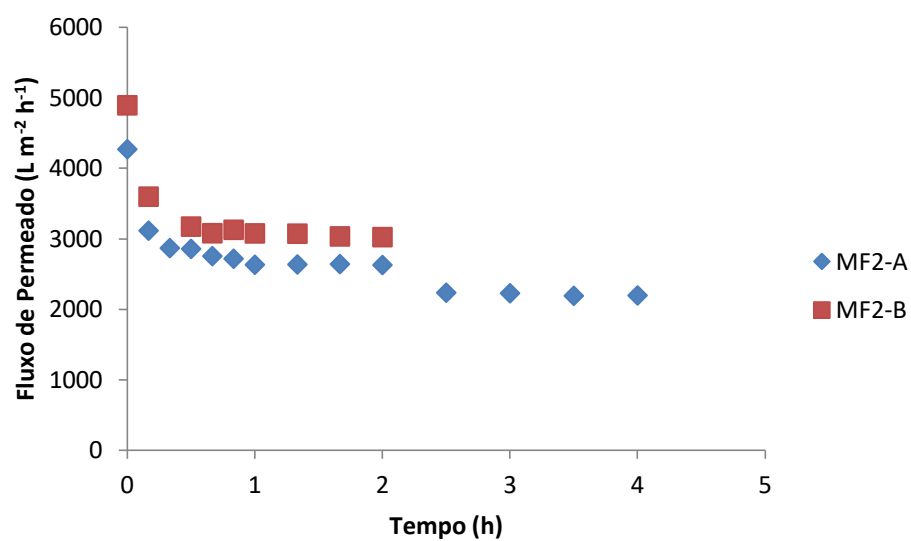


Figura A4. Determinação da permeância para a membrana de microfiltração de 0,8 μm , água destilada, $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ e referente aos experimentos MF2-A e MF2-B.

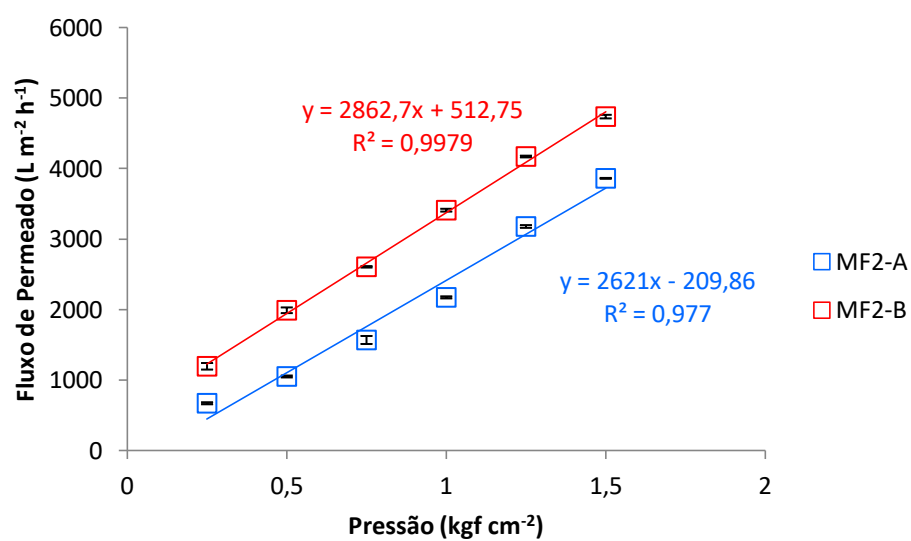


Figura A5. Compactação da membrana de microfiltração de 0,8 μm, água destilada, T = 25 °C, P = 1,5 kgf cm⁻² e referente aos experimentos MF3-A e MF3-B.

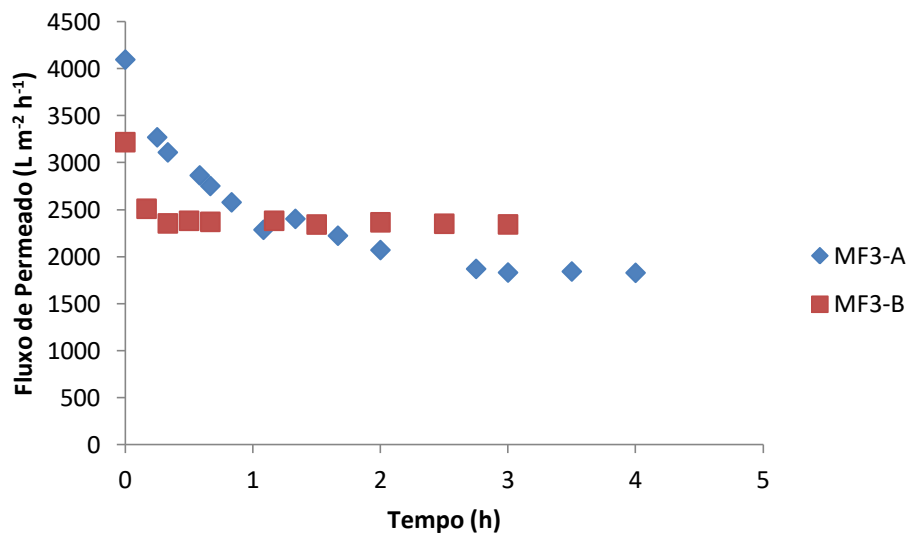


Figura A6. Determinação da permeância para a membrana de microfiltração de 0,8 μm, água destilada, T = 55 °C e referente aos experimentos MF3-A e MF3-B.

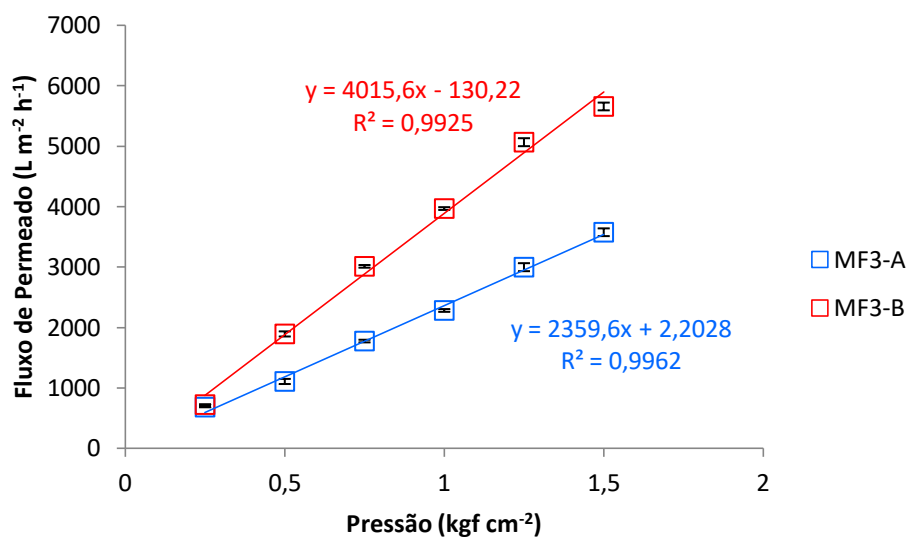


Figura A7. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF1-A e UF1-B.

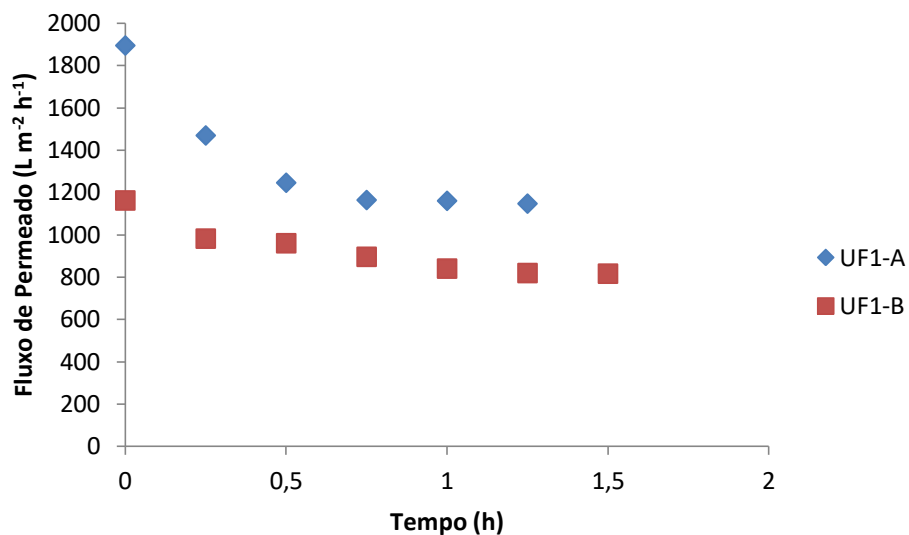


Figura A8. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF1-A e UF1-B.

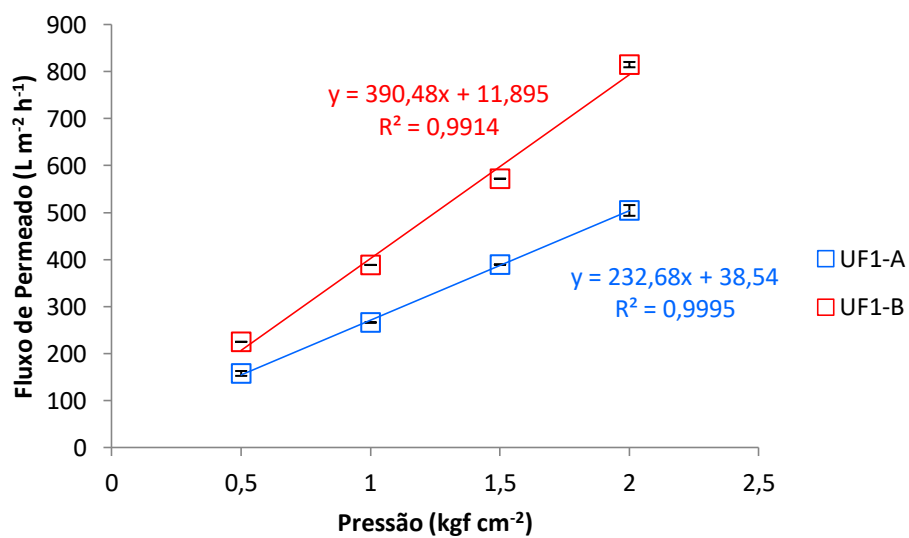


Figura A9. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF2-A e UF2-B.

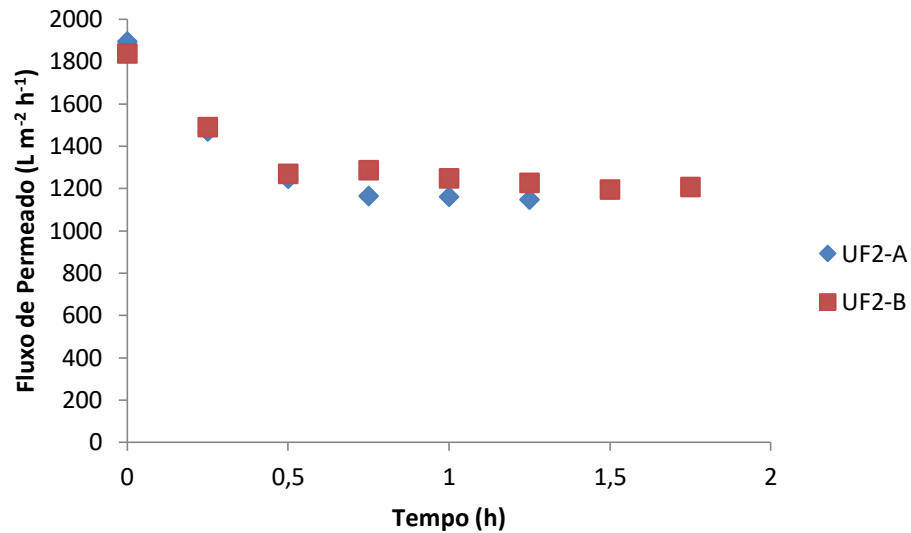


Figura A10. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF2-A e UF2-B.

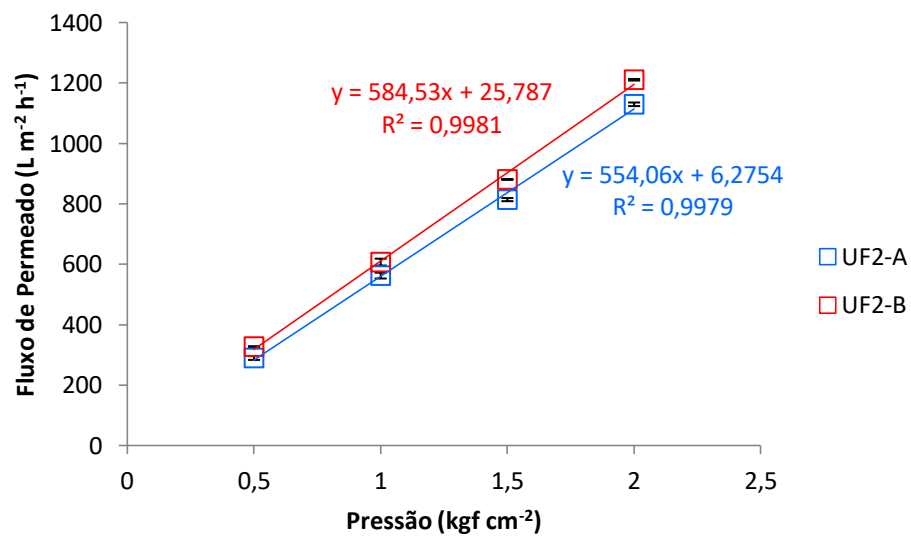


Figura A11. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF3-A e UF3-B.

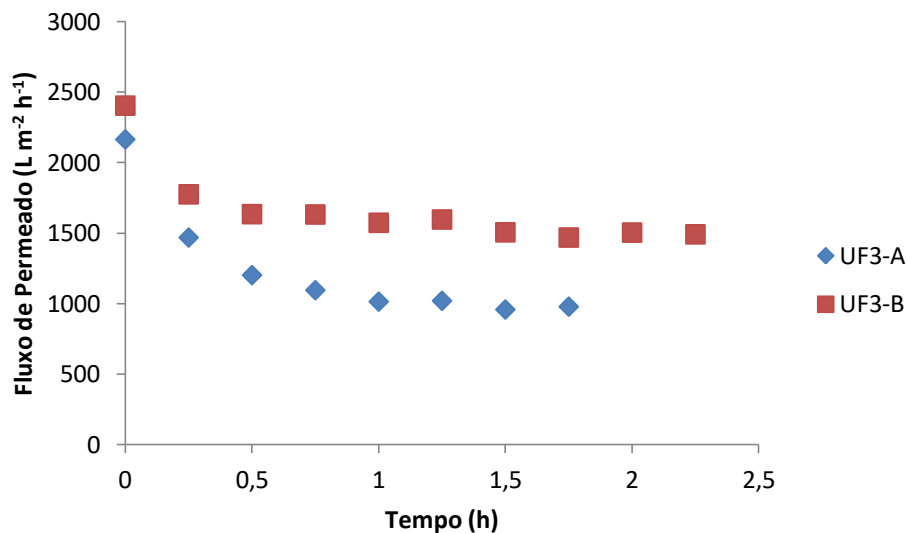


Figura A12. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF3-A e UF3-B.

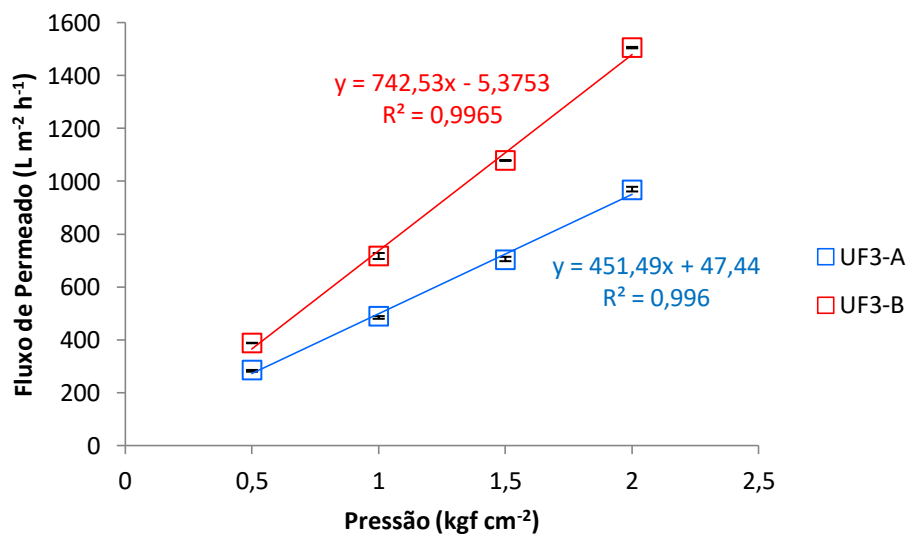


Figura A13. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF4-A e UF4-B.

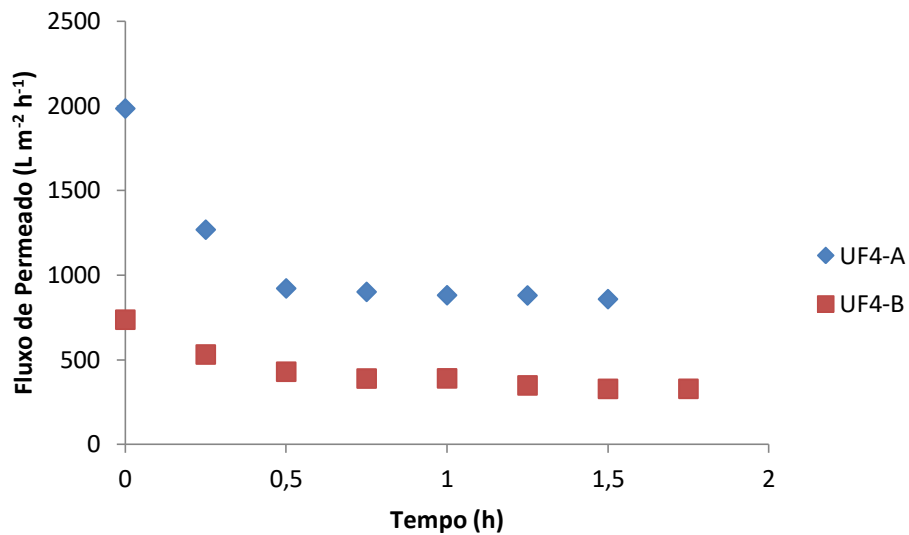


Figura A14. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF4-A e UF4-B.

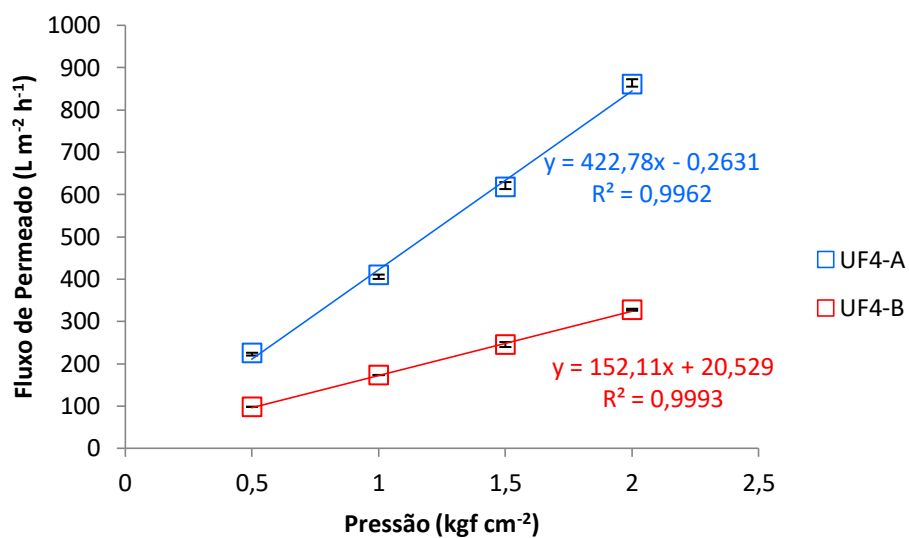


Figura A15. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF5-A e UF5-B.

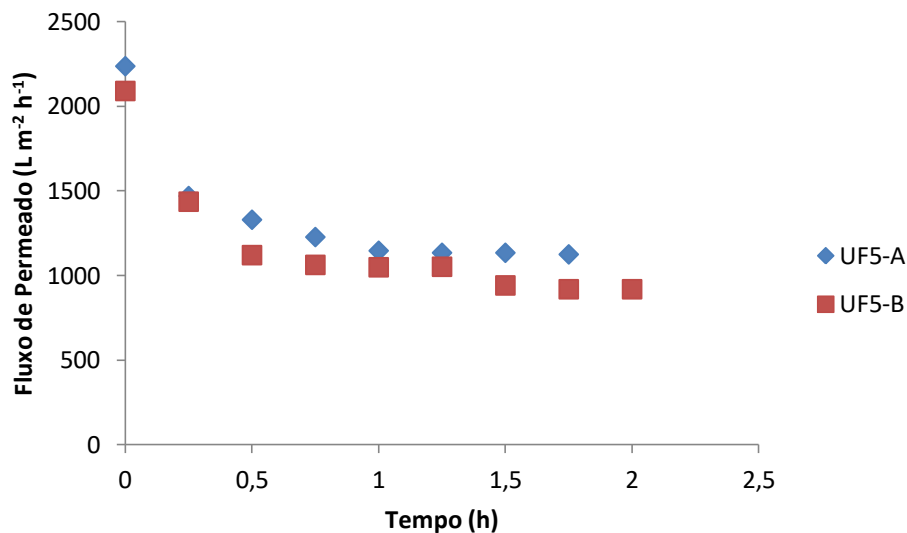


Figura A16. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF5-A e UF5-B.

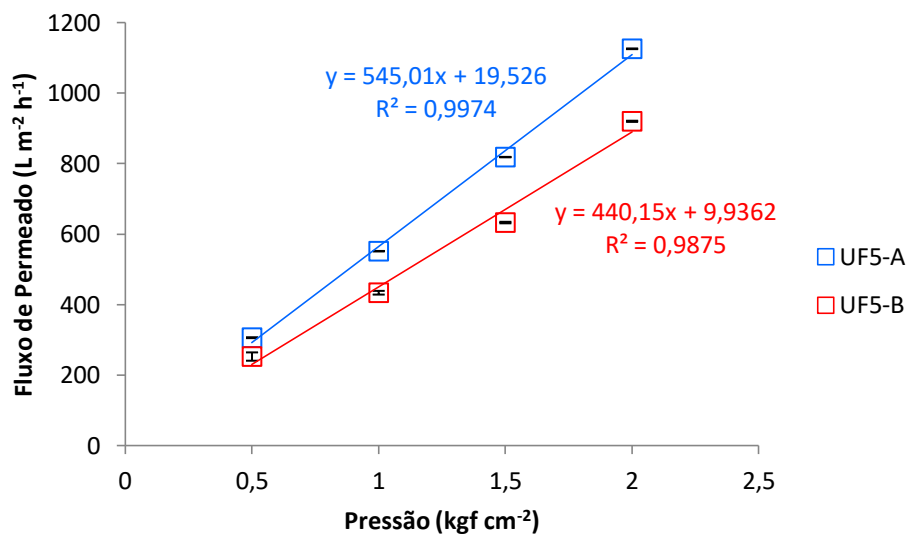


Figura A17. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF6-A e UF6-B.

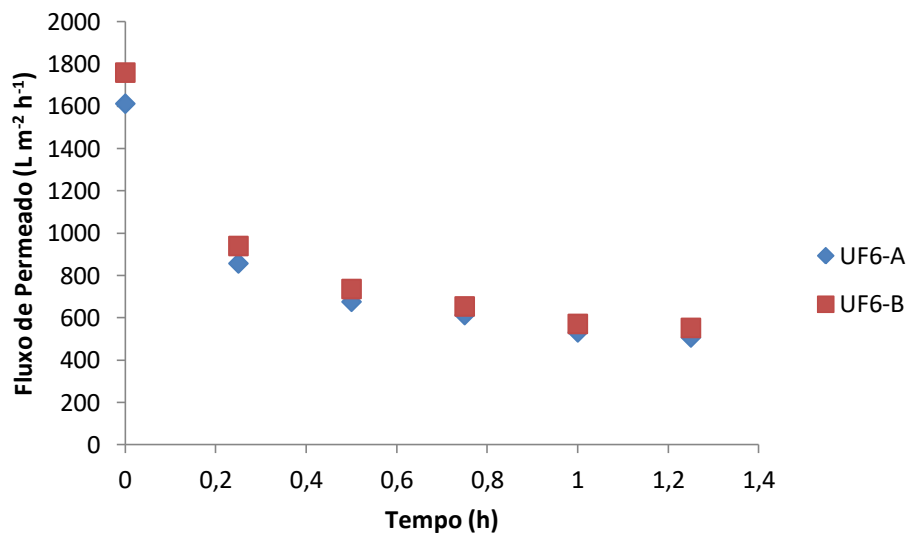


Figura A18. Determinação da permeância para a membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF6-A e UF6-B.

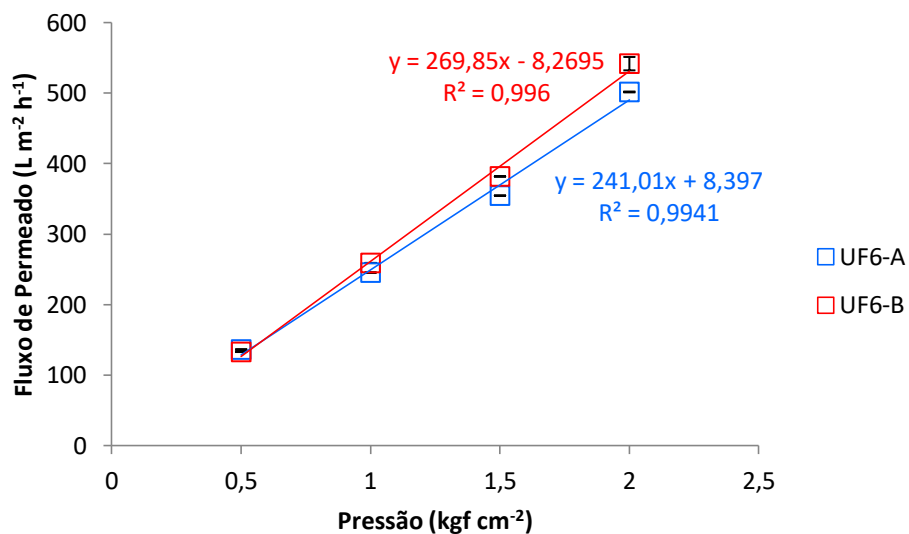


Figura A19. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF7-A e UF7-B.

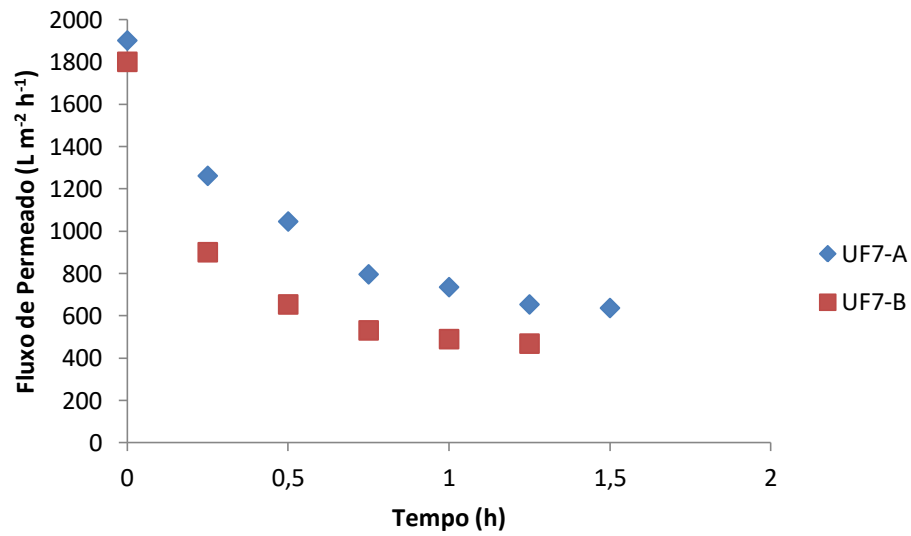


Figura A20. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF7-A e UF7-B.

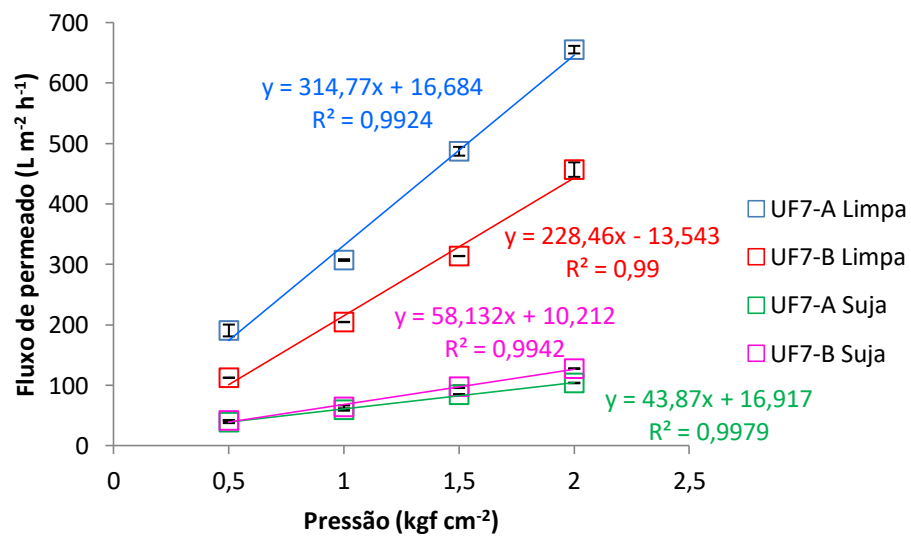


Figura A21. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF8-A e UF8-B.

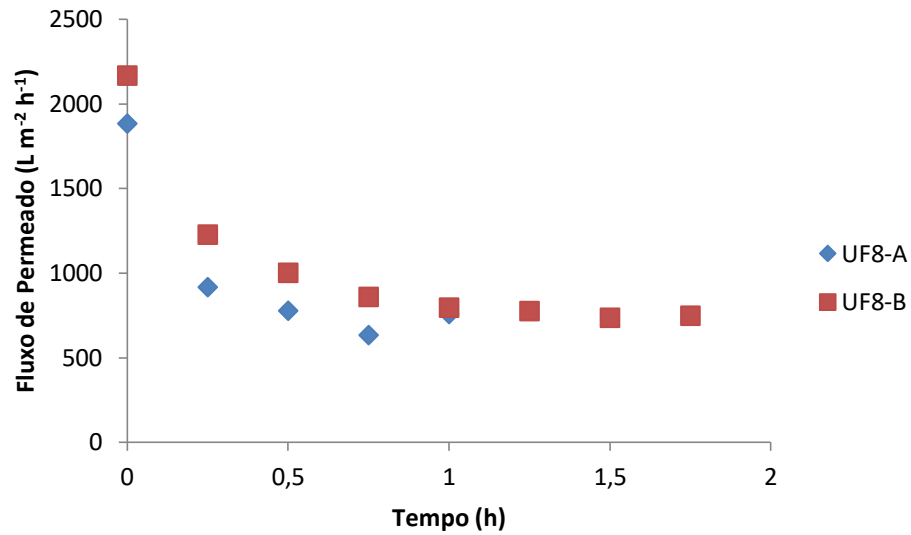


Figura A2246. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF8-A e UF8-B.

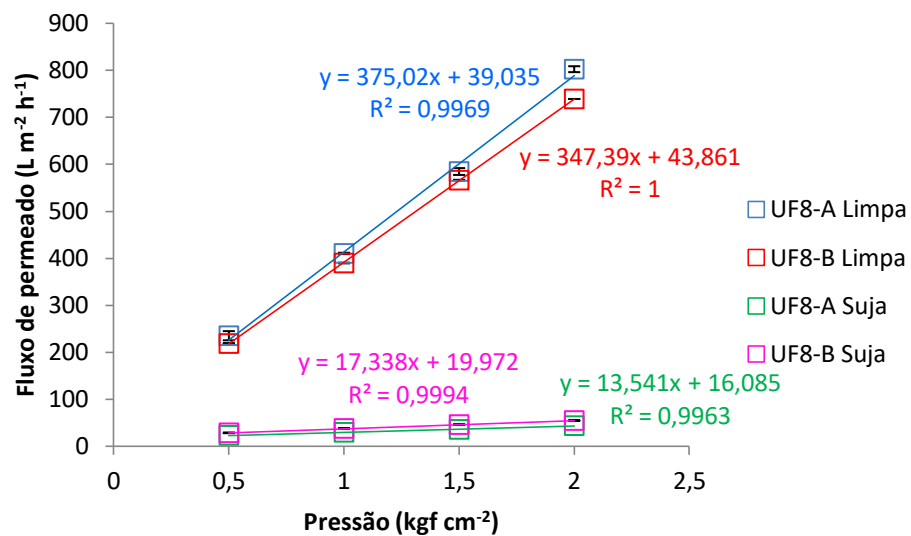


Figura A23. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF9-A e UF9-B.

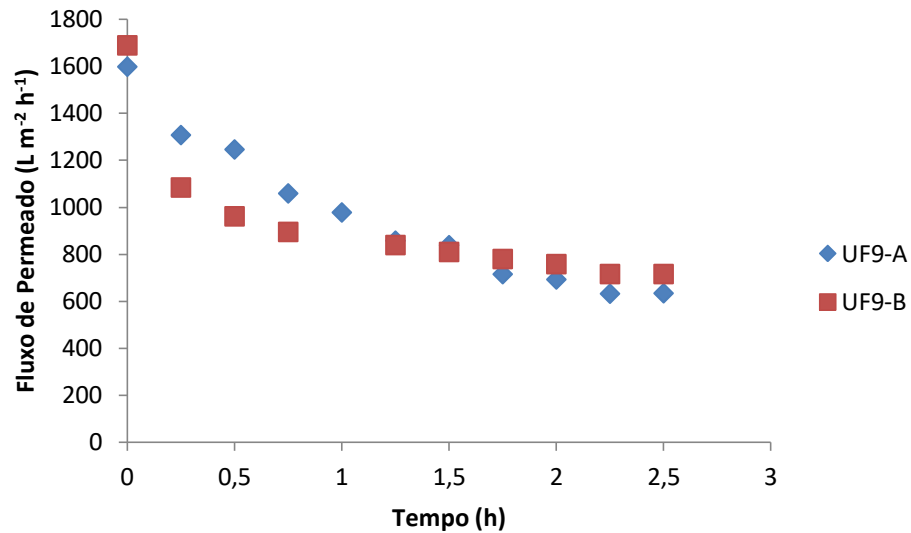


Figura A24. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF9-A e UF9-B.

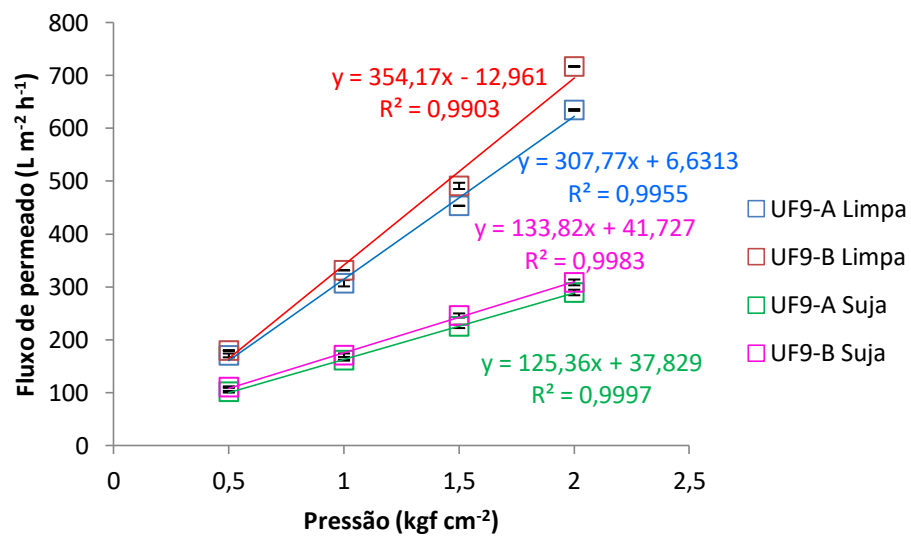


Figura A25. Compactação da membrana de ultrafiltração de 5 kDa, água destilada, T = 25 °C, P = 2,0 kgf cm⁻² e referente aos experimentos UF10-A e UF10-B.

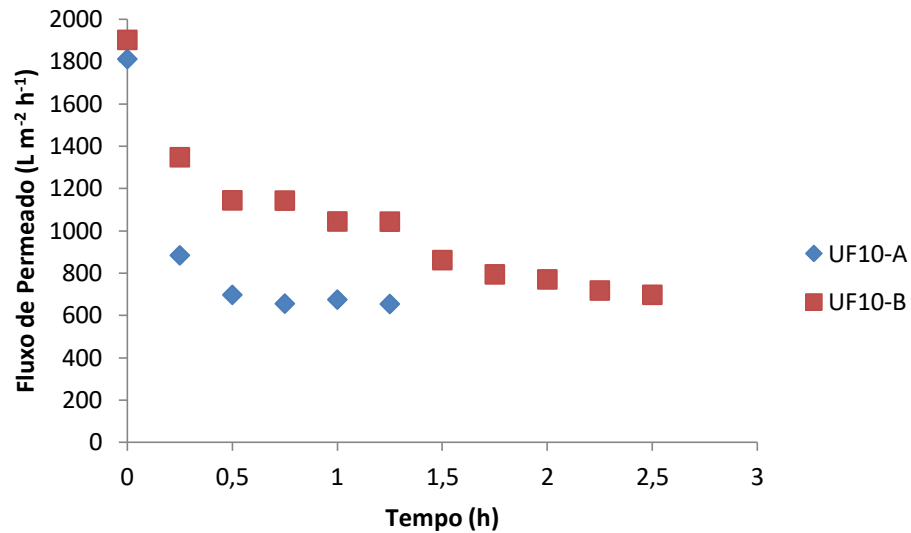
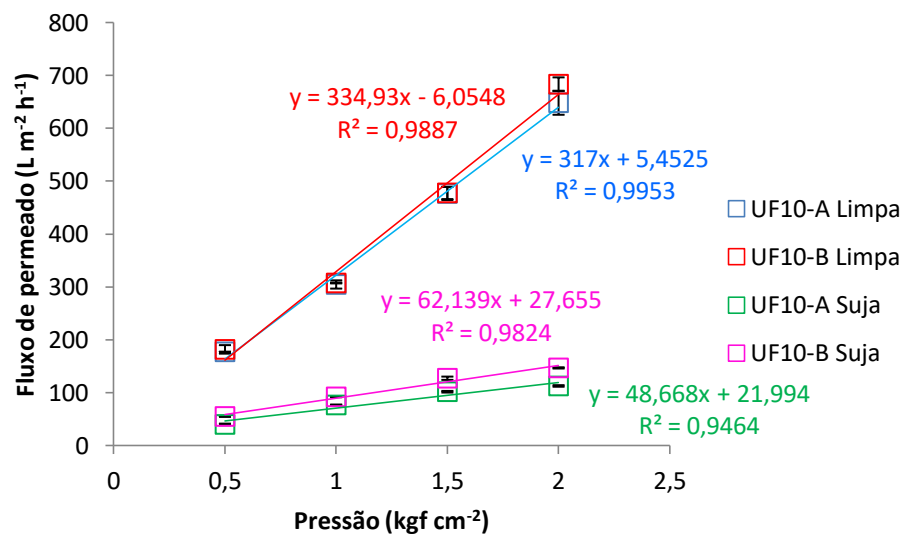


Figura A26. Determinação da permeância da membrana de ultrafiltração de 5 kDa antes e após a realização do experimento, água destilada, T = 25 °C e referente aos experimentos UF10-A e UF10-B.



Apêndice B

Dados dos experimentos de MF e UF.

B.1. Experimentos para determinar a pressão de operação com as membranas de MF.

Tabela B1. Fluxo de permeado durante a determinação da pressão de operação com membrana de MF,
T = 55 °C.

Pressão (kgf cm ⁻²)	Tempo (min)	Fluxo (L m ⁻² h ⁻¹)					
		MF1-A	MF1-B	MF2-A	MF2-B	MF3-A	MF3-B
0,25	5	28,85	18,40	50,55	31,88	43,87	34,53
	10	28,88	13,80	31,88	23,95	31,95	23,96
	15	28,92	11,85	21,27	18,61	31,95	18,58
	20	27,66	10,54	19,51	15,90	31,87	13,98
	25	23,67	10,12	14,20	7,98	31,83	12,38
	30	24,28	7,88	12,61	8,86	31,86	12,38
0,5	35	15,74	11,13	10,64	10,65	31,95	11,50
	40	13,11	10,51	7,97	7,09	32,02	10,65
	45	11,39	10,50	7,97	10,17	31,95	10,19
	50	11,03	10,19	8,51	7,97	29,87	8,84
	55	10,04	9,87	6,91	8,87	27,80	8,84
	60	11,46	9,23	7,44	7,98	23,85	8,63
0,75	65	10,18	9,87	6,91	7,98	27,83	8,84
	70	9,53	10,47	7,44	8,63	27,88	7,97
	75	9,21	9,20	5,32	7,97	27,85	8,64
	80	7,88	9,21	6,38	5,32	25,94	7,98
	85	10,51	9,20	6,98	6,64	26,01	7,97
	90	9,53	8,87	-	6,38	27,92	7,96

B.2. Experimentos para determinar a pressão de operação com a membrana de UF.

Tabela B2. Fluxo de permeado durante a determinação da pressão de operação com membrana de UF, T = 55 °C.

Velocidade (m s ⁻¹)	Pressão (kgf cm ⁻²)	Tempo (min)	Fluxo (L m ⁻² h ⁻¹)					
			UF1-A	UF1-B	UF2-A	UF2-B	UF3-A	UF3-B
0,99	0,25	5	28,04	30,00	46,33	36,70	39,51	34,13
		10	27,29	25,92	46,42	40,97	44,96	44,81
		15	24,44	24,57	50,90	45,00	49,09	46,32
		20	27,26	24,52	54,55	46,85	49,15	43,64
		25	27,27	23,86	54,45	46,42	46,39	40,94
		30	22,49	24,57	52,99	43,64	43,64	39,55
1,2	0,5	35	28,64	28,00	59,87	43,61	54,61	43,66
		40	29,94	28,70	57,27	42,27	53,18	42,95
		45	28,68	25,25	61,27	43,64	49,09	39,55
		50	27,27	29,96	58,70	32,66	43,64	39,59
		55	27,39	26,02	57,24	27,27	43,61	32,73
		60	27,16	24,66	54,69	24,51	38,18	29,32
1,41	0,75	65	30,08	28,60	51,73	20,49	35,44	29,99
		70	30,02	29,30	51,93	18,43	32,71	25,94
		75	29,97	31,98	44,87	17,70	30,03	23,41
		80	29,86	30,05	38,10	16,34	24,59	27,25
		85	28,65	31,38	33,44	16,35	23,17	29,93
		90	28,65	27,27	30,04	16,35	21,77	38,20
1,59	1	95	29,94	32,01	26,40	16,21	20,46	-
		100	32,76	31,36	25,83	16,44	21,90	-
		105	27,30	32,76	23,19	16,33	15,67	-
		110	29,97	29,98	18,99	13,63	13,64	-
		115	30,02	32,69	20,43	13,61	15,01	-
		120	29,97	29,32	19,05	16,37	13,63	-

Tabela B3. Fluxo de permeado durante a determinação da pressão de operação com membrana de UF,
T = 55 °C.

Velocidade (m s ⁻¹)	Pressão (kgf cm ⁻²)	Tempo (min)	Fluxo (L m ⁻² h ⁻¹)					
			UF4-A	UF4-B	UF5-A	UF5-B	UF6-A	UF6-B
0,99	0,25	5	51,74	43,59	49,06	43,59	81,06	43,59
		10	54,45	46,39	51,20	57,30	79,81	70,26
		15	51,21	45,02	51,58	57,12	76,40	68,22
		20	49,16	40,86	55,91	51,82	76,27	68,10
		25	49,80	42,27	51,73	65,30	76,36	68,18
		30	51,82	40,93	51,63	63,63	76,40	67,53
1,2	0,5	35	65,49	55,26	59,87	59,97	109,85	100,98
		40	62,65	54,45	58,64	62,63	108,91	97,34
		45	58,67	51,73	57,19	61,36	111,63	95,30
		50	62,66	53,81	54,61	62,76	108,98	95,36
		55	60,00	54,43	55,20	58,70	108,86	95,25
		60	59,16	51,68	54,69	60,00	111,52	95,20
1,41	0,75	65	69,12	58,52	62,62	62,79	127,93	119,76
		70	68,09	59,96	60,13	63,34	118,56	117,19
		75	67,50	59,64	59,82	59,97	117,33	114,60
		80	62,76	59,97	59,87	59,97	116,53	111,76
		85	62,63	57,90	58,70	59,94	113,07	111,71
		90	62,62	59,87	60,07	59,19	115,66	114,30
1,59	1	95	70,84	64,13	59,57	67,82	135,09	120,76
		100	68,00	62,70	59,81	65,38	128,12	113,13
		105	66,82	62,65	56,62	65,29	119,86	111,69
		110	67,47	62,66	61,04	64,16	117,16	111,71
		115	68,00	62,73	55,85	60,10	114,55	106,36
		120	66,82	62,65	56,47	59,94	114,41	106,92

(Continua)

Velocidade (m s ⁻¹)	Pressão (kgf cm ⁻²)	Tempo (min)	Fluxo (L m ⁻² h ⁻¹)					
			UF4-A	UF4-B	UF5-A	UF5-B	UF6-A	UF6-B
1,77	1,25	125	73,64	-	60,03	66,64	-	-
		130	71,56	-	60,65	62,73	-	-
		135	72,15	-	59,94	65,38	-	-
		140	72,13	-	59,41	64,06	-	-
		145	72,35	-	57,10	61,46	-	-
		150	71,44	-	57,24	64,12	-	-

B.3. Experimentos utilizando a membrana de UF após a determinação da pressão de operação.

Tabela B4. Dados do fluxo de permeado para os experimento UF7-A e UF7-B, $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$,
 $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$.

Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	
	UF7-A	UF7-B
5	29,30	32,79
10	25,91	27,27
15	27,25	25,91
20	21,07	24,52
25	23,13	26,59
30	25,94	24,52
35	24,56	23,88
40	21,81	24,48
45	23,23	24,51
50	19,06	24,47
55	25,90	22,49
60	21,75	23,88
65	23,89	24,48
70	23,10	23,91
75	19,08	24,52
80	21,14	24,53
85	24,55	24,53
90	19,09	24,40
95	21,78	23,19
100	21,71	23,19
105	21,78	23,85
110	21,81	24,57
115	19,11	22,49
120	21,80	23,88
125	19,82	-

Tabela B5. Dados do fluxo de permeado para os experimento UF7-A e UF7-B, $P = 0,25 \text{ kgf cm}^{-2}$,
 $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, $v = 0,99 \text{ m s}^{-1}$.

Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	
	UF8-A	UF8-B
0	47,78	56,62
5	46,39	51,79
10	42,29	49,07
15	40,82	49,01
20	47,07	47,73
25	46,39	46,36
30	42,32	42,95
35	38,12	38,24
40	31,36	34,13
45	29,93	32,73
50	25,92	29,97
55	24,58	27,31
60	20,39	21,18
65	19,11	19,79
70	16,25	17,02
75	13,56	16,38
80	16,37	16,36
85	16,39	13,61
90	11,83	13,54
95	10,91	-
100	10,90	-
105	10,90	-
110	11,05	-
115	11,76	-

Tabela B6. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF9-A, $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$,
 $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$.

Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado	Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado
0	65,50		120	78,20	
5	57,06		125	79,09	
10	54,49		130	79,09	
15	54,40		135	76,21	
20	54,45		140	73,56	DF2
25	54,57		145	77,73	
30	54,66	Pré-DF	150	73,45	
35	51,82		155	75,76	
40	53,50		160	75,64	
45	53,16		165	81,64	
50	51,79		170	81,90	
55	54,55		175	78,76	
60	54,55		180	83,18	
65	65,32		185	81,82	DF3
70	67,64		190	82,12	
75	62,70		195	81,38	
80	68,18		200	81,78	
85	70,40		205	81,78	
90	66,82	DF1	210	84,59	
95	67,66		215	85,31	
100	65,52		220	85,91	
105	67,47		225	85,67	
110	68,15		230	85,55	DF4
115	69,58		235	81,95	
			240	86,87	
			245	84,36	
			250	84,71	

Tabela B7. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF9-B, $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$,
 $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$.

Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado	Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado
0	63,06		95	85,53	
5	80,41		100	84,36	
10	78,32		105	91,03	
15	75,14		110	91,36	
20	75,20		115	91,32	DF2
25	74,88	Pré-DF	120	90,05	
30	72,19		125	86,59	
35	70,98		130	84,59	
40	69,55		135	94,09	
45	65,35		140	96,87	
50	79,13		145	98,18	
55	78,92		150	97,44	DF3
60	84,76		155	96,58	
65	84,86		160	92,39	
70	83,18	DF1	165	92,93	
75	81,76		170	92,68	
80	79,21		175	97,57	
85	78,41		180	98,33	
90	73,98		185	100,96	
			190	98,13	DF4
			195	97,50	
			200	94,14	
			205	92,82	

Tabela B8. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF10-A, $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$,
 $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$.

Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado	Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado
0	106,47		105	97,06	
5	116,36		110	100,86	
10	121,36	Pré-DF	115	100,18	
15	117,27		120	98,03	
20	108,30		125	101,01	DF3
25	103,58		130	98,28	
30	102,22		135	95,36	
35	100,86		140	95,45	
40	100,91		145	97,34	
45	102,15	DF1	150	98,13	
50	100,86		155	99,50	
55	100,08		160	100,79	
60	96,58		165	99,50	
65	95,50		170	95,11	
70	98,76		175	96,09	DF4
75	96,66		230	85,55	
80	97,46		235	81,95	
85	98,23	DF2	240	86,87	
90	96,87		245	84,36	
95	99,37		250	84,71	
100	95,41				

Tabela B9. Dados do fluxo de permeado para o experimento UF10-B, $P = 0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$, $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$,
 $v = 1,2 \text{ m s}^{-1}$.

Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado	Tempo (min)	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Permeado
0	63,06		95	85,53	
5	80,41		100	84,36	
10	78,32		105	91,03	
15	75,14		110	91,36	
20	75,20		115	91,32	DF2
25	74,88	Pré-DF	120	90,05	
30	72,19		125	86,59	
35	70,98		130	84,59	
40	69,55		135	94,09	
45	65,35		140	96,87	
50	79,13		145	98,18	
55	78,92		150	97,44	DF3
60	84,76		155	96,58	
65	84,86		160	92,39	
70	83,18	DF1	165	92,93	
75	81,76		170	92,68	
80	79,21		175	97,57	
85	78,41		180	98,33	
90	73,98		185	100,96	
			190	98,13	DF4
			195	97,50	
			200	94,14	
			205	92,82	

Apêndice C

Determinação do pH e condutividade elétrica das soluções iniciais utilizadas nos experimentos de MF e UF.

Tabela C1. Condutividade elétrica e pH das soluções iniciais utilizadas nos experimentos de MF e UF.

Experimento	pH	Condutividade elétrica (mS cm⁻¹)*	Solução
MF1-A	4,00	-	Isolado proteico 6 %
MF1-B	4,04	-	Isolado proteico 6 %
MF2-A	4,04	-	Isolado proteico 6 %
MF2-B	4,03	-	Isolado proteico 6 %
MF3-A	4,02	-	Soro de leite 6 %
MF3-B	4,03	-	Soro de leite 6 %
UF1-A	6,38	3,22	Soro de leite 6 %
UF1-B	6,35	3,17	Soro de leite 6 %
UF2-A	4,01	-	Sobrenadante
UF2-B	4,00	-	Sobrenadante
UF3-A	3,03	13,54	Sobrenadante
UF3-B	3,03	13,21	Sobrenadante
UF4-A	6,99	29,2	Sobrenadante
UF4-B	6,98	31,2	Sobrenadante
UF5-A	10,02	33,2	Sobrenadante
UF5-B	9,99	32,2	Sobrenadante

*Algumas soluções não tiveram a condutividade elétrica medida.

(Continua)

Experimento	pH	Condutividade elétrica (mS cm⁻¹)*	Solução
UF6-A	9,99	21,9	Sedimentado Ressolubilizado
UF6-B	9,98	21,6	Sedimentado Ressolubilizado
UF7-A	6,42	3,22	Soro de leite 6 %
UF7-B	6,36	3,22	Soro de leite 6 %
UF8-A	3,96	19,32	Sobrenadante
UF8-B	3,94	19,25	Sobrenadante
UF9-A	10,05	32,3	Sobrenadante
UF9-B	9,99	34,3	Sobrenadante
UF10-A	10,12	22,7	Sedimentado Ressolubilizado
UF10-B	10,03	21,9	Sedimentado Ressolubilizado

*Algumas soluções não tiveram a condutividade elétrica medida.

Apêndice D

Curvas de calibração utilizadas para determinar a concentração de proteínas pelo método de Lowry.

Figura D1. Primeira curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas.

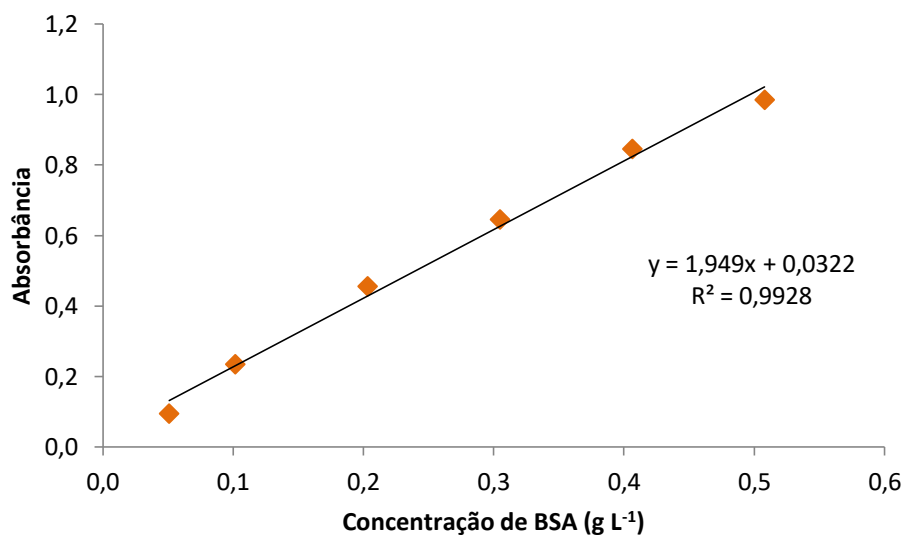


Figura D2. Segunda curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas.

