

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

**Concentração e Purificação das Proteínas do
Soro de Queijo por Ultrafiltração**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jaqueline Rodrigues Boschi

Porto Alegre

2006

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

Concentração e Purificação das Proteínas do Soro de Queijo por Ultrafiltração

Jaqueline Rodrigues Boschi

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

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Keiko Wada

Co-orientador:
Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Tessaro

Porto Alegre

2006

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Concentração e Purificação das Proteínas do Soro de Queijo por Ultrafiltração*, elaborada por Jaqueline Rodrigues Boschi, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña

Prof^ª. Dr^ª. Talita Furlanetto Mendes

Prof^ª. Dr^ª. Lígia Damasceno Ferreira Marczak

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Jesus Cristo, que meu deu muita força de vontade, tranquilidade e coragem para continuar a conclusão quando não parecia haver uma luz no fim do “túnel”.

Ao meu bolsista voluntário Alan Ambrosi por toda sua dedicação e força de vontade em aprender e contribuir para a conclusão do mesmo e principalmente por suas horas de trabalho realizadas nas madrugadas.

À Sirley Secchi por toda sua dedicação em me ajudar com seu grande conhecimento técnico e no seu empenho de adquirir o material do laboratório necessário para desenvolver minhas análises. Além de poder desabafar nas horas mais necessária, quando ocorria algum problema se tornando minha amiga.

Ao meu noivo Rodrigo Zamora Wilke por acreditar na minha capacidade e inteligência em concluir essa dissertação sendo a pessoa que mais acredito, confio e amo.

Às minhas amigas de coração Emmanuelle de Almeida Marcinkowski e Florencia Cladera por seus conhecimentos na área de alimentos e, principalmente, por poder contar em todos os momentos na vida profissional e pessoal.

Ao meu colega Marcus Darci por me ensinar a utilizar as ferramentas computacionais e equipamentos, enfim, a sua “paciência”.

Aos meus pais Irajá e Ieda, sem eles, eu com certeza não teria conquistado tudo que já consegui na vida.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFRGS, que proporcionou recursos humanos e materiais, indispensáveis à minha formação.

À empresa Elegê Alimentos pelo apoio técnico e à CAPES pela bolsa de mestrado.

Às professoras Isabel Cristina Tessaro e Keiko Wada pela orientação.

Deus

Passei tanto tempo Te procurando...

Olhava para o infinito, mas não Te via...

E pensava comigo mesmo:

Será que Tu existes?

Não me contentava e prosseguia, tentando

Te encontrar nas religiões e pastores

E não Te encontrei.

Senti-me só, vazio, desesperado e descrente.

E, na descrença, Te ofendi.

E, na ofensa, tropecei.

E, no tropeço, caí.

E, na queda, senti-me fraco.

Fraco, procurei socorro.

E, no socorro, encontrei amigos.

E, nos amigos, encontrei carinho.

E, no carinho, vi nascer o amor.

Com amor, eu vi um mundo novo.

E, no mundo novo, resolvi viver.

O que recebi, resolvi doar.

Doando alguma coisa, muito recebi.

E, recebendo, senti-me feliz.

E, ao ser feliz, encontrei a paz.

E, tendo paz, foi que enxerguei

Que tu estavas dentro de mim.

E, sem procurar-Te, foi que Te achei.

Na Moita

Resumo

O processamento do leite visando a produção de queijo resulta num grande volume de soro, aposto cada litro de leite processado são gerados de 0,6 a 0,9 litros de soro. O soro de queijo é considerado como uma importante fonte de proteínas que podem ser utilizadas para o consumo humano e, assim, justifica o interesse sobre a possibilidade de reutilizá-lo comercialmente. Por outro lado, devido a sua elevada carga orgânica este não pode ser descartado diretamente no solo ou no leito de rios e, portanto, a sua reutilização elimina o problema ambiental causado pelo descarte deste efluente. A tecnologia de separação por membrana, especialmente a ultrafiltração (UF), está sendo empregada atualmente nas indústrias de laticínios para a obtenção de concentrados protéicos a partir do soro, os quais, dependendo do grau de pureza, são utilizados na fabricação de produtos lácteos, embutidos, pães, chocolates, biscoitos e bebidas, entre outros. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho é concentrar e isolar as proteínas do soro de queijo por UF e, para agregar maior valor ao concentrado protéico, utilizou-se a diafiltração (DF). Os experimentos foram realizados em um sistema piloto, com uma membrana de UF com massa molar de corte de 10 kDa. As seguintes condições de operação foram mantidas na UF constantes em todos os experimentos: temperatura de 50°C, pressão transmembrana de 2 bar e vazão de alimentação de 850 L. h⁻¹. O soro de queijo foi reconstituído a partir do soro em pó fornecido por uma indústria de laticínios da região e pré-filtrado em um filtro de cartucho com tamanho de poro nominal de 1µm para prevenir o *fouling* por material em suspensão. Os seguintes parâmetros foram avaliados durante o processo de concentração e purificação das proteínas do soro: fluxo de água pura, fluxo permeado da solução, pH, condutividade elétrica, concentrações de proteína, lactose e sólidos totais. Para dar um tratamento matemático aos resultados experimentais, foi desenvolvido um programa computacional, usando software MATLAB ® versão 5.3, o qual permite a otimização do processo de purificação da proteína usando DFs. Os resultados obtidos indicaram que este processo é adequado para obtenção de concentrado protéico com diferentes graus de pureza, a fim de atender o mercado para diversas aplicações.

Abstract

Milk processing for cheese production results in a great volume of whey: 0,6 to 0,9 liters of whey are generated for each liter of processed milk. Cheese whey is considered an important source of proteins for human consumption, and the increasing world production justifies the interest in studies aiming its commercial use. On the other hand, due to its high organic load, it is unacceptable to discard cheese whey directly to the soil or rivers, and therefore its utilization eliminates the environmental problem caused by this effluent. Membranes separation technology, especially ultrafiltration (UF), has being used in the dairy industry to obtain whey protein concentrates, which, according to the degree of purity attained, may be applied in the production of dairy products, sausages, breads, chocolates, cookies and beverages, among others. In this context, the objective of this work is to concentrate and purify cheese whey protein by ultrafiltration and diafiltration (DF) was used in order to add greater value to the protein concentrate. Experiments were carried out in a pilot plant using an ultrafiltration membrane of 10 kDa molecular weight cut. Operating conditions were kept constant in all experiments: temperature of 50°C, transmembrane pressure of 2 bar and feed flow rate of 850 L. h⁻¹. Powdered cheese whey supplied by a local dairy industry was reconstituted and filtrated through a cartridge filter with 1µm nominal pore size to prevent fouling caused by suspended solids. The following parameters were evaluated during the concentration process and purification of the whey proteins: pure water flux, permeate flux, pH, electric conductivity, protein, lactose and total solids concentrations. Experimental results were used to develop an optimization routine in the software MATLAB® version 5.3, in order to optimize the protein purification process by DF. Results indicate that this process is well adapted for obtaining whey protein concentrates with different degrees of purity, in order to suit several applications.

Sumário

Resumo	VI
Abstract	VII
Sumário	VIII
Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XII
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XIII
Introdução	1
Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Processos de separação por membranas	4
2.1.1 Membranas	6
2.2 Aplicação de PSM na indústria de laticínios	7
2.3 Princípios de UF	12
2.3.1 Membranas de UF	15
2.3.2 Módulos de UF	16
2.3.3 Fatores que afetam o desempenho do processo de UF.....	18
2.3.3.1 Fouling.....	19
2.3.3.2 Polarização por concentração	20
2.4 O soro de queijo.....	21
2.4.1 Proteínas do soro de queijo.....	25
2.4.2 Processamento do soro de queijo por PSMs.....	27
2.4.3 Produtos derivados do soro de queijo e respectivas aplicações.....	28
Materiais e Métodos	32
3.1 Solução de Soro de Queijo Ácido.....	32
3.2 Reagentes Analíticos	33
3.3 Membrana de UF.....	34
3.4 Equipamento.....	35
3.5 Métodos Analíticos.....	38
3.5.1 Análise de Concentração de Proteína – Método de Kjeldahl	38
3.5.2 Análise de Concentração de Lactose por Cromatografia Líquida (HPLC) ..	39
3.5.3 Análise de pH	40
3.5.4 Análise de Condutividade Elétrica	40
3.5.5 Análise de Extrato Seco Total	40
3.6 Limpeza do Sistema de Membranas.....	40
3.7 Metodologia Experimental	41
3.7.1 UF do Soro de Queijo.....	41
3.7.2 DF do Soro de Queijo.....	42

3.8 Otimização do processo de purificação	43
Resultados e Discussão	44
4.1 Escolha e determinação das condições de operação para os processos UF e DF..	44
4.1.1 Pressão transmembrana de operação	44
4.1.2 Temperatura de processo	45
4.1.3 Vazão de alimentação de UF e DF	46
4.2 Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo.....	46
4.2.1 Experimentos de concentração das proteínas do soro de queijo	47
4.2.2 Experimentos de purificação das proteínas do soro de queijo.....	49
4.3 Limpeza e sanitização do equipamento	54
4.4 Análise da variação do fluxo permeado com as concentrações dos componentes do soro	55
4.4.1 Variação de fluxo permeado com teor de proteínas	55
4.4.2 Variação de fluxo permeado com teor de sólidos totais.....	56
4.4.3 Variação de fluxo permeado com teor de lactose.....	58
4.4.4 Variação do fluxo permeado com teor de sais.....	60
4.4.5 Variação de fluxo permeado com pH.....	61
4.4.6 Variação de fluxo permeado com as concentrações dos componentes permeáveis no concentrado	61
4.4.7 Equações empíricas do fluxo permeado da UF e DFs com teor de proteína	63
Modelagem	65
5.1 Otimização do processo de purificação	65
Conclusões e Sugestões.....	76
6.1 Conclusões.....	76
6.2 Sugestões	77
Referências Bibliográficas	78
Apêndice A - Dados Experimentais	86
Apêndice B - Resultados da Otimização para o processo de purificação das proteínas do soro de queijo	96
Anexo A - Metodologia Analítica	101

Lista de Figuras

Figura 2.1: Aplicação dos PSM para separação de componentes do leite em função do seu tamanho.	7
Figura 2.2: Representação esquemática da filtração tangencial do soro na membrana de UF	13
Figura 2.3: Esquema do módulo de UF.	18
Figura 2.4: Fluxograma da produção de queijo mussarela.....	24
Figura 2.5: Fluxograma da produção de soro de queijo em pó.	25
Figura 3.1: Fotografia do módulo da membrana de UF.....	35
Figura 3.2: Fotografia da unidade piloto de UF.	36
Figura 3.3: Representação esquemática da unidade piloto de UF.....	36
Figura 3.4: Representação esquemática do processo de UF.	42
Figura 3.5: Representação esquemática do processo de DFs.....	43
Figura 4.1: Fluxo permeado de água e soro com diferentes pressões.	45
Figura 4.2: Fluxo permeado de água com tempo durante a compactação da membrana de UF.	47
Figura 4.3: Fluxo permeado de soro com tempo.....	48
Figura 4.4: Fluxo permeado de soro em função do fator de concentração.	49
Figura 4.5: Fluxo permeado nas diafiltrações de concentrado de soro com tempo.	50
Figura 4.6: Retenção dos componentes do soro com o tempo.	53
Figura 4.7: Fluxo permeado do Experimento 1 versus concentração de proteína no concentrado.....	56
Figura 4.8: Variação de fluxo permeado do Experimento 2 com concentração de proteína no concentrado.....	56
Figura 4.9: Variação de fluxo permeado do Experimento 1 com o percentual de sólidos totais no concentrado.....	57
Figura 4.10: Fluxo permeado do Experimento 2 com o percentual de sólidos totais no concentrado.....	58
Figura 4.11: Fluxo permeado no Experimento 1 com a concentração de lactose.....	59
Figura 4.12: Fluxo permeado no Experimento 2 com a concentração de lactose.....	59
Figura 4.13: Variação de fluxo permeado do Experimento 1 com a condutividade elétrica.	60
Figura 4.14: Variação de fluxo permeado do Experimento 2 com a condutividade elétrica.	61
Figura 4.15: Fluxo permeado do Experimento 1 com os componentes permeáveis no concentrado.....	62
Figura 4.16: Fluxo permeado do Experimento 2 com os componentes permeáveis no concentrado.....	62
Figura 4.17: Fluxo permeado da UF do Experimento 1 e Experimento 2 em função da concentração de proteína.	63
Figura 4.18: Fluxo permeado do Experimento 1 e Experimento 2 com a primeira e segunda DFs em função da concentração de proteína.....	64
Figura 5.1: Curva de otimização para 30 L de soro.	71
Figura 5.2: Tempo total do processo de purificação com DF em função do número de DFs.	72
Figura 5.3: Volume ótimo de água em função do número de DFs.	73
Figura 5.4: Fração mássica de proteína no produto obtido com volume ótimo de água..	73

Figura 5.5: Concentração de proteína no sistema em função do tempo para 4 DFs.....	74
Figura 5.6: Concentração de proteína no sistema em função do tempo com 10 DFs.....	74
Figura A.1: Curva de calibração do HPLC com as concentrações de lactose.....	94
Figura A.2: Curva padrão do método HPLC com as respectivas concentrações.....	95

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Classificação dos PSMs relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação.	5
Tabela 2.2: Comparação da produção de diferentes queijos através de processos tradicional e com uso de UF para cada 100.000 kg de leite.	12
Tabela 2.3: Composição do leite e dos soros doce e ácido.	22
Tabela 2.4: Composição do soro ácido.	23
Tabela 2.5: Propriedades e concentração das proteínas do soro de queijo.....	26
Tabela 2.6: Composição típica de concentrados e isolados protéicos.....	28
Tabela 3.1: Características físico-químicas do soro em pó.	32
Tabela 3.2: Características nutricionais do soro em 100 g.....	33
Tabela 3.3: Reagentes utilizados, grau de pureza e fornecedor.	34
Tabela 3.4: Informações técnicas da membrana de UF.....	35
Tabela 4.1: Variação do fluxo permeado do soro de queijo com a vazão de alimentação na pressão transmembrana de 2 bar.....	46
Tabela 4.2: Características do concentrado e do permeado do Experimento 1.....	51
Tabela 4.3: Características do concentrado e do permeado do Experimento 2.....	52
Tabela 4.4: Medidas de fluxo de água após enxágüe em cada etapa da limpeza química.	54
Tabela A.1: Experimento 1, dados da determinação de proteínas.....	86
Tabela A.2: Experimento 1, dados da determinação dos sólidos totais.....	87
Tabela A.3: Experimento 1, dados da determinação da lactose.	88
Tabela A.4: Experimento 1, dados da determinação da condutividade elétrica.	89
Tabela A.5: Experimento 1, dados da determinação do pH.	89
Tabela A.6: Experimento 2, dados da determinação de proteínas.....	90
Tabela A.7: Experimento 2, dados da determinação dos sólidos totais.....	91
Tabela A.8: Experimento 2, dados da determinação da lactose.	92
Tabela A.9: Experimento 2, dados da determinação da condutividade elétrica.	93
Tabela A.10: Experimento 2, dados da determinação do pH.....	93

Lista de Abreviaturas e Símbolos

α -La	alfa-lactolbumina
β -Lg	beta-lactoglobulina
A	área da membrana de UF (m ²)
BSA	albumina do soro bovino
C	custo médio do tratamento de efluente (R\$ 0,45. m ⁻³)
C_a	concentração da água + pseudo-componente (g. L ⁻¹)
C_b	concentração da alimentação (g. L ⁻¹)
C_f	concentração de soluto na alimentação (g. L ⁻¹)
C_i	concentração do componente i (g. L ⁻¹)
C_o	concentração inicial do componente i (g. L ⁻¹)
C_p	concentração de soluto no permeado (g. L ⁻¹)
CPS	concentrado protéico de soro
C_{sl}	concentração de pseudo-componente (g. L ⁻¹)
C_w	concentração das macromoléculas (g. L ⁻¹)
DF	diafiltração
$\frac{dm_a}{dt}$	variação da massa da solução do tanque com tempo de processo (kg. h ⁻¹)
$\frac{dm_{sl}}{dt}$	variação da massa de pseudo-componente do tanque com tempo de processo
$\frac{dv}{dt}$	variação do volume do tanque com tempo de processo (L. h ⁻¹)
DQO	demanda química de oxigênio (g O ₂ . L ⁻¹)
ED	eletrodialise
F	função objetivo
FC	fator de concentração
G	consumo total do processo (R\$)
G_1	consumo de energia elétrica (R\$. (kWh) ⁻¹)
G_2	consumo de tratamento de efluente (R\$. m ⁻³)
G_3	consumo de água adicionada (R\$. L ⁻¹)
G_4	consumo associado ao processo de secagem (R\$. kg ⁻¹)
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência

Ig	imunoglobulina
IPS	isolado protéico de soro
J_p	fluxo de permeado ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$)
MF	microfiltração
m_{H_2O}	massa de água evaporada (kg)
MMC	massa molar de corte (kDa)
NF	nanofiltração
OI	osmose inversa
P	preço da água (R\$ 2,00. m^{-3})
PC	polarização por concentração
$P_{consumida}$	potência consumida ($kW \cdot h^{-1}$)
P_f	preço final do produto (R\$)
PI	ponto isoelétrico
PSM	processo de separação por membranas
P_{vapor}	preço da água evaporada (R\$ 0,20. kg^{-1})
R	coeficiente de rejeição/retenção
ST	sólidos totais (%)
t	tempo (h)
UF	ultrafiltração
v	volume do permeado (L)
$V_{efluente}$	volume do efluente (m^3)
V_F	volume permeado da solução (L)
V_o	volume inicial da solução (L)
V_R	volume do retido (L)

Capítulo 1

Introdução

Os processos de separação por membranas (PSM) vêm sendo utilizadas nas indústrias com a finalidade de separar, purificar ou concentrar determinados componentes da mistura de interesse. A ultrafiltração vem sendo empregada nas indústrias de laticínios, principalmente na recuperação de produtos como as proteínas do soro de queijo e no seu fracionamento. A ultrafiltração permite uma variação na relação de concentração entre os vários componentes do soro, devido à retenção seletiva de proteína e outros materiais coloidais, retenção parcial de compostos nitrogenados mais simples e da permeação da lactose, sais minerais e outros compostos com menor massa molar.

O soro de queijo constitui-se no líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite durante a fabricação de queijo. Este subproduto representa cerca de 80% a 90% do volume de leite utilizado e retém 55% dos nutrientes do leite, sobretudo lactose (4,5-5% w. v⁻¹), proteínas solúveis (0,6-0,8% w. v⁻¹), lipídios (0,4-0,5% w. v⁻¹), e sais minerais (8-10% do extrato seco). Contudo, devido a sua baixa concentração de matéria sólida (6-7% w. v⁻¹), o soro de queijo é normalmente considerado um efluente (RECH, 2003).

O descarte do soro direto ou indiretamente nos cursos dos rios, sem qualquer tipo de tratamento gera um grande problema ambiental, pois o potencial poluidor do soro de queijo é aproximadamente cem vezes maior que o esgoto doméstico, ou seja, cada 1000 L de soro não tratado por dia equivale uma poluição diária de 470 pessoas. Essa poluição é causada por sua elevada demanda química de oxigênio (DQO) em torno de 50.000 a 60.000 mg de O₂. L⁻¹ que ultrapassa o limite máximo permitido de acordo com as normas ambientais, dependendo do processo utilizado na elaboração do queijo (MOSQUIM *et al.*, 1999). Industrialmente, o soro pode ser processado mediante diversas técnicas, tais como a filtração, centrifugação, evaporação, secagem, ultrafiltração, osmose inversa, tratamento térmico, fermentação, desmineralização e cristalização, entre outras.

Apesar do conhecimento deste fato, por muito tempo, o soro foi descartado como um efluente ou mesmo usado *in natura* na alimentação de animais em fazendas, sobretudo porcos. Portanto, o não-aproveitamento do soro traz o problema de contaminação do meio ambiente e, por esse motivo, vem se exigindo das indústrias o seu tratamento antes do seu descarte.

O desenvolvimento de novas tecnologias capazes de solucionar o problema do soro de queijo pode trazer benefícios econômicos e ambientais, pois o soro é considerado uma importante fonte de proteína a ser utilizada para consumo, assim, justificam-se estudos sobre a possibilidade de utilizá-lo comercialmente.

As proteínas do soro, isoladas (purificadas) ou não, têm elevado valor funcional e nutricional não-encontrado noutras proteínas comumente utilizadas como aditivos na indústria alimentícia, por isso tem havido um crescente interesse na sua recuperação. Dentre as principais proteínas do soro destacam-se as betalactoglobulina (β -Lg), alfa-lactalbumina (α -La), albumina do soro bovino (BSA) e imunoglobulinas (Ig). Outras proteínas, embora em menores proporções, também estão presentes: lactoferrina, lisozima e peptídios derivados da caseína.

Durante as últimas décadas foram desenvolvidos processos em escala industrial para produzir concentrado protéico de soro (CPS) e isolado protéico de soro (IPS) de elevado grau funcional e conteúdo protéico variável, entre 35% e 90%, e amplo uso como ingrediente para realçar as características de coagulação, geleificação e emulsificação dos mais diversos produtos. O IPS pode ser aplicado em alimentos lácteos e não lácteos, cosméticos e em indústrias medicinais, de acordo com Rossano *et al.* (2001), por sua vez o CPS pode ser utilizado para fabricação de requeijão cremoso *light*, substituindo parcialmente a gordura, segundo Silva e Van Dender (2005), na conservação de carnes, na incorporação de proteínas para a produção de vários tipos de queijos moles, semiduros e duros, segundo Hinrichs (2001), em produtos extrusados a base de milho, batata e arroz, conforme Onwulata *et al.* (2001), e em iogurtes, sorvetes e bebidas.

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

Neste contexto, a ultrafiltração, UF, se apresenta como um método alternativo bastante atraente, uma vez que não faz uso do calor e não envolve mudança de fase, o que torna o processo de concentração mais econômico. A UF é um PSM tipicamente usado para reter macromoléculas como as proteínas do soro de queijo, permitindo que pequenas moléculas de baixa massa molar, tais como lactose, sais e água atravessem livremente a membrana.

Portanto, além da remoção de água, a UF é capaz de reduzir o teor de sais e de lactose, desde que a membrana seja escolhida adequadamente.

Nas aplicações industriais a UF pode ser conduzida no modo de operação chamada de diafiltração, DF. A DF é uma Operação Unitária, que consiste na adição contínua de água ao concentrado da UF para promover uma remoção mais eficiente de contaminantes de menor massa molar, no caso do soro, a lactose e os sais minerais.

O objetivo deste trabalho foi recuperar as proteínas do soro de queijo através da UF e posterior purificação do concentrado protéico por DF procurando aumentar ainda mais o valor agregado ao produto. Neste trabalho a DF é usada como o modo de eliminar os componentes das proteínas do soro de queijo como os sais e lactose o que propicia a purificação destas proteínas, sendo os sais e lactose considerados impurezas

Neste trabalho, os experimentos foram realizados em uma unidade piloto de UF, utilizando-se membranas poliméricas com massa molar de corte de 10 kDa em módulos em espiral.

No Capítulo 2 são apresentados os fundamentos teóricos dos PSMs, enfocando o processo de UF em membrana espiral, sua aplicação na concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por UF e DF. Incluindo-se, também, uma revisão bibliográfica sobre emprego dos PSMs nas indústrias de laticínios, caracterização do soro de queijo e sua composição e ,finalmente, as aplicações dos componentes do soro em diversos alimentos.

No Capítulo 3 são apresentados os produtos químicos e equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho experimental. Também são descritos os métodos de análise e a metodologia experimental adotada em cada etapa do trabalho.

No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos experimentalmente.

No Capítulo 5 são apresentadas equações utilizadas no desenvolvimento de modelagem matemática do processo, capaz de prever as melhores condições operacionais.

No Capítulo 6 são apresentadas as conclusões sobre os resultados obtidos e as sugestões para trabalhos futuros nessa área.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre as características do soro de queijo, fundamentos teóricos sobre os PSM, assim como os fatores que afetam a eficiência das membranas, como o *fouling*. Também foi realizada uma revisão de trabalhos publicados nessa linha de pesquisa sobre o aproveitamento do soro de queijo através do uso de membranas como a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF), osmose inversa (OI), eletrodialise (ED) e o emprego de diafiltração (DF). Tendo em vista o objetivo deste trabalho, é dada ênfase ao emprego da UF entre os PSM.

2.1 Processos de separação por membranas

Os processos de separação por membranas, PSMs, são operações que utilizam membranas no fracionamento de misturas, soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes, com o objetivo de separar, purificar ou concentrar as substâncias presentes. As membranas devem apresentar características específicas conforme a separação desejada. As propriedades de separação das membranas dependem de fatores como: a natureza química do material constituinte, existência ou não de poros e, no caso de membranas porosas, o tamanho dos poros e sua distribuição. Outro fator que influi no desempenho das membranas é a forma como as membranas são acondicionadas em módulos.

Quando comparados aos diversos processos de separação convencionais usados industrialmente, os PSMs se destacam devido ao baixo consumo energético, a operação ocorre à temperatura ambiente, podendo ser aplicados no fracionamento de substâncias termolábeis, como as proteínas do soro. Outras vantagens que favorecem o emprego dos PSMs são: a possibilidade de operar em sistema contínuo ou em batelada, a simplicidade de operação, o pequeno espaço físico, a facilidade de ampliação de escala e a possibilidade de interagir com outros processos clássicos de separação.

O transporte de uma dada espécie, através da membrana, ocorre devido à existência de gradiente de potencial químico ou potencial elétrico. O potencial químico é uma função que

depende de temperatura, pressão e composição da mistura, mas em determinadas condições a influência de uma ou outra variável pode ser mais significativa.

Entre os processos de separação por membranas que se encontram na indústria de laticínios podem ser citados: MF, UF, NF, OI e ED. O mais promissor processo para a concentração de proteína do soro de queijo é o processo de UF, pois de acordo com o tamanho das moléculas que compõem as proteínas do soro de queijo, expressa por kDa, são retidas pelos poros da membrana de UF.

A Tabela 2.1 apresenta a faixa de tamanhos de poros das membranas para os PSMs e a faixa de pressão aplicável para cada processo.

Tabela 2.1: Classificação dos PSMs relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação.

PSM	Tamanho de poros (nm)	Limites de pressão (bar)
Microfiltração	50 - 10000	0,1 - 2,0
Ultrafiltração	1 - 100	1,0 - 10,0
Nanofiltração	< 2	10,0 – 25
Osmose Inversa	sem poros	15 – 80

Fonte: Mulder (1986).

As membranas de MF possuem diâmetro de poro entre 0,1 μ m e 10 μ m, sendo maiores que os da UF, e retêm partículas com massas molares acima de 100 kDa. A MF em comparação com os métodos convencionais, tal como a centrifugação, para a remoção de glóbulos de gordura é mais eficiente, pois não ocorre a quebra de moléculas que fornecem o sabor aos alimentos.

A UF é adequada à concentração de soluções, em pressões inferiores a 10 bar, usando membranas com tamanho de poro de até aproximadamente 100 nm. São retidos compostos com massa molar na faixa de 1 kDa a 100 kDa.

A NF é um processo de concentração que permite separar alguns tipos de íons salinos, como Na⁺, K⁺ e Cl⁻, de moléculas orgânicas com massa molar na faixa de 100Da a 500Da, com base na carga e no tamanho destas partículas. Os íons permeiam a membrana segundo suas características de difusão e carga.

Os processos que envolvem a OI visam gerar tanto água pura (permeado) quanto soluções aquosas ricas em sais minerais e outras moléculas de massa molar maior

(concentrado). As membranas de OI operam a uma pressão de aproximadamente de 100 bar e retêm compostos com massa molar superior 100 Da.

A ED é uma técnica de separação com membranas, cujo critério de separação não é o tamanho do composto, mas sim a carga elétrica. Fundamenta-se no princípio da movimentação de íons, sob um campo elétrico, em soluções aquosas e através de membranas carregadas positiva ou negativamente, resultando em soluções concentradas em íons e em soluções diluídas. Uma importante aplicação da ED na indústria de laticínios é o fracionamento de proteínas, baseado no seu ponto isoelétrico (PI).

2.1.1 Membranas

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

As membranas cerâmicas são mais resistentes em termos da limpeza química e térmica do que as membranas poliméricas. No entanto, as membranas cerâmicas possuem custo mais elevado, o que torna o seu emprego mais restrito. As membranas poliméricas, por sua vez, dominam o mercado devido a sua diversidade quanto aos diferentes tipos de polímeros existentes e quanto à disponibilidade no mercado, além de apresentarem um campo de aplicação muito amplo.

De um modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. A membrana é denominada porosa quando o transporte através da mesma ocorre devido à diferença de tamanhos entre as partículas e os poros da membrana. As membranas densas, por sua vez, não possuem poros e o transporte dos componentes envolve a sorção e a difusão através do material que constitui a membrana. Tanto as membranas densas como as porosas podem ser simétricas ou assimétricas, dependendo se apresentam ou não as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. As membranas assimétricas se caracterizam por uma região superior muito fina de aproximadamente 1 μm , que pode ou não conter poros, denominada de pele, sendo suportada por uma estrutura porosa. Quando ambas as regiões são constituídas por um único material a

membrana é do tipo assimétrica integral. Caso materiais diferentes sejam empregados no preparo de cada região da membrana é denominada de assimétrica composta.

A escolha adequada do uso de uma membrana, densa ou porosa, no processo de separação, implica em conhecer as características da membrana e da solução a ser separada.

O módulo é caracterizado como a menor unidade onde a membrana está acondicionada. As membranas podem estar dispostas nas mais variadas configurações, como tubular, capilar, fibra oca, placa e quadro e espiral. Os principais aspectos a serem considerados na seleção do módulo são as variáveis de processo e as características da solução a ser tratada.

2.2 Aplicação de PSM na indústria de laticínios

Segundo Brans *et al.* (2004), a tecnologia de separação por membranas é uma escolha adequada para o fracionamento do leite, pois muitos dos seus componentes podem ser separados por diferença de tamanho. A Figura 2.1 apresenta o tamanho dos componentes do leite e o respectivo PSM que poderia ser empregado na separação destes.

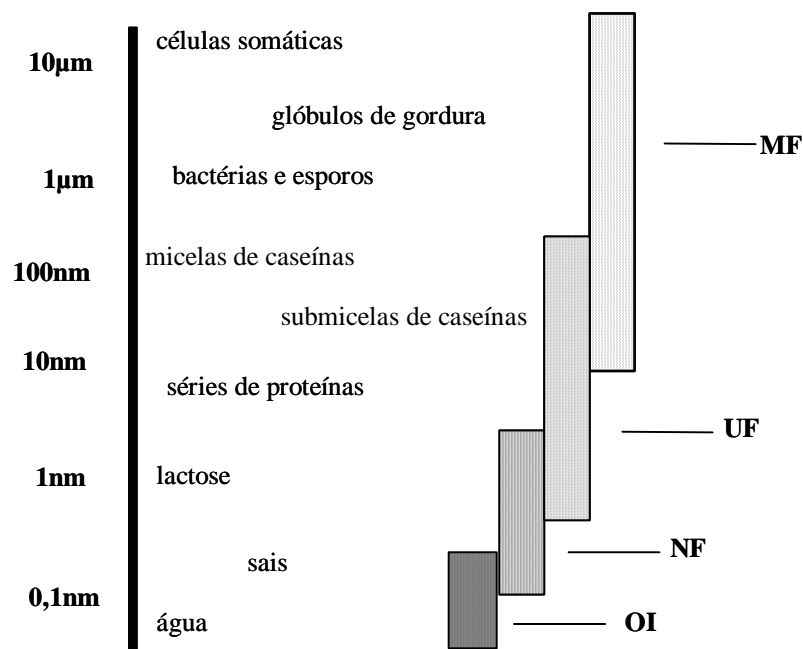


Figura 2.1: Aplicação dos PSM para separação de componentes do leite em função do seu tamanho.

Fonte: Brans *et al.* (2004).

De acordo com Brans *et al.* (2004), a MF reduz a quantidade de bactérias e esporos sem afetar o sabor do leite e promove a durabilidade do produto tanto quanto a pasteurização

do leite, além de promover a separação dos glóbulos de gordura de leite que possuem diâmetro entre $0,1\mu\text{m}$ a $15\mu\text{m}$.

Conforme Bird e Bartlett (2002) e Giraldo-Zuñira *et al.* (2004), a MF pode ser utilizada industrialmente como uma alternativa para a pasteurização ou a esterilização (a frio) parcial de alimentos, pois retém microorganismos durante a operação. Como não necessita de calor para a operação, não ocorre alteração de estado físico da solução e as características sensoriais e nutricionais dos compostos processados não são alteradas.

Segundo Giraldo-Zuñira *et al.* (2004) a MF é de emprego recente na indústria de laticínios, adequando-se ao fracionamento de proteínas do soro e à separação de microorganismos e glóbulos de gordura de leite e de soro são retidos pela membrana com tamanho nominal de poro entre $0,2\mu\text{m}$ a $2\mu\text{m}$.

Prudêncio *et al.* (2005) utilizaram os mesmos parâmetros de MF, com membrana de tamanho de poro de $1,4\mu\text{m}$, empregados no processamento do leite bovino tais como: vazão, pressão de entrada e de saída, temperatura, velocidade e tempo na obtenção de leite desnatado de búfala. Constataram que os mesmos valores podem ser usados ao processamento desse leite. No entanto, a única mudança foi feita na pressão, pois obtiveram menores valores de fluxo permeado, devido a um maior *fouling* durante a MF.

Baruah *et al.* (2006) utilizaram uma planta piloto de MF com módulo tubular cerâmico e tamanho nominal de poro de $0,2\mu\text{m}$ na recuperação das proteínas imunoglobulinas de leite de cabra, obtendo uma recuperação de 90% de proteínas.

A UF é uma tecnologia que pode ser aplicada na indústria de laticínios para o processamento do leite integral, semidesnatado ou desnatado (Prudêncio *et al.*, 2004), sendo inclusive utilizada, segundo Cheang e Zydney (2004), Guadix *et al.* (2004), Akoum *et al.* (2004) e Erdem *et al.* (2006) na separação de lactose do leite, na padronização do valor nutricional de diferentes tipos de leite, na concentração do leite para a fabricação de queijos, na recuperação de proteínas do soro de queijo e na pré-concentração do leite para a produção de iogurte.

A UF tem sido implementada há muitos anos, desde que Maubois, Mocquot e Vassal (1969), propuseram, pela primeira vez, a utilização de UF na fabricação de queijo através do uso de leite ultrafiltrado. Segundo Van Dender e Massaguer-Roig (1996), Castro e Gerla (2005) e Atra *et al.* (2005), a UF é usada na recuperação e no fracionamento das proteínas do

soro e na produção de queijos de leite ultrafiltrado, principalmente, os queijos moles como Minas Frescal, Cottage, Feta e *cream cheese*.

Segundo Hinrichs (2001), o princípio da produção de queijo com leite ultrafiltrado é de reter grande parte das proteínas dentro do queijo, sendo que, dessa forma o valor nutricional e o rendimento do produto é aumentado. De acordo com Erdem (2005), a qualidade do queijo está diretamente relacionada com a concentração e à proporção dos glóbulos de gordura e das caseínas de leite, pois estes interferem no sabor e na textura do queijo.

Ribeiro e Massaguer-Roig (1996) propuseram o uso da UF do leite na produção de queijo prato analisando o efeito do fator de concentração. Veiga e Viotto (2001) estudaram a fabricação de queijo Petit Suisse por UF de leite coagulado. Também mencionam que a produção do queijo Quark por UF em outros países resulta em economia de energia, maior rendimento e maior valor nutritivo. Erdem (2005) constatou a eficiência da UF na produção de queijo branco usando o leite concentrado e o leite desnatado quando comparados com métodos convencionais. Govindasamy-Lucey *et al.* (2005) utilizaram dois tipos de concentrado do leite por UF, com 15,2% e 13,5% em teor de sólidos (TS) na produção de queijos para pizza, como o queijo mussarela, e concluíram que o queijo para pizza pode ser fabricado com alto teor de caseínas e gorduras.

No entanto, de acordo com Hinrichs (2001), a tecnologia de UF não pode ser aplicada com sucesso para a produção de queijos com alto conteúdo de sólidos, tais como o queijo semiduro e queijo duro devido à baixa viscosidade desses queijos.

A UF pode ser projetada para operações em batelada ou contínua, sendo a operação contínua a preferida para o processo em larga escala. Guadix *et al.* (2004) projetaram a instalação de uma unidade de UF de soro de queijo em processo contínuo. Cheang e Zydney (2004) apresentaram uma proposta para obtenção de proteína isolada de soro em uma unidade de produção com dois estágios de UF com recirculação total do concentrado, e, Morison e She (2003) desenvolveram uma metodologia para o projeto e otimização de uma planta de UF de soro em múltiplos estágios.

Apesar das membranas de UF serem empregadas quase que exclusivamente na recuperação de proteínas e no seu fracionamento, Akoum *et al.* (2004) aplicaram sistemas de membranas vibratórias de UF e OI no tratamento de águas de processos da indústria de laticínios.

Nguyen *et al.* (2003) utilizaram a NF para recuperar produtos orgânicos do soro de queijo Cottage, tais como gordura, proteína e lactose obtendo uma concentração total de sólidos de 24% no concentrado e uma redução de sal no mesmo. Esse tratamento é adequado nesse tipo de soro que é ácido, pois seu emprego é ainda muito restrito na incorporação em alimentos e outros laticínios.

Rektor e Vatai (2004) e Atra *et al.* (2005) expõem que a NF pode ser usada para concentrar o permeado da UF do leite ou do soro. Segundo estes autores o resultado obtido na NF foi uma alta concentração de lactose no concentrado com uma recuperação de 90% e o permeado propício para a reutilização na linha de produção. De acordo com Balannec *et al.* (2005), Akoum *et al.* (2004) e Khider *et al.* (2004) a NF vem sendo usada no tratamento de águas residuais na indústria de laticínios.

A NF, mais recentemente, está sendo aplicada, de acordo com Martinez-Ferez *et al.* (2006) na produção de derivados de lactose, como os oligossacarídeos do leite de cabra, através da filtração tangencial usando dois estágios com membranas cerâmicas de UF e NF obtendo um concentrado com mais de 80% em oligossacarídeos, que são usados em formulações de produtos para crianças para combater doenças.

O processo de OI pode ser combinado com outros PSMs para separar vários componentes. De acordo com Brans *et al.* (2004), a OI é usada na remoção de água do soro e, de acordo com Giraldo-Zuñiga *et al.* (2004) na pré-concentração ou concentração do leite e do soro, da lactose e de proteínas do soro.

Greiter *et al.* (2004), comparando o desempenho de uma unidade de ED com uma de troca iônica na desmineralização do soro, relataram o melhor desempenho da primeira técnica em relação à separação de íons e o menor consumo de energia na operação. Uma etapa de pré-concentração do soro, anterior a desmineralização, eleva o conteúdo de sólidos para 20% a 30%, como consequência aumenta à capacidade de utilização da unidade e reduz o consumo de energia.

Os fatores limitantes associados à utilização da ED em processos envolvendo laticínios são os custos de reposição das membranas, dos espaçadores e dos eletrodos, que representam cerca de 40% dos custos totais de funcionamento de uma planta de ED. Devido à precipitação dos fosfatos de cálcio nas superfícies da membrana de troca catiônica e aos depósitos de proteínas na superfície da membrana de troca aniônica reduzir o tempo de vida útil das membranas (GIRALDO-ZUÑIGA *et al.* 2004).

Outra Operação Unitária empregada juntamente nos PSMs é a DF que consiste em adicionar água ao retentado dos PSMs. As indústrias que utilizam essa operação são as de alimentos, bebidas, biotecnologias e fármacos com finalidade de purificar o produto de interesse. A DF está associada com alto consumo de líquido diafiltrante, normalmente água, com alto teor de pureza. Na indústria de laticínios, a DF é normalmente empregada após a pré-concentração do soro por MF, UF ou NF que permite maior separação de lactose e sais minerais elevando a proporção de proteínas no retentado.

Lipnizki *et al.* (2002) expõem um estudo comparativo de operar a DF de três formas: processos contínuos, batelada e contracorrente sobre o concentrado de proteínas de UF, com a intenção de analisar o consumo mínimo de água, mas mantendo a qualidade de purificação do produto. Todas as técnicas apresentaram vantagens e desvantagens, no entanto a operação em contracorrente foi a que menos utilizou água por reciclar o líquido da DF.

Cheang e Zydney (2004) obtiveram uma recuperação acima de 90% para as proteínas α -lactalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg) através da combinação dos processos de UF e DF e Xu *et al.* (2000) usaram duas etapas de DFs no concentrado do soro de queijo da UF para concentrar as proteínas como as imunoglobulinas e glicomacropéptídeos. Esses dois compostos passaram pelo processo de secagem por *spray dryer* e no permeado restaram proteínas como α -La, β -Lg e albumina do soro bovino (BSA).

Leite *et al.* (2006) relatam que, em todo o mundo, estão instaladas cerca de 300.000 m² de área de membranas aplicadas na indústria de laticínios. O Brasil, apesar de ser um país onde a implementação de PSMs é relativamente nova, já possui plantas de membranas de UF. O queijo Minas Frescal, produzido com auxílio da técnica de UF, vem sendo comercializado no Brasil desde 1988, podendo ser encontrado na forma tradicional e também com baixo teor de gordura. Neste tipo de processamento todas as proteínas do leite são aproveitadas, o que permite fazer todo o processo em sistema fechado. A Tabela 2.2 apresenta a produção de diversos tipos de queijos por método tradicional e por UF, observando-se que a última possibilita aumentos de produção em todos os casos.

Tabela 2.2: Comparação da produção de diferentes queijos através de processos tradicional e com uso de UF para cada 100.000 kg de leite.

Tipo de queijo	Produção tradicional (kg)	Produção UF (kg)	Aumento de Produção (%)
Feta	13.700	17.800	30
Mussarela	9.930	11.750	18
Cheddar	10.360	12.290	18
Queijo Fresco	11.432	14.824	30

Fonte: Cheryan (1998) apud Leite *et al.* (2006).

As principais vantagens atribuídas à utilização da UF para produção de queijos, em relação ao processo tradicional, consistem em: aumento de rendimento, possibilidade de fabricação contínua e automatizada de queijos, economia de mão de obra e ingredientes, e a produção do soro com menor poder poluente.

Outras pesquisas, como por exemplo, o uso de membranas na obtenção de iogurte com baixo teor de lactose, para atender consumidores que apresentam má absorção ou intolerância à lactose, têm sido desenvolvidas.

2.3 Princípios de UF

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

As membranas, feitas com vários polímeros, destinam-se a reter moléculas com massas molares acima de 20 a 30 kDa. No caso específico da concentração das proteínas do soro de queijo o seguinte processo pode ser visualizado: o soro flui, sob pressão, através da membrana, a qual permite a passagem de água, sais e lactose, que irão constituir a solução chamada de permeado cujas partículas são de tamanho inferior aos poros da membrana; as gorduras e as proteínas são partículas de tamanho superior em relação aos outros constituintes mencionados do soro, logo, são retidos pela a membrana e esta solução é denominada de concentrado ou retentado. Com a UF é possível obter um teor de sólidos de 25 a 35% no concentrado.

Nos processos com membranas há dois tipos de filtração, a convencional e a tangencial. Na filtração convencional, o fluido esco perpendicularmente através da membrana filtrante e na tangencial, o escoamento é paralelo à área da membrana. Este último

tipo de sistema de filtração, largamente utilizado em processamento do leite e soro de queijo é mais eficiente, pois facilita o arraste dos solutos, evitando que estes se acumulem sobre a superfície da membrana. A Figura 2.2 mostra o mecanismo de transporte na filtração tangencial através de uma membrana semipermeável.

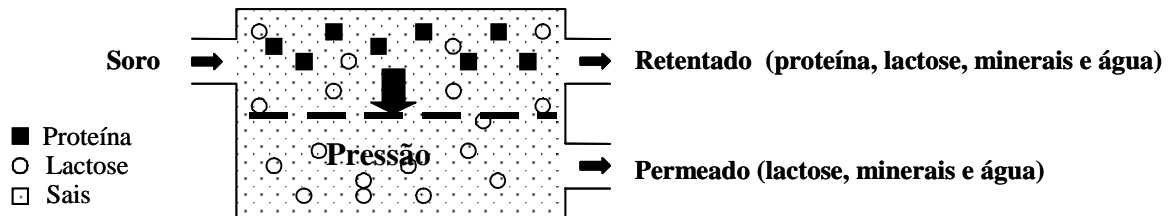


Figura 2.2: Representação esquemática da filtração tangencial do soro na membrana de UF
Fonte: Kesler *et al.* (1996) apud Giraldo-Zuñira *et al.* (2004).

As membranas de UF comercialmente são especificadas através da sua massa molar de corte (MMC) cuja unidade mais utilizada é Dalton (Da). A MMC é definida como a massa molar para a qual a membrana apresenta uma retenção igual a 95%. As medidas de desempenho das membranas de UF são o fluxo permeado e a retenção de macromoléculas, tal como as proteínas.

O fluxo permeado depende das propriedades da membrana, do produto a ser separado e das condições de operação como a pressão transmembrana, velocidade de escoamento tangencial, fator de concentração, temperatura, pH e força iônica do meio.

A seguir são apresentadas algumas definições comumente utilizadas em PSM para melhor entendimento da leitura deste trabalho.

O fluxo através da membrana é definido como o volume de permeado que foi através da membrana por unidade de área e tempo, como mostrado na Equação 2.1:

$$J_p = \frac{v}{A.t} \quad (2.1)$$

onde:

J_p = fluxo do permeado ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$);

A = área da membrana de UF (m^2);

v = volume do permeado (L);

t = tempo (h).

A retenção ou coeficiente de rejeição durante o processo de UF é definido de acordo com a Equação 2.2:

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_f} \quad (2.2)$$

onde:

R = coeficiente de rejeição;

C_p = concentração de soluto no permeado (g. L^{-1});

C_f = concentração de soluto na alimentação (g. L^{-1}).

O valor de R varia entre 0 (soluto e solvente passam livremente pela membrana) e 1 (soluto sendo completamente retido).

Além dessas características é desejável que a membrana possua uma boa estabilidade química, térmica e mecânica.

O fator de concentração (FC) é uma variável importante quando o objetivo é concentrar substâncias de interesse. O FC é definido conforme a Equação 2.3:

$$FC = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{(V_0 - V_F)} \quad (2.3)$$

onde:

FC = fator de concentração de uma dada espécie;

V_0 = volume inicial da solução (L);

V_R = volume do retido (L);

V_F = volume da solução permeada(L).

No processo de concentração de um dado componente através de UF, a concentração de um soluto durante o processo varia em função tanto da redução de volume, como da retenção (R) do soluto pela membrana. A concentração em função do fator de concentração é apresentada na Equação 2.4:

$$C_i = C_0 (FC)^R \quad (2.4)$$

onde:

C_i = concentração de componente i (g. L^{-1});

C_0 = concentração inicial do componente i (g. L^{-1});

FC = fator de concentração de uma dada espécie;

R = coeficiente de rejeição.

A vantagem de se aplicar a UF é reforçada pela sua relativa simplicidade, baixo consumo energético e, segundo Atra *et al.* (2005), na elevada eficácia na separação de proteínas do soro. De acordo com Rattray e Jelen (1996) apud Giraldo-Zuñira *et al.* (2004) a UF não desnatura as proteínas do soro mantendo as propriedades funcionais dos CPS inalteradas.

2.3.1 Membranas de UF

As membranas de UF possuem poros na faixa de 0,01 a 0,1µm e são caracterizadas pela massa molar de corte (MMC), portanto, soluções ou suspensões com componentes em uma ampla faixa de massa molar (1 a 10³ kDa) podem ser tratadas por UF.

Vários materiais podem ser usados na confecção de membranas de UF. Os materiais mais frequentemente empregados são poliméricos, cerâmicos, metálicos ou vítreos.

Nas indústrias de laticínios, normalmente, são encontradas membranas de materiais poliméricos e cerâmicos. Doyen *et al.* (1996) apud Brans *et al.* (2004) realizaram um estudo comparativo no tratamento do soro com membranas poliméricas de polifenilsulfona e polivinilsulfona, cerâmicas e organominerais. Constataram que o fator limitante para a concentração de proteínas do soro de queijo foi formação de *fouling* e não a permeabilidade nas membranas.

As membranas de polissulfona aromáticas, incluindo polifenilsulfona, polietersulfona, poliarilsulfona e polissulfona são usadas exclusivamente em membranas de MF e UF. Este material é altamente resistente a agentes oxidantes, solventes e temperatura, suportando temperaturas acima de 100°C. Quanto à resistência química, essas membranas aceitam limpeza e desinfecção com ácidos, bases, cloro e peróxido de hidrogênio. Devido a essas características são apropriadas para as condições de operação em indústrias de alimentos. Segundo Leite *et al.* (2006) as membranas de polietersulfonas são as mais utilizadas na indústria de laticínios.

As membranas inorgânicas devem ser utilizadas em processos industriais sujeitos às condições severas de limpeza e esterilização. As membranas inorgânicas são compostas de uma fina camada de material inorgânico sobre um suporte cerâmico ou metálico. Os materiais para as membranas inorgânicas incluem vidro, metal sintetizado, materiais cerâmicos e ainda os poliméricos inorgânicos.

2.3.2 Módulos de UF

As membranas de UF são montadas em várias configurações, juntamente, com espaçadores, canais de escoamento, suportes e acessórios para vedação. O conjunto resultante desta montagem é denominado módulo ou elemento. Os principais objetivos do projeto de módulos das membranas é acomodar grandes áreas de filtração em um espaço pequeno, suportar as pressões utilizadas pelos processos e permitir elevadas taxas de escoamento.

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

Segundo Morison e She (2003), Guadix *et al.* (2004) e Cheang e Zydney (2004) os módulos de UF podem ser empregados em processos contínuos ou em batelada e devem ser projetados de forma a possibilitar uma limpeza eficiente, com uma proporção vantajosa entre a superfície de filtração instalada e o volume da câmara de pressão, e de modo que a substituição das membranas possa ocorrer com baixo custo.

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

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

Nos módulos tubulares, a membrana é suportada na superfície interna ou externa de um tubo poroso. Este tubo pode ser de material polimérico, fibra de vidro, cerâmica, carbono ou aço inoxidável. Os tubos podem ser conectados em série através de suas extremidades de acordo com a taxa de recuperação requerida. Tendo como principais vantagens: a baixa tendência ao *fouling*, devido à possibilidade de operar com alta velocidade de escoamento tangencial, facilidade de limpeza e podem operar em altas pressões. As desvantagens desse tipo de configuração estão na pouca área superficial por unidade de volume, custo elevado e poucas opções de tipos de materiais de membrana.

Os módulos espirais apresentam um eficiente empacotamento de membrana em folha plana sob uma forma cilíndrica. Um envelope retangular, com três arestas coladas, é formado por duas membranas com a camada seletiva voltada para a parte externa do envelope. Dentro do envelope, é colocada uma malha fina, espaçador interno, que permite o escoamento do permeado em seu interior. A extremidade aberta do envelope é conectada a um tubo coletor através de pequenos furos que permitem o escoamento do permeado de dentro do envelope para o interior do tubo. Dependendo do diâmetro desejado para o módulo a ser construído, vários envelopes podem ser enrolados ao redor do tubo coletor. Entre dois envelopes, uma malha grossa, espaçador externo, é colocado a fim de criar o canal para o escoamento da corrente de alimentação e promover a sua turbulência. A corrente de alimentação percorre longitudinalmente o módulo em espiral, entre os espaçadores dos envelopes de membranas, tangencial às suas superfícies, e o permeado escoar transversalmente através das membranas para dentro dos envelopes, percorrendo todo o caminho em espiral até o tubo central coletor de permeado.

O tipo de módulo de membrana a ser escolhido para um dado processo deve levar em conta as seguintes considerações: tipo de separação empregada, relação custo e benefício, flexibilidade requerida para as condições de processo, facilidade de manutenção, operação e limpeza.

O módulo em espiral, que foi utilizado no presente trabalho, é composto por um envelope de membrana de polietersulfona com espaçadores de polipropileno e seu esquema está apresentado na Figura 2.3:

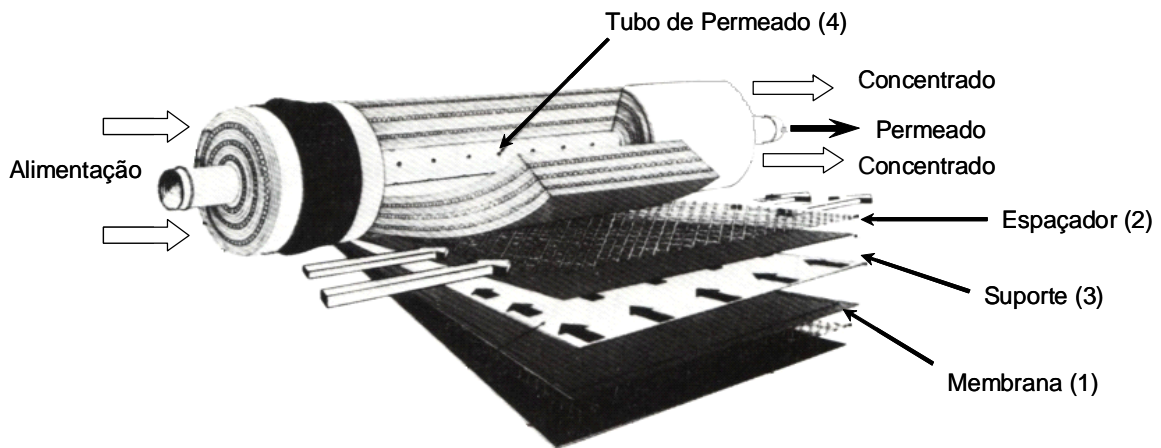


Figura 2.3: Esquema do módulo de UF.
Fonte: Rautenbach e Albrecht (1989).

O módulo de UF é composto pelos seguintes elementos, conforme a Figura 2.3:

- membrana de UF (1), possui formato de uma folha plana de material semi-permeável feita de um polímero fino;
- espaçador (2), consiste de uma tela plástica de polipropileno de malha grossa que é colocada entre as folhas de membranas;
- suporte de membrana (3), uma tela de malha fina colocada entre as folhas da membrana feita de material polimérico;
- tubo de permeado (4), tubo com furos que recolhe o permeado do módulo.

2.3.3 Fatores que afetam o desempenho do processo de UF

Nos PSMs ocorrem fenômenos que prejudicam a eficiência da membrana, tais como: polarização por concentração (PC) e *fouling*. Esses fatores afetam o fluxo permeado e as características de retenção da membrana, que são alterados com o tempo de operação.

Rao (2002) estudou os mecanismos da diminuição do fluxo durante a UF na indústria de laticínios e a influência do pH no fluxo permeado do soro e *buttermilk* e determinou que o principal fator limite da UF em produtos de laticínios é a queda do fluxo em função do tempo devido ao *fouling* e à PC. Estes dois fatores serão discutidos a seguir separadamente.

2.3.3.1 Fouling

De acordo com Cheryan (1986), o grande problema enfrentado na indústria de laticínios durante os processos de UF do leite e do soro é a formação de *fouling* na membrana. O *fouling* se manifesta com um declínio de fluxo de permeado com o tempo de operação, quando todos os parâmetros operacionais, tais como: pressão, taxa, temperatura e concentração de alimentação são mantidas constantes.

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

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

Rao (2002) menciona que todos os componentes de baixa massa molar precipitam, via de regra, por atingir o limite de solubilidade durante a UF formando o *fouling* que se manifesta na maioria dos casos como um decréscimo contínuo do fluxo permeado ao longo do tempo.

Para prevenir a formação de *fouling* diferentes estratégias foram avaliadas na literatura. Bansal *et al.* (2006) realizaram a remoção do *fouling* na MF causado pelas proteínas de α -La através de 2 métodos de lavagem: o primeiro com água destilada, obtendo um aumento de 6% no fluxo permeado, e o segundo com limpeza alcalina recuperando o fluxo permeado em até 90%. Argüello *et al.* (2005) utilizaram detergentes enzimáticos como P3-Ultrasil 62 e observaram que, após a limpeza, uma eficiência de 100% no fluxo permeado foi atingida. Brans *et al.* (2005) expõem que o método de *backpulsing* é mais eficiente que outros métodos, tais como promotores de turbulência e *backwashing*, pois a remoção dos

componentes da superfície da membrana se mostrou mais eficiente podendo ser controlado em larga escala.

O *fouling* está sendo controlado, mais recentemente, segundo Muthukumaran *et al.* (2004) e Chen *et al.* (2006) através da vibração dos módulos de membrana por ultra-som. Os autores constataram que o banho de ultra-som não interfere na permeabilidade da membrana e não danifica o material da mesma.

2.3.3.2 Polarização por concentração

O termo polarização por concentração é usado para descrever o acúmulo do soluto próximo à superfície da membrana, onde a concentração do soluto é muito maior do que a concentração na solução de alimentação. Com o aumento de acúmulo de soluto na superfície da membrana, aumenta-se o gradiente de concentração que favorece a contra difusão do soluto da superfície da membrana para o seio da solução em escoamento, atingindo-se um estado estacionário. A esta camada dá-se o nome de camada de polarização por concentração. Este fenômeno pode ocasionar um aumento na passagem de soluto através da mesma.

Rao (2002) expõe que altas concentrações de proteínas em sistemas com leite promovem a concentração por polarização que interfere no fluxo permeado ocasionando a diminuição deste.

Segundo Mulder (1986), a concentração de solutos sobre a superfície da membrana causada pela polarização por concentração que proporciona uma maior passagem de solutos através da membrana. Polarização de concentração pode ser reduzida pelo aumento da turbulência da corrente de alimentação, ao passo que o *fouling* não é reduzido apenas por turbulência, devido à natureza química da sua interação com a superfície da membrana.

As conseqüências, segundo Mulder (1986), da polarização por concentração estão apresentadas a seguir:

- a retenção pode ser baixa, devido ao aumento da concentração do soluto na superfície da membrana, ou retenção intrínseca; isto ocorre geralmente com solutos de massas molares baixas;
- a retenção pode ser alta, este é o caso das moléculas com elevada massa molar onde a concentração por polarização pode ter uma forte influência na seletividade da membrana, devido a formação secundária de outra membrana;

- o fluxo permeado poderá ser baixo, devido ao aumento de resistências formadas na superfície da membrana, tais como resistência devido à adsorção, bloqueio dos poros, camada gel.

Rao (2002) constatou que os fluxos permeados de ambos os soros estudados, doce e ácido, foram fortemente influenciados pelo pH. O autor descreveu que, para o soro doce, o fluxo aumenta inicialmente com o aumento do pH, mas também aumenta o *fouling*, provocando uma redução posterior do fluxo. Ao diminuir o pH, diminui-se o fluxo inicial, mas diminui também o *fouling* posterior. Um efeito inverso foi constatado pelo mesmo autor para creme de leite. As mudanças de fluxo com o pH foram atribuídas ao efeito combinado do pH nas proteínas e minerais, em particular no cálcio. Os efeitos diferentes do pH no soro e no creme de leite são devidos ao fato de que o soro possui muito menos proteínas e não possui micelas de caseína. O aumento no fluxo inicial a altos valores de pH para o soro pode ser explicado por mudanças no estado das proteínas do soro. Por exemplo, as proteínas α -lactoglobulina existem como octômeros na faixa de pH entre 3,5 e 5,2, mas se dissociam em monômeros em condições alcalinas.

Além desses dois fenômenos que afetam diretamente a eficiência da membrana, existem as propriedades físico-químicas da solução que interferem na permeação de fluxo através da mesma. Dentre essas podem-se citar: pH, viscosidade e massa específica de cada componente que compõe o soro, cujos valores estão diretamente relacionados com a concentração. A concentração que mais se altera no concentrado utilizado neste trabalho é a da proteína, pois esta não é permeável à membrana de UF, dessa forma, uma alteração na concentração afeta as propriedades do concentrado principalmente a viscosidade que influencia significativamente a taxa de permeação.

Outras variáveis que também interferem no fluxo de permeado são as condições operacionais do processo de UF como a temperatura, pressão transmembrana e vazão de alimentação.

2.4 O soro de queijo

De acordo com Cayot e Lorient (1997) apud Giraldo-Zuñide (2004), o soro de queijo é um líquido opaco de cor amarelo-esverdeada, também chamado de soro de leite, sendo considerado um subproduto da indústria de laticínios, obtido pela coagulação do leite. O sabor

do soro, ligeiramente ácido ou doce, e a sua constituição dependem do tipo de coagulação do leite e do processo de fabricação do queijo. O soro doce provém da coagulação enzimática do leite, pela adição de uma enzima denominada de renina, que tem a propriedade de coagular a caseína e possui pH entre 6,3 e 6,6. É um soro resultante da produção de queijos, como por exemplo, o Cheddar ou Emmental. Já o soro ácido, com pH entre 4,3 a 4,6, provém da coagulação ácida do leite para a fabricação de caseína ou de queijos, como o Camembert ou Petit Suisse. A Tabela 2.3 indica a composição do leite bovino e dos dois tipos de soro.

Tabela 2.3: Composição do leite e dos soros doce e ácido.

	Leite (%)	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Sólidos Totais (ST)	13	6,4	6,2
Proteína	3,6	0,8	0,75
Gordura	3,9	0,5	0,04
Lactose	4,6	4,6	4,2
Cinza	0,8	0,5	0,8
Ácido láctico	-	0,05	0,4

Fonte: Antunes (2003)

A composição dos produtos obtidos de proteínas do soro varia segundo diversos fatores: fonte do leite, método de preparação, tipo de queijo produzido e especificações individuais dos processadores. Todos esses fatores influem de forma significativa nas características funcionais de diversos produtos de soro, (ANTUNES, 2003). Outro dado importante apresentado por outros tipos de leites como o de búfala, cabra, bovino entre outros é a quantidade de proteínas que diferem entre si.

De acordo com Rodrigues. (2001), as diferenças na acidez e no conteúdo mineral, entre os dois tipos de soro, são as responsáveis pelas diferentes propriedades físico-químicas que apresentam.

Geralmente, 100 kg de leite produzem cerca de 10 a 20 kg de queijo e cerca de 80 a 90 kg de soro, segundo Mariotti *et al.* (1999) e Madaeni e Mansourpanah (2004). A produção mundial anual do soro está estimada em 100 bilhões de litros.

Apesar de haver um mercado em expansão para os concentrados protéicos de soro, continua sendo um subproduto poluente, devido a sua elevada demanda química de oxigênio (DQO) em torno de 50.000 mg de O₂. L⁻¹ de permeado (ANDRADE e MARTINS, 2002).

Segundo Antunes (2003), o soro doce é geralmente mais rico em lactose enquanto que o soro ácido exhibe uma maior concentração em minerais. A concentração de lactose no soro

ácido é menor do que no soro doce, devido ao processo de fermentação, pois uma fração de lactose é transformada em ácido láctico, durante a formação do coalho. Por outro lado, o soro ácido contém mais cálcio e fósforo que o soro doce, devido à solubilização do complexo cálcio-fósforo, existentes nas micelas de caseína, em pH ácido. No soro doce, a ação da enzima não provoca a diminuição do pH, logo os íons de cálcio são retidos no queijo. A composição protéica de ambos os soros é semelhante no que se refere à maioria das proteínas (RODRIGUES *et al.*, 2001).

A composição média do soro de queijo ácido conforme dados da literatura está apresentada na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Composição do soro ácido.

Componente	Composição (%)
Água	94 - 95
Lactose	3,8 - 4,2
Proteína	0,8 - 1,0
Sais	0,7 - 0,8

Fonte: Rautenbach e Albrecht (1989)

Após o processamento, o soro se apresenta sob três formas: soro concentrado, soro seco e soro modificado. O soro concentrado é a substância líquida obtida pela remoção parcial da água, deixando todos os outros constituintes nas mesmas proporções relativas do soro original, enquanto que o soro seco difere do soro concentrado pela remoção total da água. Já o soro modificado constitui uma classe de produtos obtidos do soro por vários processos e procedimentos; tais alimentos devem ser manufaturados a partir de soro pasteurizado, ou durante seu processamento devem ser submetidos à pasteurização ou ao processamento térmico equivalente em termos de destruição de microorganismos.

O procedimento de maior uso para o reaproveitamento do soro, consiste na sua concentração em evaporadores, seguido da secagem e ensacamento final (de La Fuente *et al.*, 2002).

O soro em pó utilizado neste trabalho foi fornecido pela ELEGÊ ALIMENTOS, proveniente da fabricação de queijo mussarela. Este é um soro concentrado em evaporadores e, posteriormente, seco em *Spray Dryer*, sendo envasado em embalagens de 25 kg. A Figura 2.4 apresenta o fluxograma da produção de queijo mussarela. Nesta produção, o soro líquido é gerado nas etapas da coagulação do leite e, posteriormente, na prensagem da massa coagulada.

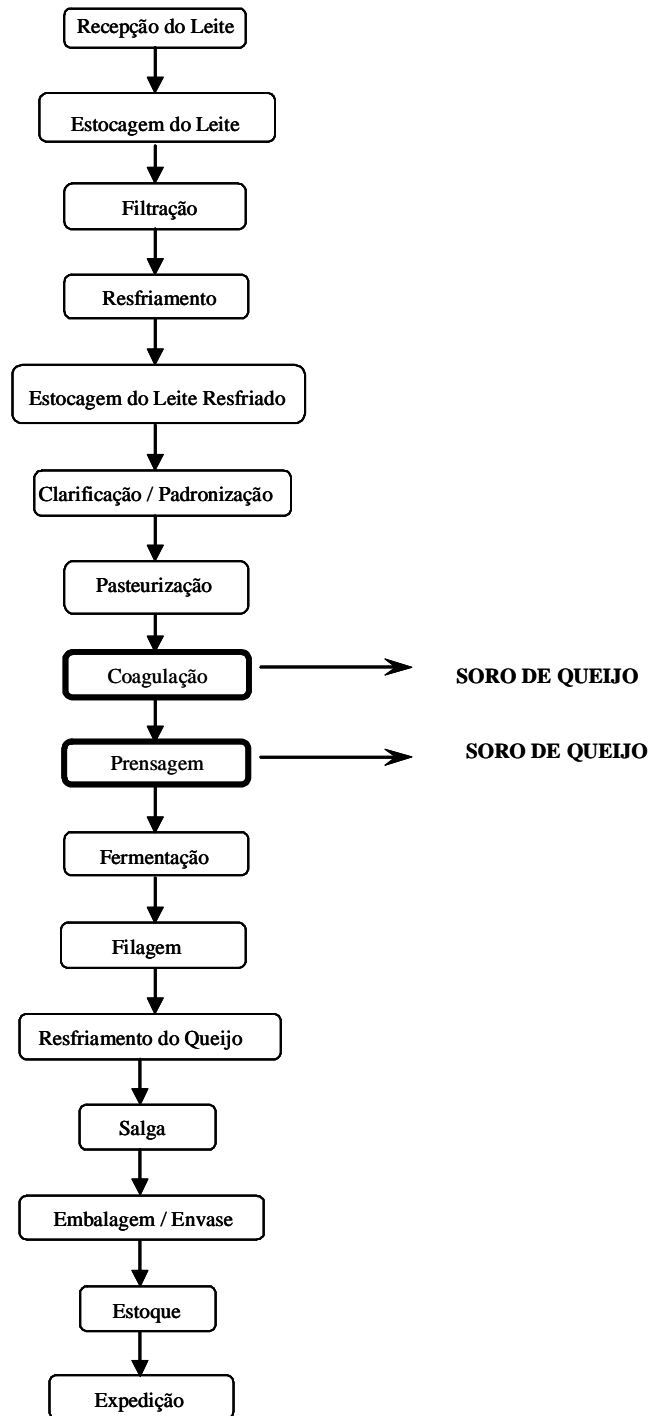


Figura 2.4: Fluxograma da produção de queijo mussarela.
Fonte: Elegê Alimentos (2005).

O processo de secagem do soro consiste principalmente de cinco etapas: filtração, pasteurização, concentração, cristalização e secagem. A Figura 2.5 apresenta o fluxograma de produção de soro de queijo em pó.

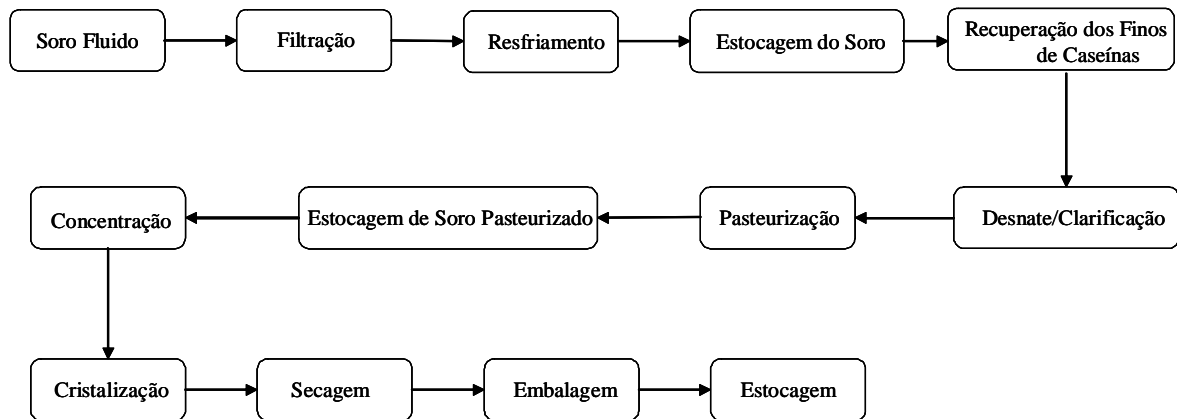


Figura 2.5: Fluxograma da produção de soro de queijo em pó.
Fonte: Elegê Alimentos (2005).

2.4.1 Proteínas do soro de queijo

As principais funções biológicas das proteínas incluem: a reparação celular, a construção e reparação de músculos e ossos, prover energia e regular uma série de importantes processos metabólicos do corpo. Os produtos provenientes do soro de queijo enquadram-se perfeitamente nesse conceito (ANTUNES, 2003).

Carvalho e Huhn (1999), Antunes (2003) e Silva e Van Dender (2005) destacam que as proteínas totais do leite consistem de duas frações principais: caseínas (80%) e as proteínas do soro (20%). As caseínas compreendem uma grande família de fosfoproteínas sendo caracterizadas por apresentarem quantidades relativamente altas de fósforo e do aminoácido prolina e encontram-se organizadas no leite sob a forma de grandes micelas esféricas (RODRIGUES *et al.*, 2001).

Segundo Carvalho e Huhn (1999), a caseína pode ser definida como a proteína precipitada pela acidificação do leite a um valor de pH próximo a 4,6. As proteínas remanescentes, após a remoção da caseína, são as proteínas do soro.

De acordo com Rodrigues *et al.* (2001) e Silva e Van Dender (2005) cerca de 80% das proteínas do soro consistem em β -lactoglobulina (β -Lg) e α -lactoalbumina (α -La), correspondendo a 55% e 25%, respectivamente. A β -lactoglobulina é a principal proteína do soro de leite bovino, ovinos e caprinos (ANTUNES, 2003).

Além dessas, encontram-se imunoglobulinas (Ig) e outras proteínas como as lactoferrina, lisozima e peptídios derivados da caseína, embora em menores proporções. A

Tabela 2.5 apresenta as propriedades do soro, tais como: a massa molar das proteínas, ponto isoelétrico e suas respectivas concentrações.

Tabela 2.5: Propriedades e concentração das proteínas do soro de queijo

Proteína	Massa molar (kDa)	Ponto isoelétrico	Concentração (g. L⁻¹)
β-Lg	18,362	5,2	2,7
α-La	14,147	4,2 - 4,8	1,2
BSA	69	4,7 - 4,9	0,4
Ig	15 - 1000	5,5 - 8,3	0,65
Peptonas	4,1 - 40,8	3,3 - 3,7	1,4
Lactotransferina	78	9	0,1
Lactoperoxidase	89	9,5	0,02
Glicomacropéptido	7	-	-

Fonte: Rodrigues (2001)

Segundo Bryant e McClements (1998) apud Silva e Van Dender (2005), essas proteínas diferem da caseína por serem menores, globulares, compactas, solúveis em ampla faixa de pH, termolábeis e não-coaguláveis pela renina. De acordo com as estruturas globulares, que caracterizam as proteínas do soro, os grupos hidrofóbicos encontram-se internamente na molécula e os hidrofílicos no exterior. As propriedades funcionais de tais proteínas dependem de fatores físico-químicos, como a composição e seqüência de aminoácidos, flexibilidade, tamanho, conformação e distribuição de cargas na estrutura da molécula e de fatores intrínsecos como pH, temperatura, concentração de proteína e tipos de íons presentes na solução.

Segundo Antunes (2003), as diferentes proteínas presentes no soro apresentam funcionalidades distintas no seu estado nativo e após tratamento físico, químico ou enzimático, devido às várias estruturas conformacionais que possuem e/ou adquirem (RODRIGUES *et al.*, 2001).

As proteínas do soro são as únicas usadas na sua forma nativa em aplicações alimentícias, devido à baixa força iônica, o que as torna solúveis em larga faixa de pH, segundo Silva e Van Denter (2005), sendo consideradas de alta qualidade nutricional e propriedades funcionais (ANTUNES, 2003).

2.4.2 Processamento do soro de queijo por PSMs

O tratamento do soro é um dos processos da indústria de laticínios que mais emprega técnicas com membranas, sendo quatro delas amplamente usadas: MF, NF, UF e OI. O soro foi o primeiro líquido na indústria de alimentos a ser concentrado por PSM em larga escala (MADAENI e MANSOURPANAH, 2004).

Rektor e Vatai (2004) expõem todos os métodos de separação por membranas que foram usados para tratar o soro de queijo mussarela e encontrar uma aplicação potencial. Foram propostas, em três linhas de tratamento alternativas; que se diferenciam na eficiência de separação dos componentes valiosos do soro. Em todas as alternativas, o primeiro passo é a remoção de gordura, seguida da esterilização do soro por MF. A gordura separada pode ser pasteurizada por técnicas convencionais e é usada como matéria-prima para a produção de manteiga. Como exemplo citam-se as seguintes utilizações de PSMs.

- a NF é usada para a concentração do soro MF, o concentrado produzido é uma matéria-prima para a produção de sorvete;
- a UF é usada para a concentração de proteínas e usando a operação de DF pode-se obter proteína purificada e concentrada.;
- a OI é usada para reduzir o teor de água do soro.

Segundo Giraldo-Zuñira *et al.* (2004), no processo de concentração por UF é conveniente remover previamente os glóbulos de gordura por MF para evitar a obstrução dos poros das membranas de UF, e desta forma aumentar a eficiência da UF.

Segundo Antunes (2003), para o processo de obtenção de CPS com 80% de proteína é necessário o emprego da DF, que consiste na adição contínua de água ao retentado originário da UF para promover uma remoção mais eficiente de lactose e sais minerais, passando novamente o retentado através da membrana de UF.

A DF além de proporcionar a produção de um concentrado protéico mais puro, permite também melhor controle da composição final do CPS. Assim, se em um processo de concentração do soro por UF forem alcançados teores de proteínas de cerca de 30%, com a DF maior concentração será obtida, aproximadamente de até 60 -80% de proteínas em base úmida (ANTUNES, 2003).

2.4.3 Produtos derivados do soro de queijo e respectivas aplicações

Aproximadamente 50% da produção mundial soro de queijo é tratada e adicionada em diversos produtos alimentares, sendo que quase a metade desse total é usada diretamente na forma líquida, 30% na forma de pó de soro de queijo, 15% como lactose e o restante como concentrado de proteínas do soro de queijo (SISO, 1996). A utilização completa do soro, mesmo recorrendo a novas tecnologias, ainda não é possível (CHERYAN, 1986).

Durante as últimas décadas foram desenvolvidos processos em escala industrial para produzir concentrado protéico de soro (CPS) e isolados protéicos de soro (IPS) de elevado grau funcional e nutricional. Estes compostos apresentam conteúdo protéico variável, entre (35% - 90%) e amplo uso como ingrediente funcional para realçar as características de coagulação, geleificação e emulsificação de vários produtos (ONWULATA *et al.*, 2001).

As propriedades funcionais da fração protéica do soro dependem das propriedades físico-químicas de cada uma das proteínas, das interações com outros componentes e do método de preparação do concentrado protéico.

Os CPSs podem ser classificados com base na sua composição, mas geralmente são agrupados de acordo com o seu conteúdo em proteína. A Tabela 2.6 apresenta a composição típica do soro concentrado e isolado.

Tabela 2.6: Composição típica de concentrados e isolados protéicos.

Componente (%)	Soro em pó	CPS (34%)	CPS (80%)	IPS
Proteína	13	34	80	92
Lactose	75	53	6	1
Sais	8	7	3	2
Gordura	1	3	7	1

Fonte: Huffman e Harper (1999)

Segundo de La Fuente *et al.* (2002) e Alomirah e Alli (2004), as variações na composição e funcionalidade de CPS e IPS são devidas às diferenças na composição do leite e nas condições de processamento durante a fabricação do queijo, como tipo e concentração do coagulante, pH, temperatura, adição de CaCl_2 para aumentar o rendimento e condições de pasteurização do leite. O pré-tratamento do soro na remoção de resíduos de lipídios, as condições operacionais da UF, DF e as de secagem também influenciam nas propriedades funcionais dos concentrados resultantes.

Segundo Pisecky (2005), com o uso de *spray drying* nas indústrias de queijos, leite, soro e permeado do soro obtêm-se vários tipos de compostos que podem ser utilizados como ingredientes em produtos alimentícios, como por exemplo, aditivo para a indústria de produtos lácteos, panificação, salgadinhos, batatas *chips*, biscoitos, confeitos como coberturas, massas e sopas.

De acordo com Giraldo-Zuñira *et al.* (2004), o IPS é obtido principalmente com o emprego de resinas de troca iônica, em associação com a UF e com a secagem normalmente por atomização, sendo a secagem uma etapa essencial no acabamento do produto. Na obtenção de CPS com maior teor protéico pode ser introduzida no processo uma etapa de DF, para a retirada de lactose e sais. Antunes (2003) expõe os vários produtos de soro comercialmente disponíveis, os quais estão apresentados a seguir:

- concentrados de soro com lactose reduzida: são produtos especiais contendo menos de 1% de lactose, enquanto que o normal se encontra com 7% de lactose;
- soro com minerais reduzidos é o produto obtido pela remoção seletiva de uma parte dos minerais do soro através dos processos de troca iônica, eletrodialise ou outras técnicas de separação por membranas;
- concentrado protéico de soro de leite (CPS): é o produto obtido pela remoção de constituintes não-protéicos do soro de tal modo que o produto final seco contenha, em geral, entre 25% e 89% de teor protéico sendo que o CPS da ordem de 80% é o mais disponível comercialmente;
- isolado protéico de soro de leite (IPS): é a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contém entre 90 e 95% de proteína, obtido por UF seguida da DF e/ou também pela utilização de troca iônica, como um pré-tratamento, antes do processo de UF;
- proteína de soro hidrolisada é o produto obtido pela quebra das moléculas de proteínas durante seu processamento formando segmentos protéicos menores, chamados peptídios.

Novas aplicações vêm sendo encontradas no reaproveitamento do soro de queijo. O uso de ingredientes derivados do soro na fabricação de queijos processados melhora as

características de moldagem, laminação, fatiabilidade, untabilidade e potencializa as características de derretibilidade, além de, produzir boas propriedades de aroma e aspecto físico do queijo (USDEC, 2002).

De acordo com Salem *et al.* (1987) apud Silva e Van Dender (2005), os efeitos da adição de proteínas de soro em queijo processado com baixo teor de gordura resultam em melhorias das qualidades sensoriais do produto.

Silva e Van Dender (2005) desenvolveram a formulação e padronizaram a técnica de fabricação de requeijão cremoso *light* utilizando CPS 34% como substituto parcial de gordura. O produto obtido apresentou excelentes características sensoriais incluindo textura, consistência, formação de fios, brilho e sabor. Outras aplicações do CPS em produtos extrudados como milho, batata e arroz foram propostas por Onwulata *et al.* (2001), e em iogurtes, sorvetes e bebidas por Mistry (2002).

Segundo Rossano *et al.* (2001), os componentes isolados do soro como: proteínas, lactose, sais e gordura, são altamente valiosos por suas propriedades nutricionais e funcionais, podendo ser usados nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicinais como ingredientes funcionais.

Mosquim *et al.* (1999) utilizaram o soro em pó e líquido na produção de *soft-drinks* com sucos concentrados visando o aproveitamento do soro de queijo e constataram, através de testes de aceitação, que os produtos enriquecidos com o soro apresentaram aceitação superior aos não-enriquecidos.

Mcgregor e White (1990) apud Silva e Van Dender (2005) verificaram que a UF do leite desnatado poderia melhorar a textura e o sabor do queijo Cheddar com baixo teor de gordura, primeiramente por diminuir a quantidade de lactose, controlando assim a taxa de acidez, e segundo por aumentar o conteúdo de proteína do queijo, facilitando a ligação de umidade.

Segundo Brans *et al.* (2004), as proteínas do soro, tais como a lactotransferina e α -lactoalbumina têm aplicações farmacêuticas e a lactotransferina também pode ser usada em fórmulas para alimentos infantis e como conservante de carnes. A proteína β -lactoglobulina tem influência nas propriedades físico-químicas dos alimentos, melhorando as características emulsificantes e gelatinizantes.

De acordo com Cunha *et al.* (2006) e Hinrichs (2004) a grande quantidade de proteínas presentes no retentado da UF do soro de queijo, faz com que seja utilizado para a produção de queijos tipo Frescal, onde se obtém boas características físicas de sabor e textura.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os equipamentos e reagentes químicos utilizados, assim como são descritos os métodos analíticos e a metodologia para a realização dos experimentos.

3.1 Solução de Soro de Queijo Ácido

O soro em pó utilizado neste trabalho foi doado pela Elegê Alimentos (Teutônia, RS), proveniente da fabricação de queijo mussarela contendo, aproximadamente, um teor de sólidos totais de 6,5%.

Para o uso experimental, o soro foi reconstituído usando esse soro em pó dissolvido, manualmente em água destilada com condutividade elétrica 5 μS e pH próximo ao neutro. Dissolveram-se aproximadamente 70 g de soro em 1 L de água destilada para obter o líquido com a composição similar ao do soro original da fabricação do queijo mussarela. A massa específica do soro reconstituído é aproximadamente igual a 1,045 g. L⁻¹.

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

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

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

Fonte: a tabela adaptada de Elegê Alimentos (2005)

Tabela 3.2: Características nutricionais do soro em 100 g.

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

Fonte: Elegê Alimentos (2005)

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

O volume inicial a ser ultrafiltrado foi de 30 L de solução de soro de queijo sendo preparada a partir de aproximadamente 2 kg de soro em pó dissolvidos em 29 L de água destilada. As concentrações resultantes de lactose e de proteína foram $50,05 \text{ g. L}^{-1}$ e $7,8 \text{ g. L}^{-1}$, respectivamente, tomando a massa específica do soro reconstituído como $1,045 \text{ g. L}^{-1}$. As quantidades de gorduras para fins de cálculos foram consideradas desprezíveis por apresentarem valores baixos. Dessa forma, considerou-se que o soro é constituído somente por proteínas, sais e lactose. Portanto, a concentração de sais no soro reconstituído foi determinada pela diferença da concentração de sólidos totais pelo somatório de proteínas e lactose correspondendo a $7,15 \text{ g. L}^{-1}$ de sais.

3.2 Reagentes Analíticos

A Tabela 3.3 apresenta os reagentes utilizados para a realização das análises e da limpeza da membrana. As soluções foram preparadas com água destilada para o preparo da solução de soro e água adicionada em cada DF, e, para análises físico-químicas, água deionizada ou água grau HPLC

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

	Reagente	Pureza	Fornecedor
Ácidos	Ácido Bórico	P.A.	NUCLEAR
	Ácido Cítrico Monohidratado	P.A.	MERCK
	Ácido Sulfúrico	P.A.	SYNTH
Bases	Hidróxido de Sódio	P.A.	DINÂMICA
	Sulfato de Sódio	P.A.	MERCK
Outros	Acetonitrila	Grau HPLC	VETEC
	Álcool Etilico	P.A.	SYNTH
	Azul de Metileno	Comercial	NUCLEAR
	Carbonato de Sódio Anidro	P.A.	SYNTH
	Cloreto de Sódio	P.A.	F.MAIA
	Hipoclorito de Sódio 12%	Comercial	RTA
	Kit p/ determinação de Cloro	Comercial	LAMOTTE COMPANY
	Lactose Monoidratada	P.A.	NUCLEAR
	Óxido de Mercúrio amarelo	P.A.	VETEC
	Selenito de Sódio	P.A.	MERCK
	Sulfato de Cobre	P.A.	SYNTH
	Vermelho de Metila	Comercial	VETEC

3.3 Membrana de UF

A membrana utilizada nos processos de UF e DF é comercial, feita de polietersulfona em módulo espiral, fabricada pela KOCH MEMBRANE SYSTEMS, que possui como características massa molar de corte (MMC) de 10 kDa, espessura de alimentação de 43 mil (milésimo de polegada) e área de permeação de 0,3 m². A fotografia do módulo da membrana de UF está apresentada na Figura 3.1.

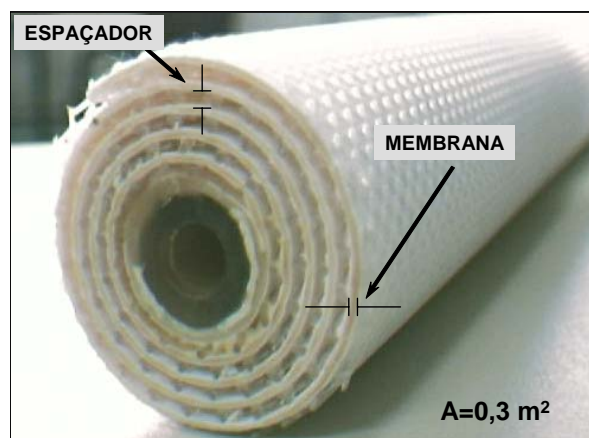


Figura 3.1: Fotografia do módulo da membrana de UF.

A membrana é caracterizada pelos dados fornecidos pelo fabricante os quais estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Informações técnicas da membrana de UF.

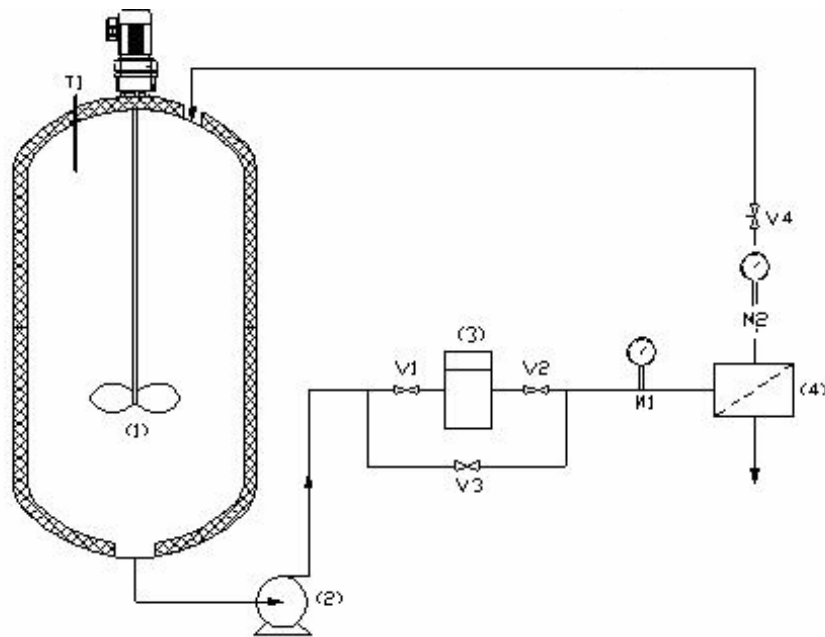
Informações técnicas da membrana	Faixa de operação
Temperatura Máxima	55°C
Pressão Máxima	8,62 kgf. cm ⁻²
Pressão de Saída Mínima	0,7 kgf. cm ⁻²
Máxima Contra-Pressão Admissível	0,35 kgf. cm ⁻²
Faixa de pH Admissível	1,8 - 11
Volume Interno	0,34 L
Vazão de Recirculação Recomendada	19 L. min ⁻¹

3.4 Equipamento

O processo de UF foi realizado numa planta piloto WGM-KOCH PROTOSEP IV localizada no Laboratório de Separação por Membrana da UFRGS. A fotografia da unidade piloto de UF está apresentada na Figura 3.2 e esquematizada na Figura 3.3.



Figura 3.2: Fotografia da unidade piloto de UF.



- | | |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1 – Tanque de Alimentação | V1,V2,V3 – Válvulas Tipo Esfera |
| 2 – Bomba Pneumática | V4 – Válvula de contrapressão |
| 3 – Pré-filtro | T1 – Termopar |
| 4 – Módulo Espiral de UF | M1, M2 – Manômetros |

Figura 3.3: Representação esquemática da unidade piloto de UF.

A unidade piloto de UF possui os seguintes equipamentos, de acordo com a Figura 3.3:

- tanque de alimentação encamisado (1) de aço inoxidável 304, com volume de 75 L, fabricado pela SULINOX. O tanque possui um agitador e um sistema de controle de temperatura que opera na faixa de temperatura de 25 a 150 °C;
- bomba pneumática (2) tipo diafragma, modelo VERSAMATIC VM.50, opera com ar comprimido que passa pelo sistema composto por um Kit FLR (filtro, lubrificador e regulador de ar);
- pré-filtro de cartucho (3), fabricado pela CUNO, constituído de uma carcaça de PVC e elemento filtrante de polipropileno com tamanho médio de poro de 1µm;
- carcaça para módulo em espiral (4), com 30 cm de comprimento e 5,8 cm de diâmetro, feita em de aço inoxidável 316;
- manômetros (M1) e (M2) de aço inoxidável 316, que estão instalados num tê Sanitech com uma câmara com diafragma, que evita contato do manômetro com o fluido de processo. Os manômetros possuem escala de 0 a 10,5 kgf. cm⁻²;
- válvulas tipo esfera (V1), (V2) e (V3), fabricadas pela VALSUL, e de contrapressão (V4) de PVC com diafragma.

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

O ar comprimido para o acionamento da bomba foi fornecido por um compressor SCHULZ com capacidade de 175 L e potência de 2 hp com vazão volumétrica de 0,00472 m³.s⁻¹. A pressão no equipamento foi ajustada, primeiramente, na válvula reguladora de ar da bomba pneumática e, após, através da válvula de contrapressão com diafragma que se localiza na saída do concentrado do módulo de UF. As pressões nas extremidades do módulo de UF foram medidas pelos manômetros instalados na entrada (M1) e na saída (M2). O valor da pressão transmembrana de operação no módulo de UF foi 2 bar manométrica, a qual é a média aritmética das duas pressões medidas.

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

O tanque de alimentação (1) com o sistema de aquecimento e termostato serve para manter a temperatura de operação constante e nos experimentos foi usada a temperatura de 50°C. Esta temperatura foi utilizada tendo em vista a temperatura de saída do soro do processo de fabricação do queijo (~ 60°C) e a temperatura máxima admissível para a membrana (~ 55°C). Além disto, na faixa de temperatura 15°C a 45°C ocorre o desenvolvimento de microorganismos que podem acidificar o soro, tornando o produto impróprio para posterior utilização (RICHER, 1982 apud CHERYAN, 1986).

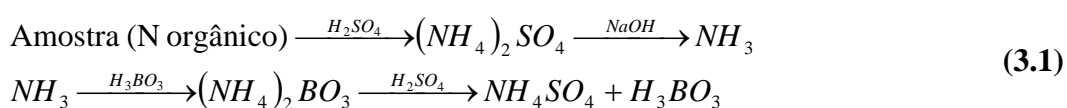
3.5 Métodos Analíticos

As características das amostras do concentrado e do permeado dos processos da UF e DF foram analisadas conforme descrito nos procedimentos a seguir.

3.5.1 Análise de Concentração de Proteína – Método de Kjeldahl

Trata-se de método direto de determinação de nitrogênio protéico e não-protéico. O método de Kjeldahl determina a matéria nitrogenada total de uma amostra.

O método baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico (H₂SO₄), numa temperatura entre 370-420 °C, para digestão até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônia [(NH₄)₂SO₄]. Após adiciona-se a este composto formado hidróxido de sódio concentrado (NaOH), e aquece-se para a liberação da amônia dentro de um volume conhecido de ácido bórico (H₃BO₃), formando borato de amônia [(NH₄)₃BO₃]. Em seguida, titula-se esta solução com a solução padronizada de H₂SO₄. A reação de formação do sulfato de amônia está apresentada na Equação 3.1:



O teor de nitrogênio determinado por esse método precisa ser corrigido para nitrogênio protéico.

Por intermédio dessa determinação quantifica-se a porcentagem de nitrogênio total presente na amostra. Esta porcentagem é convertida para porcentagem de proteína bruta mediante multiplicação por um fator denominado de fator de conversão de Kjeldahl igual a 6,38, o qual é especificado para cada tipo de proteína, (ANTUNES, 2003). A determinação da quantidade de proteína presente na amostra foi realizada de acordo com as normas de análises A.O.A.C, que foi adaptado pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS (CARVALHO *et al.* 2002).

Informações mais detalhadas desta técnica estão apresentadas no Anexo A.

3.5.2 Análise de Concentração de Lactose por Cromatografia Líquida (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pode ser utilizada na análise de qualquer substância solúvel no solvente utilizado como fase móvel. Todas as formas de cromatografia podem ser definidas como um processo de migração, em que os componentes da amostra são seletivamente retidos pela fase estacionária. Esta fase pode ser de material sólido ou líquido imobilizado (ARAÚJO, 1995).

A análise de concentração de lactose foi realizada no cromatógrafo HPLC PerkinElmer Series 200 com um detector de índice de refração. A fase móvel usada foi 75% de acetonitrila em água grau HPLC e a coluna utilizada foi Spheri-5-animo (5 μ , 220 x 4,6 mm).

Para determinar a quantidade de lactose presente nas amostras da UF e das DFs foi construída uma curva padrão, que se encontra no Apêndice A, a partir de concentrações conhecidas de lactose num intervalo de máximo e mínimo de quantidade lactose presente no soro de queijo. Para cada análise foram usados 20 μ L de amostra. As condições de trabalho usadas foram temperatura de 45°C e vazão de alimentação 1,5 mL. min⁻¹.

As amostras do concentrado foram preparadas antes de serem injetadas para evitar a saturação da pré-coluna do HPLC. Primeiramente, as amostras do concentrado foram centrifugadas por um período de 30 minutos e, após, as amostras foram passadas através de uma membrana do tipo GS ESTER CELULOSE da MILLIPORE, com tamanho médio de poro de 0,5 μ m, cujo objetivo é evitar a entrada de microorganismos na coluna do HPLC. Em

seguida, as amostras foram diluídas 10 vezes utilizando-se pipetas automáticas da DIGIPET na faixa de (20-200) μL e (100–1000) μL .

3.5.3 Análise de pH

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

3.5.4 Análise de Condutividade Elétrica

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

3.5.5 Análise de Extrato Seco Total

O valor do extrato seco total é o parâmetro adotado para a verificação da concentração total de matéria seca não-volátil do soro de queijo. A medida do extrato seco total foi feita através da técnica gravimétrica de acordo como método apresentado em LANARA, 1981.

Informações mais detalhadas desta técnica estão apresentadas no Anexo A.

3.6 Limpeza do Sistema de Membranas

A limpeza tem por objetivo restituir as características de fluxo e retenção da membrana e prevenir o desenvolvimento de microorganismos no sistema. Antes e após cada experimento, o procedimento de limpeza foi efetuado conforme a recomendação do fabricante (WGM-KOCH), descrita a seguir:

- enxágüe inicial com água destilada para retirada da solução de soro do sistema;
- posteriormente, preenche-se o sistema com água destilada adicionando-se soda cáustica até atingir pH entre 10 a 10,5, a qual é mantida por 15 a 20 minutos na temperatura de aproximadamente 50°C a uma pressão transmembrana de 1,5 bar ;
- adiciona-se a solução de hipoclorito de sódio até a concentração de 200 ppm a qual é mantida por 5 minutos circulando no sistema;
- enxágua-se novamente o sistema com água destilada por 20 minutos para remoção da solução básica, mantendo-se as mesmas condições de processo;
- preenche-se o sistema com água destilada, adicionando-se ácido cítrico até atingir pH 2, esta solução é mantida no sistema por 10 minutos na temperatura de aproximadamente 50°C a uma pressão de 1,5 bar;
- enxágua-se novamente o sistema com água destilada por 20 minutos.

Antes e após a limpeza, o fluxo permeado de água pura é medido.

3.7 Metodologia Experimental

Os experimentos realizados na unidade piloto de UF foram efetuados em duas etapas distintas. A primeira etapa teve como objetivo concentrar as proteínas do soro de queijo através do processo de UF e a segunda etapa consiste em purificar estas proteínas usando a DF. Para cada uma destas etapas foram obtidos concentrados com características diferentes, os quais possuem aplicações de acordo com suas características.

3.7.1 UF do Soro de Queijo

Primeiramente, dissolveu-se soro em pó em água destilada, obtendo-se 30 L de solução de soro, conforme explicado na seção 3.1. Esta solução foi colocada no tanque e homogeneizada com o agitador mecânico por aproximadamente 15 min.

A diferença de pressão transmembrana foi mantida em 2 kgf. cm^{-2} e a vazão da corrente de alimentação do soro de queijo foi de aproximadamente 850 L. h^{-1} . A solução entra em contato com o módulo de membrana de UF onde a corrente concentrada retorna ao tanque. Essa solução é concentrada até um volume final de 6 L. O permeado foi coletado em bombonas de 20 L retirando-se, portanto, um volume de 24 L de permeado no final de experimento. A Figura 3.4 apresenta, de forma esquematizada, o processo de concentração do soro por UF. No final do processo de UF, o fator de concentração volumétrico foi de aproximadamente 5.

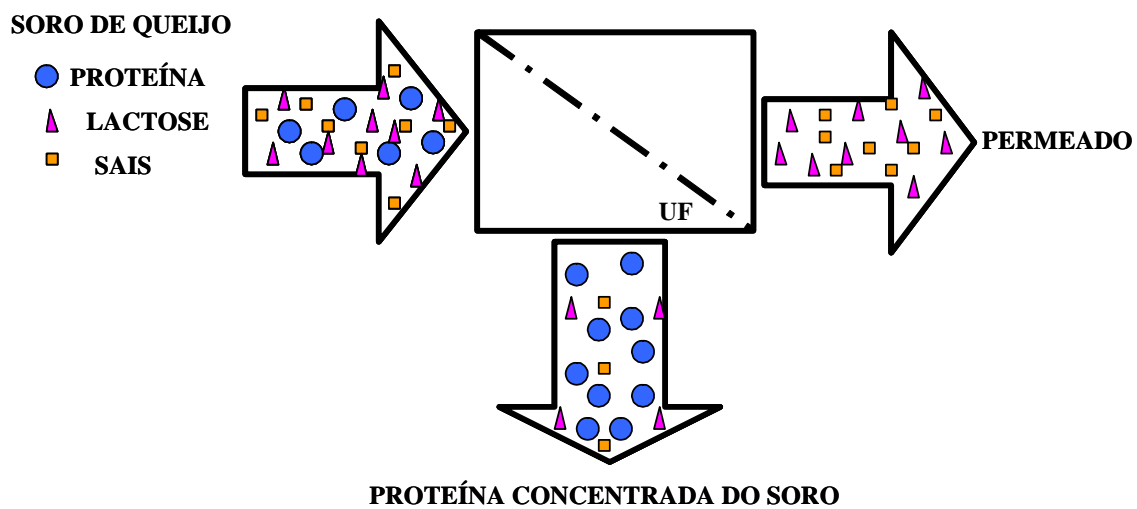


Figura 3.4: Representação esquemática do processo de UF.

O fluxo volumétrico do permeado foi determinado através de medida de tempo necessário para a remoção de 100 mL de permeado, utilizando-se uma proveta graduada.

Foram coletadas, a cada uma hora e meia de operação, simultaneamente, amostras das correntes de permeado e de concentrado em frascos de vidro âmbar. As análises feitas nas amostras foram: pH, condutividade elétrica, extrato seco total e as concentrações de lactose e de proteína.

3.7.2 DF do Soro de Queijo

A DF foi subdividida em duas etapas. A primeira etapa consistiu em realizar duas DFs no concentrado da UF. Essas DFs têm como objetivo purificar o concentrado protéico.

A primeira DF foi feita adicionando-se 6 L de água destilada no concentrado da UF, obtendo-se um volume total de solução a ser ultrafiltrado de 12 L. A solução foi concentrada até o volume final de 6 L.

Na segunda DF foi adicionado o mesmo volume da primeira DF de 6 L de água destilada no retentado gerado na primeira DF, resultando num volume total de solução de 12 litros. Após a solução foi concentrada até o volume final de 6 litros. A Figura 3.5 apresenta de forma esquematizada os processos de DFs no concentrado da UF.

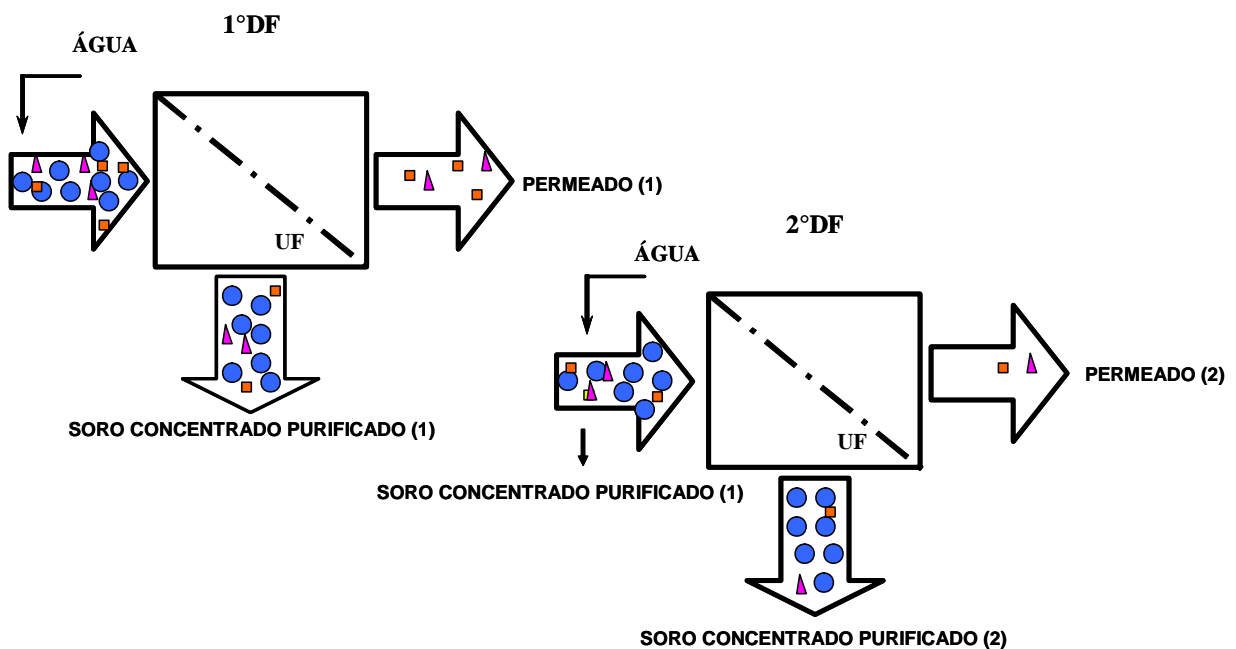


Figura 3.5: Representação esquemática do processo de DFs.

3.8 Otimização do processo de purificação

Para dar um tratamento matemático aos resultados experimentais, foi criado um programa computacional, usando o software MATLAB ® versão 5.3, que permite a otimização do processo de purificação da proteína usando DFs. Essa ferramenta foi escolhida dentre vários programas computacionais capazes de determinar mais de uma variável.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da etapa experimental onde foram realizados testes para a determinação da pressão transmembrana a ser utilizada nos experimentos de UF e DFs e testes de concentração e purificação das proteínas do soro de queijo. Nestes experimentos a variação do fluxo permeado com o tempo e com a concentração do soro foi avaliada. Na segunda fase foi desenvolvido um procedimento computacional, a partir dos resultados experimentais com o objetivo de criar um modelo matemático capaz de prever o comportamento do processo em diferentes condições experimentais, e desta forma permitir a escolha entre diferentes tipos de concentrado e permeado para as mais diversas aplicações. Esse procedimento de modelagem se encontra desenvolvido no Capítulo 5. Todos os dados experimentais apresentados neste capítulo encontram-se tabelados no Apêndice A.

4.1 Escolha e determinação das condições de operação para os processos UF e DF

A escolha de um bom valor para cada variável de processo como a pressão transmembrana, vazão de alimentação e temperatura é de fundamental importância para as demais etapas deste trabalho que consiste na concentração e purificação das proteínas por UF operando em batelada na etapa de concentração e no modo DF na etapa de purificação.

4.1.1 Pressão transmembrana de operação

Primeiramente foram realizados experimentos medindo-se o fluxo permeado em diferentes pressões transmembrana com água e ,posteriormente, com soro. A pressão transmembrana corresponde a diferença entre a média aritmética das pressões de entrada e saída do módulo de membrana e a pressão da corrente permeada. O objetivo foi determinar a pressão de operação adequada através do comportamento do fluxo permeado do soro. A Figura 4.1 apresenta o fluxo permeado do soro em função da pressão transmembrana. Observa-se que o fluxo permeado do soro é muito menor do que o fluxo de água pura; isto evidencia que o efeito de polarização por concentração é bastante significativo para o soro na

concentração inicial e este efeito tende a se agravar à medida que o soro vai sendo concentrado. Neste caso pode-se afirmar que o aumento de fluxo é limitado pelo aumento da camada polarizada, isto é, o aumento de pressão transmembrana é contra balanceado pelo aumento da resistência total. Observa-se que na pressão transmembrana de 4 bar, já é, praticamente, atingido o fluxo limite.

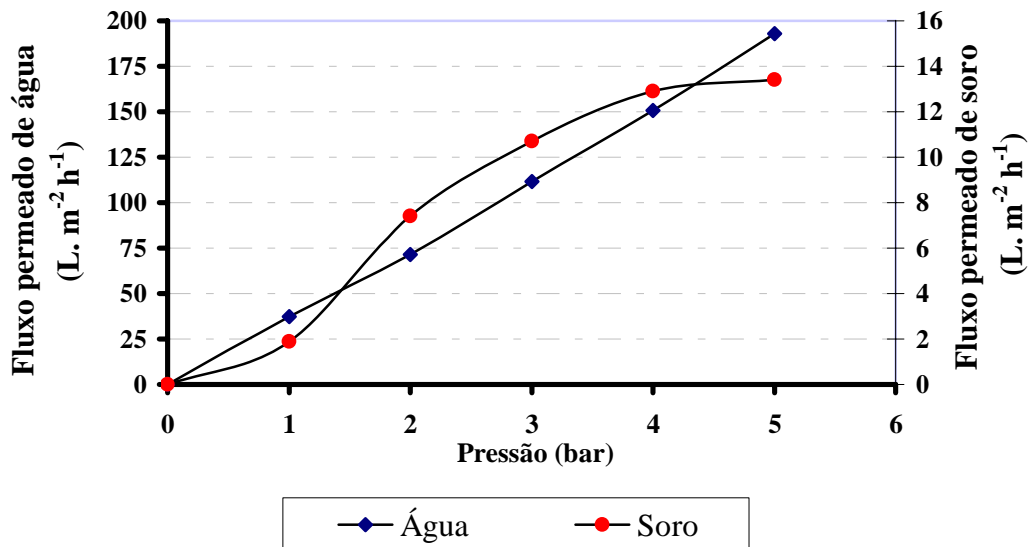


Figura 4.1: Fluxo permeado de água e soro com diferentes pressões.

Esse mesmo comportamento foi encontrado por Muller *et al.* (2003), Rektor e Vatai (2004) e Atra *et al.* (2005). Devido à pequena diferença entre os fluxos permeados que foram de 9,8 a 10,5 L. m⁻² h⁻¹ para as pressões de 2 a 3 bar, respectivamente, optou-se por trabalhar na pressão de 2 bar, visto que quanto maior a pressão aplicada maior a quantidade de soluto que chega à superfície da membrana o que intensifica ainda mais o fenômeno de polarização por concentração e a tendência de formação de *fouling* na membrana.

4.1.2 Temperatura de processo

A temperatura de processo na concentração e purificação das proteínas do soro de queijo foi definida em 50°C, devido aos seguintes fatores: a) quanto maior a temperatura menor será a viscosidade da solução e, conseqüentemente maior será o fluxo permeado; b) a temperatura de saída do soro no processo de fabricação de queijos é de aproximadamente 60°C e a temperatura máxima permissível à membrana, indicada pelo fabricante, é de 55°C; c) na faixa de temperatura entre 15°C a 45°C ocorre o desenvolvimento de microorganismos

que podem acidificar o soro, tornando o produto impróprio para posterior utilização (RICHER, 1982 apud CHERYAN, 1986).

4.1.3 Vazão de alimentação de UF e DF

Com o objetivo de selecionar a vazão de alimentação mais adequada para a concentração das proteínas realizou-se um experimento variando a vazão de alimentação com a medida simultânea do fluxo permeado. A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos para o fluxo permeado para diferentes taxas de alimentação na pressão transmembrana de 2 bar. Observa-se que o fluxo aumenta à medida que a vazão de alimentação aumenta, porém, devido à limitação do equipamento, tal como oscilações na pressão do compressor que impulsiona a bomba, optou-se por trabalhar com a vazão de alimentação de 850 L. h⁻¹. Além disso, a vazão de trabalho para as DFs foi de 760 L. h⁻¹ sendo esta a máxima vazão atingida na pressão de trabalho de 2 bar nesta etapa. Acredita-se que isto ocorra em função do aumento de viscosidade da solução ao mesmo tempo em que se aumenta a concentração de proteínas com redução dos componentes permeáveis (sais, lactose e água). O aumento de viscosidade foi observado visualmente, embora medidas não tenham sido tomadas, notou-se que a solução assume um aspecto pastoso.

Tabela 4.1: Variação do fluxo permeado do soro de queijo com a vazão de alimentação na pressão transmembrana de 2 bar.

Vazão de alimentação (L. h ⁻¹)	Fluxo Permeado (L. m ⁻² h ⁻¹)
576	10,5
685	12,7
850	14,8
900	17,5

4.2 Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo

Uma vez determinadas as condições experimentais que são uma função do tipo de membrana, do equipamento e da solução de alimentação, realizaram-se os experimentos de concentração e purificação das proteínas do soro de queijo.

Todos os experimentos de concentração foram realizados nas seguintes condições de operação: pressão transmembrana igual a 2 bar, temperatura de 50°C e vazão de escoamento

da corrente de alimentação de 850 L. h^{-1} . Nos experimentos de purificação, somente a taxa de alimentação foi alterada para 760 L. h^{-1} .

4.2.1 Experimentos de concentração das proteínas do soro de queijo

A compactação da membrana foi realizada previamente a fim de evitar um declínio de fluxo permeado devido ao adensamento da microestrutura da membrana durante o processo UF. Este procedimento foi realizado à pressão transmembrana de 3 bar, acima da pressão de operação (2 bar), com água pura até o fluxo de permeado se estabilizar em $144 \text{ L. m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. A Figura 4.2 apresenta o comportamento do fluxo permeado de água na compactação da membrana de UF.

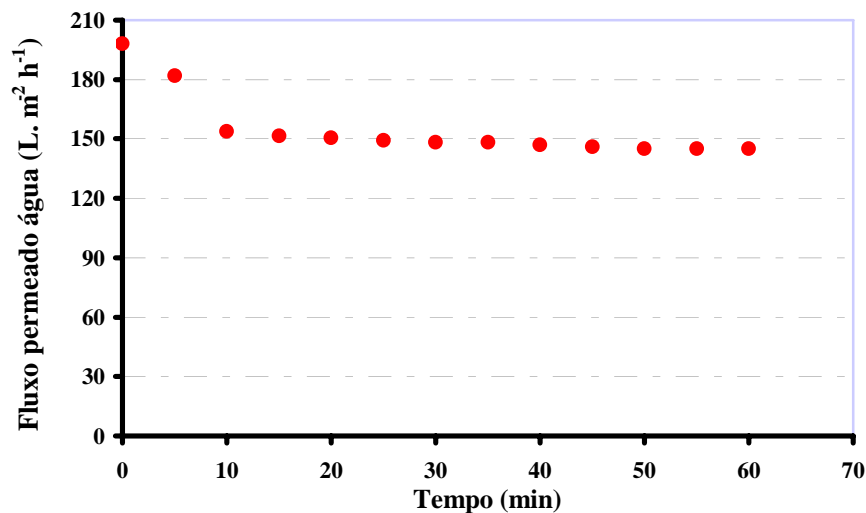


Figura 4.2: Fluxo permeado de água com tempo durante a compactação da membrana de UF.

A Figura 4.3 apresenta o fluxo permeado de soro em função do tempo para os Experimentos 1 e 2.

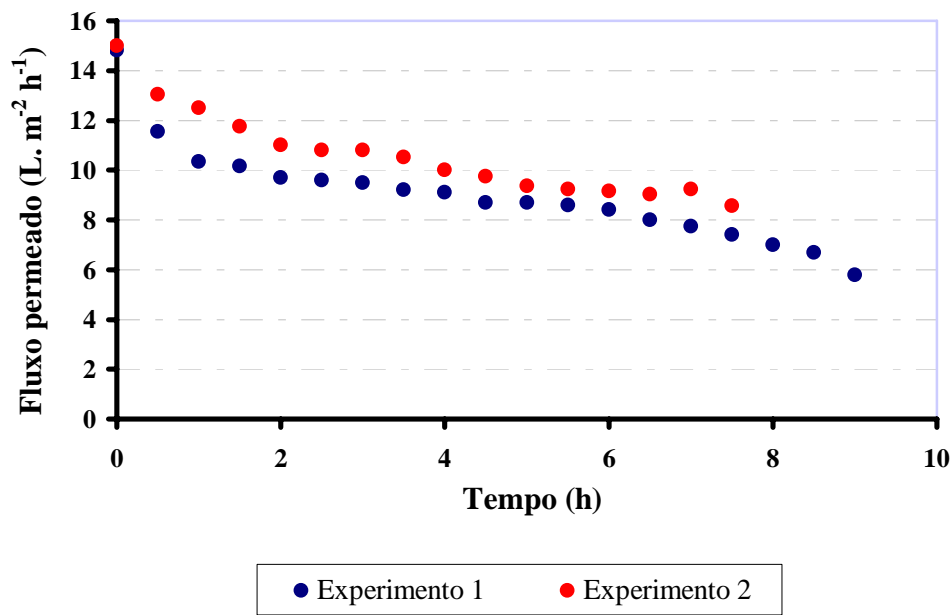


Figura 4.3: Fluxo permeado de soro com tempo.

Observa-se que o fluxo diminui com o tempo de operação sendo que estes resultados estão de acordo com os apresentados nos trabalhos de Veiga e Viotto (2001), Rao (2002), Castro e Gerla (2004), Rektor e Vatai (2004), Khider *et al.* (2004) e Prudêncio *et al.* (2005). A queda inicial mais acentuada foi devida à formação da camada de polarização por concentração e *fouling*. Ao longo do processo estes fenômenos podem ser agravados principalmente pelo aumento de concentração de proteínas no soro que provoca a alteração das propriedades físico-químicas e de transporte da solução. A redução de fluxo permeado é um dos fatores limitantes do processo, do ponto de vista operacional. Pode-se notar que o fluxo permeado do Experimento 1 diminui para aproximadamente a metade ao completarem-se 8 h de experimento.

A diferença entre os fluxos permeados dos Experimentos 1 e 2 se deve a uma maior concentração de proteínas no soro utilizado no Experimento 1, o que resultou em um menor fluxo. Na verdade, a diferença é pequena, mas como a proteína é totalmente retida pela membrana, e o aumento da concentração de proteína exerce um efeito maior sobre o fluxo (polarização). Além disso, a polarização por concentração tem um efeito sobre o *fouling*, quanto maior a polarização por concentração maior a tendência de ocorrer *fouling*.

O fator limitante que determinou o final do experimento foi a soma do volume mínimo de soro no tanque de alimentação com o volume morto, aproximadamente 6 L.

Conseqüentemente, como o fluxo permeado do Experimento 2 foi maior o tempo necessário para remover 24 L de permeado de um total de 30 L de alimentação foi menor.

O fluxo permeado de água pura através da membrana UF é de $144,6 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Observou-se que para as mesmas condições operacionais ocorreu uma diferença significativa nos fluxos permeados do soro e da água.

A Figura 4.4 apresenta o comportamento do fluxo permeado de soro em função da razão de concentração volumétrica, fator de concentração. Observa-se que tanto para o Experimento 1 como para o Experimento 2, o fluxo permeado diminui à medida que o fator de concentração aumenta, sendo este declínio mais acentuado para o Experimento 1. O fator de concentração máximo alcançado de 5 foi em função das limitações da unidade experimental, anteriormente descritas.

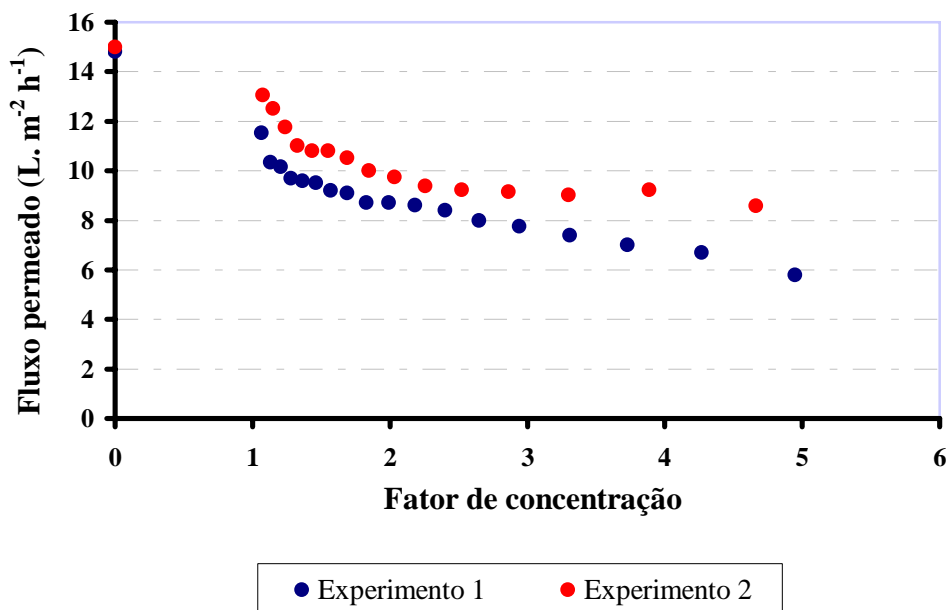


Figura 4.4: Fluxo permeado de soro em função do fator de concentração.

4.2.2 Experimentos de purificação das proteínas do soro de queijo

Para a produção de CPS com alto teor de proteína utilizou-se a DF. Este processo promove a produção de um concentrado protéico mais puro, pois remove sais e lactose do concentrado protéico. A Figura 4.5 apresenta o comportamento do fluxo permeado de soro em função do tempo para os experimentos de DF. É importante salientar que não foi realizada limpeza química, nem tampouco enxágüe com água após o experimento de concentração. No Experimento 1, a primeira DF iniciou com fluxo permeado abaixo do fluxo inicial da UF,

devido ao *fouling* já formado na etapa de concentração das proteínas, e, após diminuiu com o tempo. O mesmo ocorreu com a segunda DF, pois esta iniciou com fluxo permeado um pouco menor em relação ao da primeira DF, apesar do teor de sólidos totais ser menor. As DFs do Experimento 2 apresentam comportamento semelhante ao do Experimento 1.

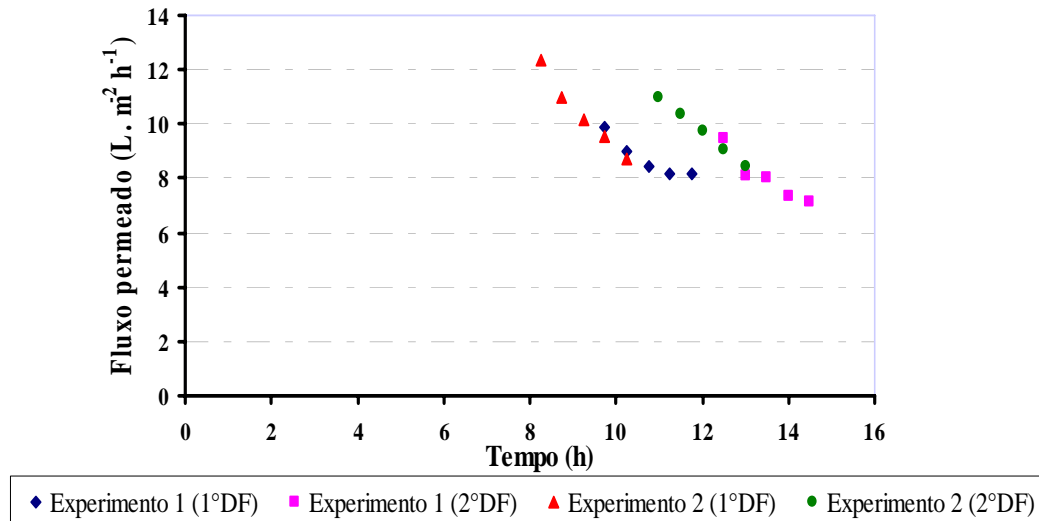


Figura 4.5: Fluxo permeado nas diafiltrações de concentrado de soro com tempo.

As Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam os resultados de concentração dos diferentes componentes do soro no concentrado e no permeado para os Experimentos 1 e 2. A Figura 4.6 apresenta a retenção observada para os componentes do soro no Experimento 1, em função do tempo, sendo os sete primeiros pontos correspondentes ao processo de concentração por UF seguidos por 4 pontos da primeira DF e os 3 últimos pontos da segunda DF. Todo o processo resultou em um total de 15 horas. O Experimento 2 apresentou comportamento semelhante ao Experimento 1.

Tabela 4.2: Características do concentrado e do permeado do Experimento 1.

Amostras	Tempo (h)	Proteína (g. L ⁻¹)	Lactose (g. L ⁻¹)	Sólidos Totais (g. L ⁻¹)	Condutividade elétrica (mS. cm ⁻²)	pH
Concentrado UF						
1	0,0	9,1	46	60,0	6,18	6,36
2	1,5	10,5	47	60,4	6,22	6,37
3	3,0	11,4	48	70,0	6,28	6,38
4	4,5	14,4	48	80,2	6,33	6,39
5	6,0	18,3	53	90,1	6,31	6,38
6	7,5	25,5	51	100,5	6,34	6,38
7	9,0	40,0	52	140,8	6,13	6,39
Concentrado 1°DF						
1	9,75	18,1	24	56,0	3,45	6,45
2	10,75	24,2	25	67,5	3,54	6,46
3	11,75	36,0	25	85,0	3,62	6,46
Concentrado 2°DF						
1	12,5	17,5	11	39,5	1,89	6,52
2	13,5	23,1	23	45,5	1,96	6,52
3	14,5	30,5	12	67,5	2,12	6,51
4	15,5	39,7	13	127,5	2,17	6,41
Permeado UF						
1	0,0	-	39	50,1	6,12	6,4
2	1,5	-	43	52,0	6,25	6,39
3	3,0	-	27	53,4	6,26	6,39
4	4,5	-	31	56,5	6,29	6,38
5	6,0	-	36	54,5	6,37	6,38
6	7,5	-	45	64,0	6,47	6,39
7	9,0	-	30	67,5	6,64	6,38
Permeado 1°DF						
1	9,75	-	18	25,5	3,29	6,45
2	10,75	-	22	28,0	3,37	6,45
3	11,75	-	20	30,0	3,48	6,46
Permeado 2°DF						
1	12,5	-	10	12,0	1,64	6,51
2	13,5	-	9	12,0	1,71	6,53
3	14,5	-	9	13,0	1,79	6,52
4	15,5	-	10	16,0	1,82	6,51

Tabela 4.3: Características do concentrado e do permeado do Experimento 2.

	Tempo (h)	Proteína (g. L ⁻¹)	Lactose (g. L ⁻¹)	Sólidos Totais (g. L ⁻¹)	Condutividade elétrica (mS. cm ⁻²)	pH
Concentrado UF						
1	0,0	8,3	46	65,0	5,76	6,53
2	1,5	9,1	48	70,0	5,87	6,54
3	3,0	11,7	42	73,5	5,88	6,53
4	4,5	15,1	54	79,5	5,91	6,54
5	6,0	20,5	56	89,0	5,93	6,55
6	7,5	32,7	58	102,5	5,72	6,56
Concentrado 1ºDF						
					-	
1	9,75	19,6	33	51,0	3,48	6,6
2	10,75	21,3	29	61,0	3,56	6,6
3	11,75	34,5	49	78,0	3,52	6,6
Concentrado 2ºDF						
1	12,5	16,6	26	37,0	2,04	6,72
2	13,5	22,9	14	45,0	2,12	6,73
3	14,5	33,8	15	61,0	2,25	6,74
Permeado UF						
					-	
1	0,0	-	53	50,0	5,68	6,51
2	1,5	-	55	49,5	5,95	6,52
3	3,0	-	54	50,1	5,95	6,51
4	4,5	-	51	52,0	6,01	6,52
5	6,0	-	57	54,0	6,04	6,51
6	7,5	-	49	56,0	6,1	6,51
Permeado 1ºDF						
1	9,75	-	24	27,0	3,32	6,61
2	10,75	-	25	28,0	3,44	6,61
3	11,75	-	26	29,0	3,53	6,61
Permeado 2ºDF						
1	12,5	-	13	13,0	1,83	6,71
2	13,5	-	11	14,7	1,92	6,72
3	14,5	-	19	14,3	2	6,71

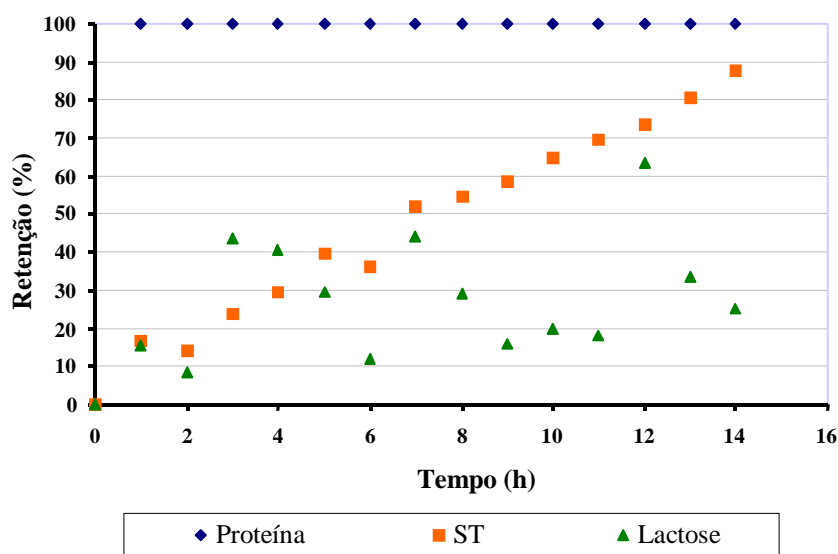


Figura 4.6: Retenção dos componentes do soro com o tempo.

Analisando os resultados da Tabela 4.2 e da Tabela 4.3 observa-se que a concentração de proteínas aumenta ao longo do experimento de permeação, quase quadruplicando o seu valor inicial. Analisando a UF e a DF conjuntamente observa-se que a condutividade elétrica e o teor de lactose diminuíram na DF devido ao efeito de lavagem. Em relação ao teor de sólidos totais observa-se que houve um aumento nas correntes de concentrado de todas as etapas devido principalmente ao aumento de concentração de proteína. O pH não sofreu alterações significativas durante todo o processo, uma vez que a alteração principal na corrente concentrada é o aumento da concentração de proteína, a qual, aparentemente, não contribui para alteração de pH.

Nota-se que a concentração de proteína da primeira DF é praticamente a mesma da segunda DF, no entanto o teor de contaminantes, sais e lactose, da segunda DF é menor que a primeira DF, pois os teores de lactose e os valores de condutividade elétrica se reduziram significativamente.

A observação da Figura 4.6 indica que a retenção das proteínas é total, enquanto que a retenção de sólidos totais aumenta com tempo de experimento. Este aumento se deve ao teor de proteínas que no limite, quando o teor de componentes permeáveis tendesse a zero, a retenção resultante seria a de proteínas. Esta tendência é observada na Figura 4.6. Em relação à lactose, observa-se que a retenção oscila bastante em torno de valor médio aproximado de 20%. Isto leva a crer que a membrana apresenta uma retenção parcial a lactose o que propicia uma maior dificuldade na purificação das proteínas.

A massa de proteínas manteve-se constante, no concentrado, durante os processos e este resultado está de acordo com o apresentado no trabalho Leite *et al.*, 2006. Já para os sólidos totais o comportamento não foi o mesmo, pois ocorreu a redução com o tempo de sua massa no concentrado durante a UF e DFs.

4.3 Limpeza e sanitização do equipamento

Após cada um dos Experimentos 1 e 2 de concentração e purificação das proteínas por UF, o equipamento foi higienizado de acordo com o item 3.6. O procedimento apresentado a seguir foi realizado em três etapas de limpeza química e após cada uma dessas etapas a membrana foi submetida ao enxágüe com água destilada.

Para verificar a eficiência no procedimento de limpeza foram realizadas medidas de fluxos permeados de água após remover completamente as soluções residuais de limpeza química da membrana com água destilada. A remoção completa da solução residual de limpeza é verificada através das medidas de condutividade elétrica. O objetivo é obter valores de fluxo permeado que servirão como referência para posteriores experimentos mantendo as mesmas condições de processos que foram estabelecidos inicialmente. Dessa forma pode-se saber o quanto a membrana vai se incrustando ao longo de cada experimento.

A Tabela 4.4 apresenta o fluxo permeado de água após Experimento 1 e Experimento 2 no final de cada etapa do tratamento químico em que a membrana de UF foi submetida. Esse procedimento foi realizado na pressão transmembrana média de 1,5 bar e na temperatura aproximada de 50°C.

Tabela 4.4: Medidas de fluxo de água após enxágüe em cada etapa da limpeza química.

Limpeza química	Fluxo permeado de água ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$)	
	Experimento 1	Experimento 2
Solução alcalina	10,9	9,9
Solução hipoclorito	20	18,7
Solução ácida	40	38

Os resultados dos fluxos após Experimento 1 e Experimento 2 não foram os mesmos mostrando que uma parte da formação de depósitos das partículas do soro é irreversível. No

entanto, a recuperação de fluxo permeado com a limpeza foi bastante boa. Todas as medidas de fluxo foram realizadas em triplicata.

Os valores obtidos foram utilizados como referência para cada início de um novo experimento de concentração do soro.

4.4 Análise da variação do fluxo permeado com as concentrações dos componentes do soro

A análise do comportamento de fluxo permeado com as concentrações dos componentes do soro de queijo com os dados obtidos anteriormente tem como finalidade identificar aqueles que interferem de uma forma significativa na variação do fluxo permeado durante o processo de concentração e purificação das proteínas. Com esses dados, serão ajustadas as equações empíricas que serão utilizadas na etapa de otimização do processo de purificação das proteínas.

4.4.1 Variação de fluxo permeado com teor de proteínas

As Figuras 4.7 e 4.8 mostram o fluxo permeado do processo de concentração juntamente com as duas DFs em função da concentração de proteína. Observa-se que, tanto para o Experimento 1 como para o Experimento 2, o fluxo permeado decresce com o tempo de processo. Na primeira etapa de DF ocorre uma melhora do fluxo de permeação devido ao processo de diluição com água pura. Comparando a composição do soro inicial, a concentração de lactose e de sais na solução diluída é menor e, portanto, seria de esperar que o fluxo permeado na DF fosse superior ao da UF. Contudo, os resultados obtidos para a segunda DF não seguem a mesma tendência, isto ocorreu, provavelmente, devido ao *fouling* e polarização por concentração formados ao longo do tempo de experimento.

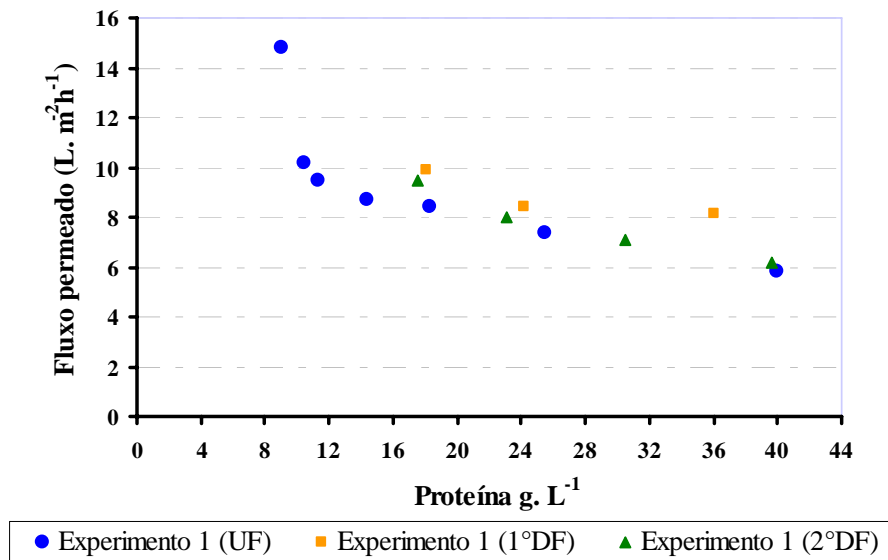


Figura 4.7: Fluxo permeado do Experimento 1 versus concentração de proteína no concentrado.

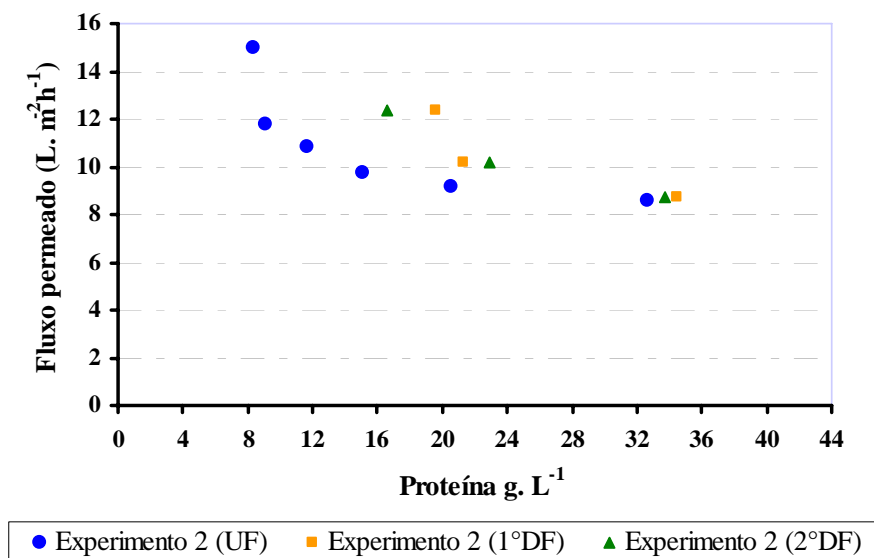


Figura 4.8: Variação de fluxo permeado do Experimento 2 com concentração de proteína no concentrado.

4.4.2 Variação de fluxo permeado com teor de sólidos totais

O procedimento adotado para acompanhar o aumento de concentração de sólidos totais no soro é a determinação do extrato seco não-volátil. Este procedimento está baseado na determinação gravimétrica do resíduo sólido após a remoção da água de uma forma lenta e gradual por evaporação. Este método apresenta a concentração em percentagem mássica de sólido presente sem discriminar os seus componentes.

Nas Figuras 4.9 e 4.10 são apresentados os gráficos do fluxo permeado em função do teor de sólidos totais no concentrado ao longo do processo de concentração e purificação das proteínas. Observa-se que ocorre uma redução gradual de fluxo permeado à medida que o teor de sólidos totais aumenta. Este fenômeno é um dos fatores limitantes no processo de concentração de soluções por UF. Vale salientar que, em função das limitações do equipamento, não foi atingido o fluxo mínimo admissível, pois este se apresentou mais ou menos estável quando os experimentos foram terminados (6 e 8 L. m⁻² h⁻¹).

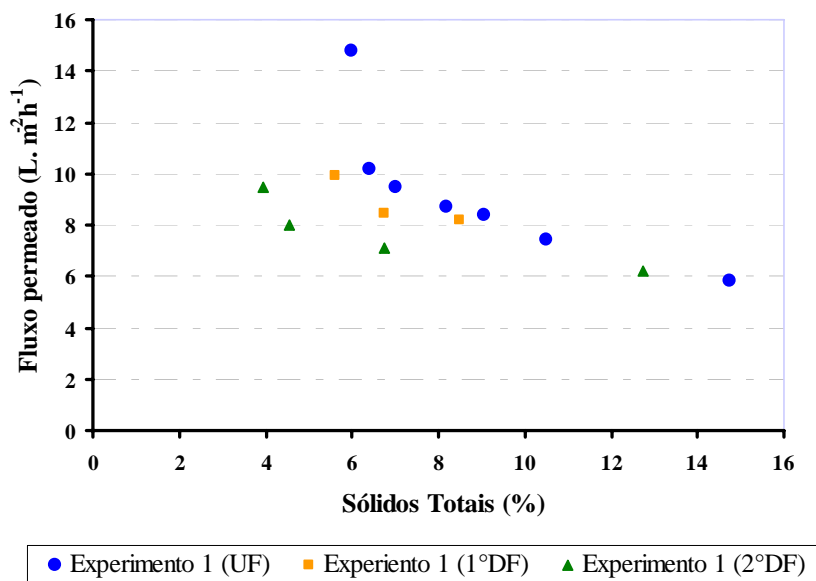


Figura 4.9: Variação de fluxo permeado do Experimento 1 com o percentual de sólidos totais no concentrado.

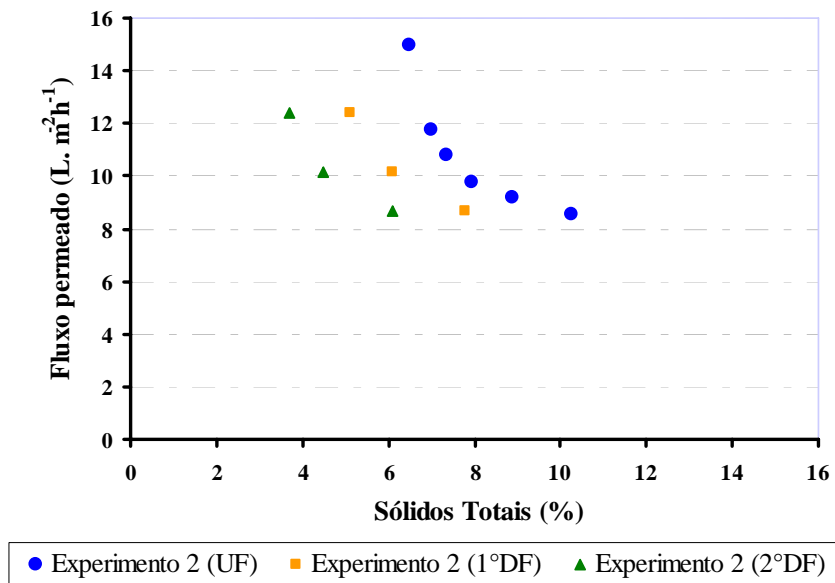


Figura 4.10: Fluxo permeado do Experimento 2 com o percentual de sólidos totais no concentrado.

4.4.3 Variação de fluxo permeado com teor de lactose

O teor de lactose foi determinado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A curva de calibração do HPLC com as concentrações de lactose encontra-se no Apêndice A.

Na Figura 4.11 e Figura 4.12 são apresentados os gráficos da variação do fluxo permeado do processo de UF, juntamente, com as duas DFs em função da concentração de lactose. Observa-se que tanto no Experimento 1 quanto no Experimento 2 ocorrem variações significativas de fluxo permeado para concentrações de lactose similares, mostrando que o fluxo não depende da concentração de lactose.

Por outro lado, acredita-se que as medidas de concentração de lactose não tem boa precisão, pois, para uma mesma amostra, apresentaram resultados significativamente diferentes entre si, conforme pode ser constatado no Apêndice A. As possíveis causas para explicar estes resultados foram atribuídas a erros de amostragem, sendo mais evidentes para as amostras dos concentrados. As seguintes fontes de erro foram detectadas: a) a coleta de amostras do soro do tanque de alimentação, onde este entra em contato com o ar, o que pode propiciar o desenvolvimento de microorganismos, os quais consomem fontes de carbono presentes na amostra, representada por açúcares, mais especificamente a lactose; b) nas etapas de centrifugação e de filtração, com a membrana de 0,5 µm de poro, pode ter ocorrido perda

de amostra; c) erros na etapa de diluição, por se tratar de alíquotas muito pequenas na faixa de μL .

Portanto, tendo em vista estas variações não foi possível obter uma relação sobre a variação de fluxo permeado com a concentração de lactose.

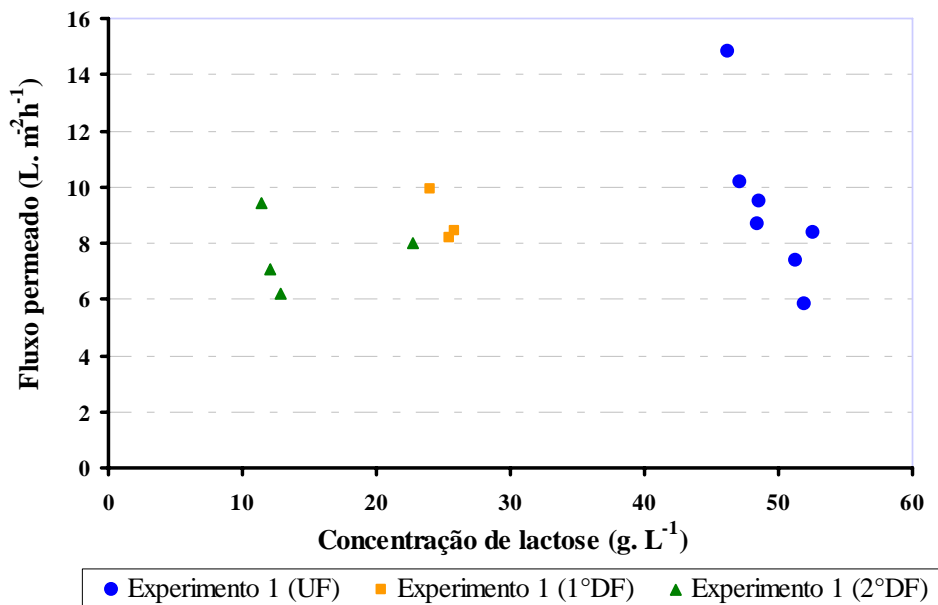


Figura 4.11: Fluxo permeado no Experimento 1 com a concentração de lactose.

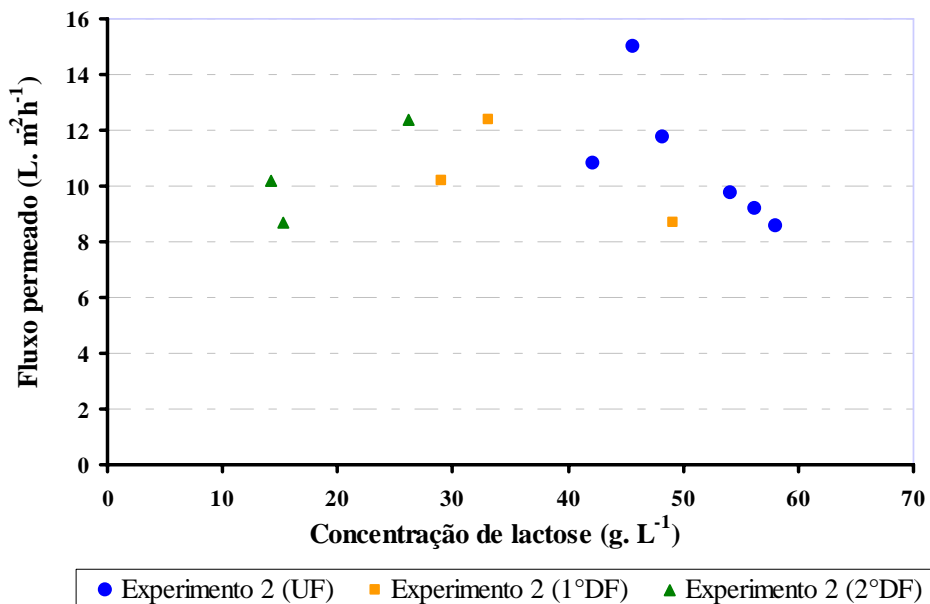


Figura 4.12: Fluxo permeado no Experimento 2 com a concentração de lactose.

4.4.4 Variação do fluxo permeado com teor de sais

A medida da condutividade elétrica no concentrado do soro de queijo da UF e das DFs foi realizada para verificar se houve alteração das espécies eletricamente ativas. Estas, em sua grande maioria compreendem os sais de cálcio e sódio dissolvidos, e representam componentes para os quais a membrana não é seletiva.

As Figura 4.13 e Figura 4.14 mostram os gráficos da variação do fluxo permeado do processo de UF, juntamente, com as duas DFs em função da condutividade elétrica. Observa-se que nas figuras do Experimento 1 e do Experimento 2, de modo geral, a condutividade elétrica do soro permaneceu praticamente constante em cada operação.

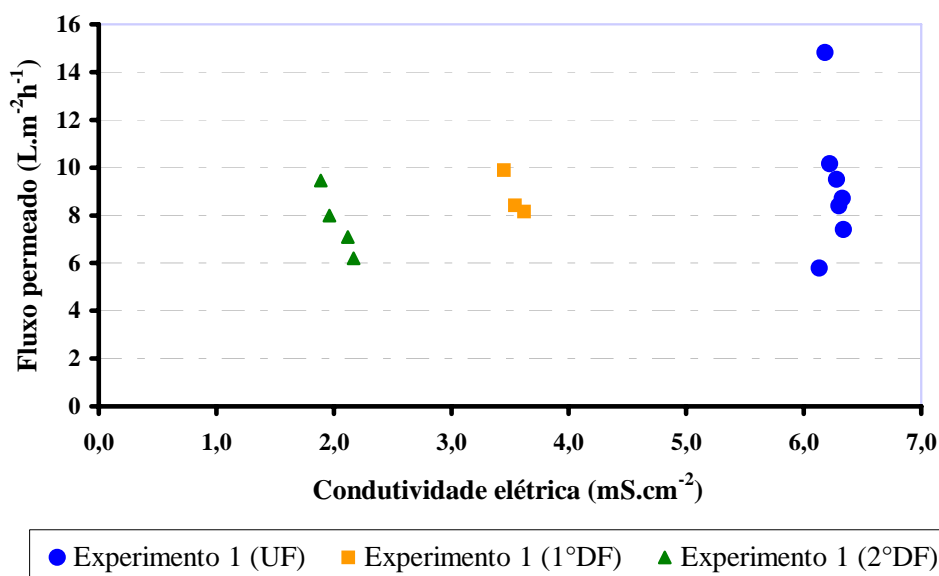


Figura 4.13: Variação de fluxo permeado do Experimento 1 com a condutividade elétrica.

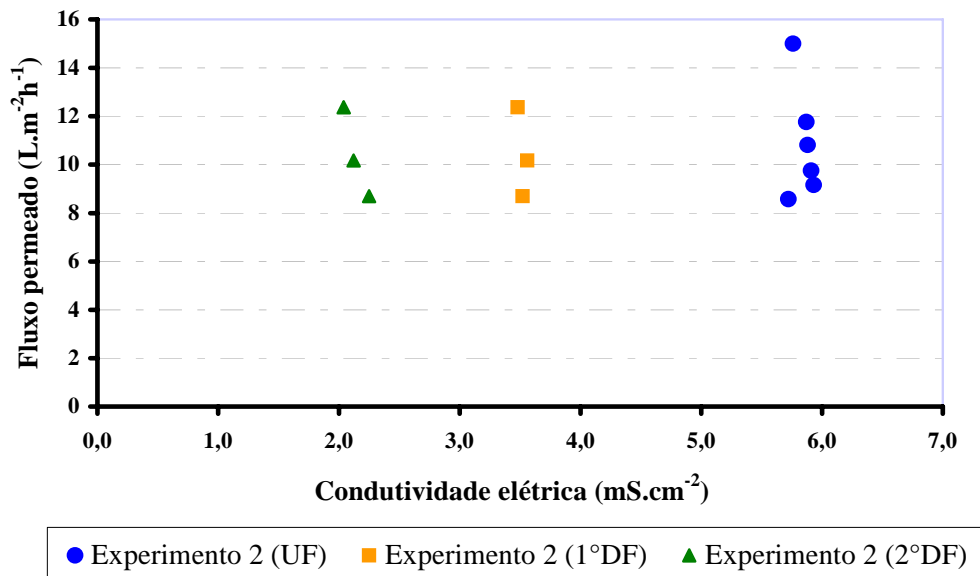


Figura 4.14: Variação de fluxo permeado do Experimento 2 com a condutividade elétrica.

4.4.5 Variação de fluxo permeado com pH

O pH do soro de queijo foi monitorado com a intenção de verificar possíveis alterações ocasionadas durante o processo de concentração e purificação do soro. Conforme os resultados obtidos (vide Tabelas 4.2 e 4.3) o pH permaneceu praticamente inalterado durante todos os experimentos realizados.

4.4.6 Variação de fluxo permeado com as concentrações dos componentes permeáveis no concentrado

Realizou-se uma análise da variação de fluxo permeado em função da diferença entre o teor de sólidos totais e o teor de proteína devido ao fato de que os resultados da análise de lactose não apresentaram uma precisão boa, como mencionado na seção do 4.4.3. Além disso, o teor de sais não foi determinado e o seu teor no soro em pó não foi fornecido pela empresa. Portanto, os teores de lactose, sais e água foram agrupados em uma única variável, denominada de componente permeável, e, uma vez que este representa o contaminante da proteína concentrada, a sua influência sobre o fluxo permeado foi analisada. O teor de componente permeável foi calculado fazendo a diferença entre concentração de sólidos totais e a concentração de proteína.

As Figuras 4.15 e 4.16 apresentam os gráficos da variação do fluxo permeado em função componente permeável ao longo do processo de concentração e purificação das proteínas. Observa-se que o fluxo permeado decresce com a diferença dos sólidos totais e da proteína; esse comportamento é similar aquele observado com a variação do teor de proteína.

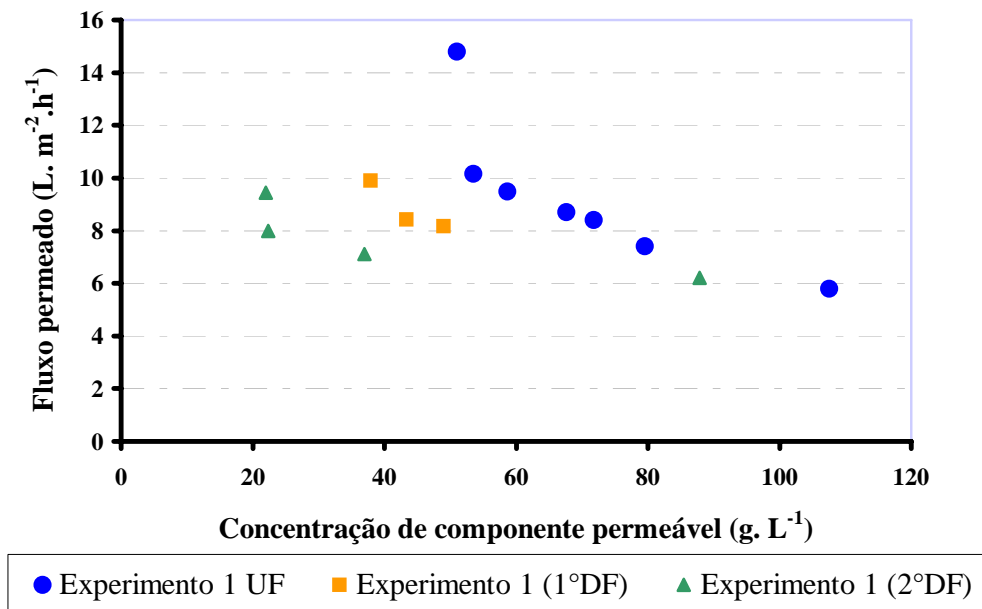


Figura 4.15: Fluxo permeado do Experimento 1 com os componentes permeáveis no concentrado.

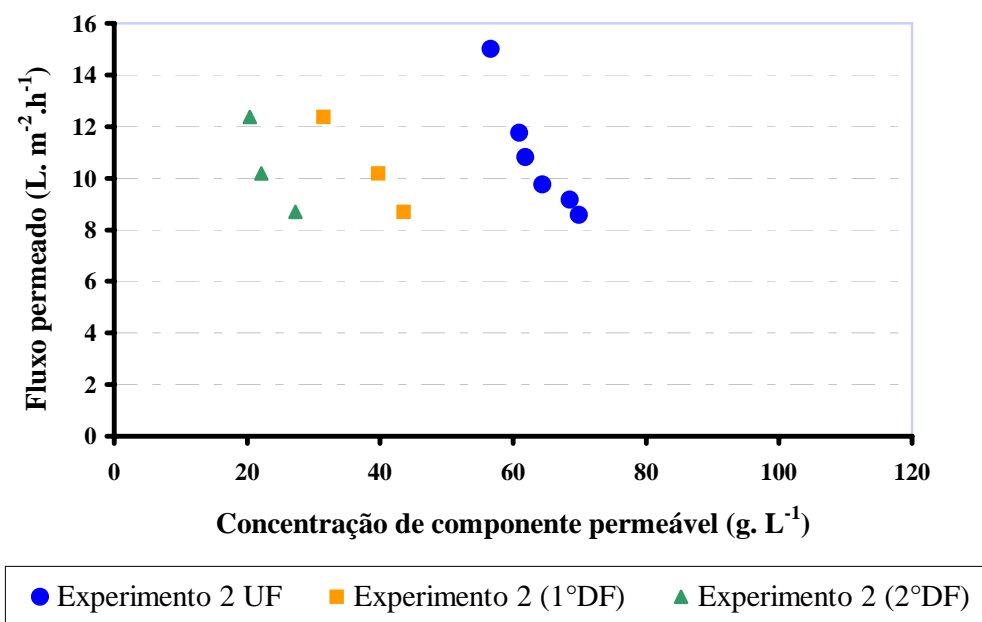


Figura 4.16: Fluxo permeado do Experimento 2 com os componentes permeáveis no concentrado.

Acredita-se que o fluxo permeado é influenciado mais fortemente pelas proteínas por se tratarem de macromoléculas; logo para fins de cálculos de otimização serão usadas as equações empíricas obtidas para o fluxo permeado da UF e DFs em função da concentração de proteína.

4.4.7 Equações empíricas do fluxo permeado da UF e DFs com teor de proteína

As Figuras 4.17 e 4.18 apresentam os gráficos da variação do fluxo permeado de soro com a concentração de proteínas para os processos de UF e DFs. A Figura 4.17 apresenta os resultados dos Experimentos 1 e 2 no processo de concentração de proteínas por UF. A equação exponencial foi escolhida a partir de ajustes de equações onde se observou o melhor coeficiente de regressão (R^2).

A Figura 4.18 mostra os resultados dos Experimentos 1 e 2 com a primeira e segunda DFs de ambos Experimentos. A equação foi ajustada sob as mesmas considerações feitas na UF sendo a exponencial que apresentou o melhor ajuste.

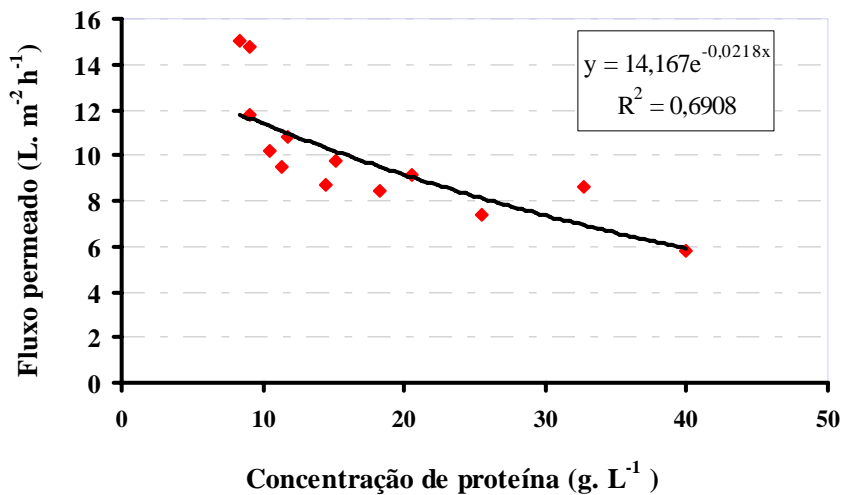


Figura 4.17: Fluxo permeado da UF do Experimento 1 e Experimento 2 em função da concentração de proteína.

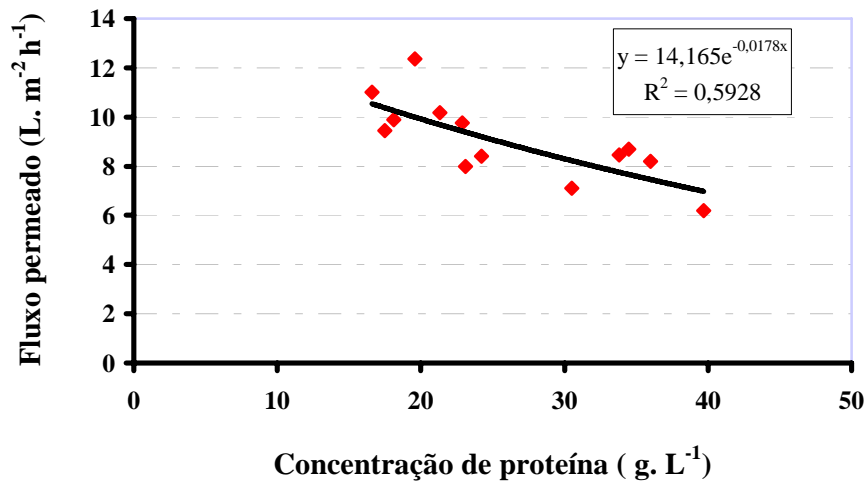


Figura 4.18: Fluxo permeado do Experimento 1 e Experimento 2 com a primeira e segunda DFs em função da concentração de proteína.

Capítulo 5

Modelagem

Neste capítulo serão apresentadas as equações de balanço material e empíricas obtidas pelas considerações realizadas sobre os dados experimentais, assim como serão discutidos os resultados da otimização que foi baseada no critério de lucro máximo do produto, considerando os custos envolvidos no processo e o preço do produto final. Criou-se um programa computacional utilizando o programa Matlab[®] versão 5.3 que se encontra no Apêndice B.

5.1 Otimização do processo de purificação

Os dados experimentais mostram a redução do fluxo permeado com o tempo de operação. Esta redução tem como causas principais a polarização por concentração, *fouling* e a mudança de propriedades físicas da solução de alimentação. À medida que o tempo de permeação aumenta, aumenta-se a concentração de proteína na solução no sistema, uma vez que a membrana escolhida é praticamente impermeável à proteína. Esta mudança de composição acarreta a variação de propriedades físicas como a massa específica e a viscosidade do fluido que interferem nas taxas de permeação. Na modelagem, considerou-se que o fluxo permeado é uma função que depende principalmente da concentração de proteína na solução de alimentação, ficando os efeitos de polarização e de *fouling* implicitamente representados pelos parâmetros das equações empíricas. Foram obtidas equações empíricas que descrevem o fluxo permeado em função da concentração de proteína na alimentação a partir dos dados experimentais. Embora, não tenha sido considerado o efeito da concentração de outros componentes da mistura sobre a taxa de permeação, observou-se que as curvas experimentais de UF e DF, Figuras 4.15 e 4.16 mostram diferenças, o que sugere a ocorrência de interferência das concentrações de outros componentes da mistura nas características de permeação. Como na DF a concentração de lactose e de sais é menor que na UF, acredita-se que o fluxo permeado na DF é maior em função da menor concentração destes componentes na mistura. Considerando este fato, foram ajustadas equações distintas para UF e DF, utilizando os dados experimentais.

Para UF foi obtida a Equação 5.1, conforme a seguir:

$$J_p = 14,167 \times e^{-0,0218C_p} \quad (5.1)$$

onde:

J_p = fluxo permeado da UF em L. m⁻² h⁻¹;
 C_p = concentração de proteína em kg. L⁻¹.

Para a DF a Equação 5.2 obtida é:

$$J_p = 14,165 \times e^{-0,0178C_p} \quad (5.2)$$

onde:

J_p = fluxo permeado da DF em L. m⁻² h⁻¹;
 C_p = concentração de proteína em kg. L⁻¹.

Devido à limitação do equipamento, o processo de permeação não pode ser continuado após o volume da solução no sistema alcançar o valor mínimo de 6 L (volume retido no sistema), portanto, o término do processo é ditado por este fator, sendo a concentração final do produto determinado por esta imposição.

A otimização do processo foi baseada no critério de lucro máximo, considerando os custos envolvidos no processo e o preço do produto final.

Além das considerações anteriormente citadas, foram feitas as seguintes considerações na modelagem do processo.

a) Para as equações de balanço material:

- a mistura formada por lactose, sais e outros componentes minoritários foi considerada como um pseudo-componente;
- a solução a ser processada é constituída por três componentes que são: a proteína, a água e o pseudo-componente formado por lactose, sais e outros;
- desprezou-se a variação de massa específica da solução no sistema com o tempo de permeação;

- o pseudo-componente e a água são componentes totalmente permeáveis à membrana (embora houvesse uma pequena retenção de lactose pela membrana);
- a membrana é impermeável à proteína;
- o volume de água utilizado em cada DF é igual e equivalente ao volume total de água utilizado na purificação dividido por número de DFs.

b) Para formulação da função objetivo:

- o custo de operação do equipamento é proporcional ao tempo de operação do equipamento e o coeficiente de proporcionalidade é o produto entre a potência do equipamento e o custo de energia elétrica;

O valor considerado da energia elétrica é de R\$ 0,3096 por kWh e a potência consumida para o acionamento do equipamento foi considerado 1491,4 W.

- para cálculo do custo de secagem do produto final foi considerado o valor de R\$ 0,20 para cada kg de água evaporada;
- a concentração de pseudo-componente foi convertida em DQO (demanda química de oxigênio) usando o fator de conversão de 1 kg m⁻³ de pseudo-componente igual a 1,12 kg m⁻³ de DQO. Para o gasto com o tratamento de efluente gerado no processo, utilizou-se a Equação 5.3 usada por Pollo, 2004:

$$G_2 = [V_{\text{efluente}} + 10 \times (DQO - 0,05)] \times C \quad (5.3)$$

onde:

V_{efluente} = volume do efluente em m³;

DQO = equivalente em DQO correspondente ao pseudo-componente no efluente (kg. m⁻³);

0,05 = valor limite de DQO acima do qual influi no valor do tratamento de efluente (kg. m⁻³);

C = custo médio de tratamento de efluente R\$ 0,45. m⁻³.

- o custo de água utilizada na DF de R\$ 2,00 por m³;

- o valor final do produto seco varia linearmente com a concentração mássica de proteína, considerando-se o valor de R\$ 3.000,00 para o quilograma de proteína pura e R\$ 1,80 para o quilograma de produto com 12% de proteína.

Salienta-se o fato de que os parâmetros utilizados para o cômputo da função objetivo são aproximações, que teriam que ser reavaliadas em estudos posteriores de otimização do processo, uma vez que a otimização do processo não era o objetivo principal deste trabalho.

Com as considerações feitas, chegou-se ao seguinte sistema de equações:

Balanco material global

$$\frac{dv}{dt} = -J_p \times A \quad (5.4)$$

onde:

$\frac{dv}{dt}$ = variação do volume da solução no tanque com tempo (L. h⁻¹);

J_p = fluxo permeado (L. m⁻² h⁻¹);

A = área da membrana (m²).

Balanco material para o pseudo-componente

$$\frac{dm_{sl}}{dt} = -J_p \times C_{sl} \times A \quad (5.5)$$

onde:

$\frac{dm_{sl}}{dt}$ = variação da massa de pseudo-componente com tempo (kg. h⁻¹);

J_p = fluxo permeado (L. m⁻² h⁻¹);

C_{sl} = concentração de pseudo-componente (kg. L⁻¹);

A = área da membrana (m²).

Balanco material para solução de pseudo-componente (água + pseudo-componente)

$$\frac{dm_a}{dt} = -J_p \times C_a \times A \quad (5.6)$$

onde:

$\frac{dm_a}{dt}$ = variação da massa da solução com o tempo (kg. h⁻¹);

J_p = fluxo permeado (L. m⁻² h⁻¹);

C_a = concentração de água + pseudo-componente (kg. L⁻¹);

A = área da membrana (m²).

O sistema de equações diferenciais ordinárias do modelo foi integrado utilizando-se o método de Runge Kutta, obtendo-se o volume final, as massas do pseudo-componente e da solução de pseudo-componente.

No cálculo de custo associado ao processo de UF e DF, foram usadas as equações a seguir e a Equação 5.3 já mencionada anteriormente:

A Equação 5.7 apresenta o custo associado ao consumo de energia elétrica, G_1 :

$$G_1 = t \times P_{consumida} \times \text{preço} \quad (5.7)$$

onde:

t = tempo de operação (h);

$P_{consumida}$ = potência consumida (kW. h¹);

preço = por unidade de energia elétrica (R\$ 0,3096. kW. h⁻¹).

A Equação 5.8 representa o custo da água adicionada na DF, G_3 :

$$G_3 = V_{H_2O} \times P \quad (5.8)$$

onde:

V_{H_2O} = Volume da água (L);

P = preço da água por unidade de volume (L).

A Equação 5.9 representa o custo associado ao processo de secagem do produto, G_4 :

$$G_4 = m_{H_2O} \times P_{vapor} \quad (5.9)$$

onde:

m_{H_2O} = massa de água evaporada (kg);

P_{vapor} = custo da água evaporada (R\$ 0,20. kg⁻¹).

A Equação 5.10 representa o custo total do processo, G :

$$G = G_1 + G_2 + G_3 + G_4 \quad (5.10)$$

onde:

G_1 = custo associado ao consumo de energia elétrica;

G_2 = custo associado ao tratamento de efluente gerado no processo;

G_3 = custo de água adicionado;

G_4 = custo associado ao processo de secagem do produto.

A Equação 5.11 apresenta o preço do produto final, P_f :

$$P_f = \frac{(3000 - 1,8) \times (\textit{percentagem} \cdot \textit{mássica} \cdot \textit{de} \cdot \textit{proteína} - 12)}{(100 - 12)} \quad (5.11)$$

A Equação 5.12 representa a função objetivo a ser maximizada, F :

$$F = P_f - G \quad (5.12)$$

onde:

P_f = preço final do produto;

G = custo total do processo.

Cabe salientar, ainda, que a função objetivo formulada não leva em consideração o tempo de carregamento de água nem os custos relativos à manutenção dos equipamentos. Os custos de instalação dos equipamentos e os custos de mão de obra não foram levados em consideração, uma vez que o aumento do número de DFs não acarreta em modificações nestes custos. Portanto o valor absoluto do lucro deve ser considerado com cautela, mas o fato importante é que a otimização pode indicar o melhor valor de volume total e do número de DFs, correspondente ao maior lucro.

A otimização foi realizada em relação às duas variáveis do processo que são: o volume total de água utilizado e o número de DFs. O programa computacional realiza uma otimização monovariável em relação ao volume de água utilizado para cada número de DFs. O número de DFs analisado foi de 1 a 20.

Na Figura 5.1, é apresentado o valor da função objetivo usando volume ótimo de água para cada número de DFs.

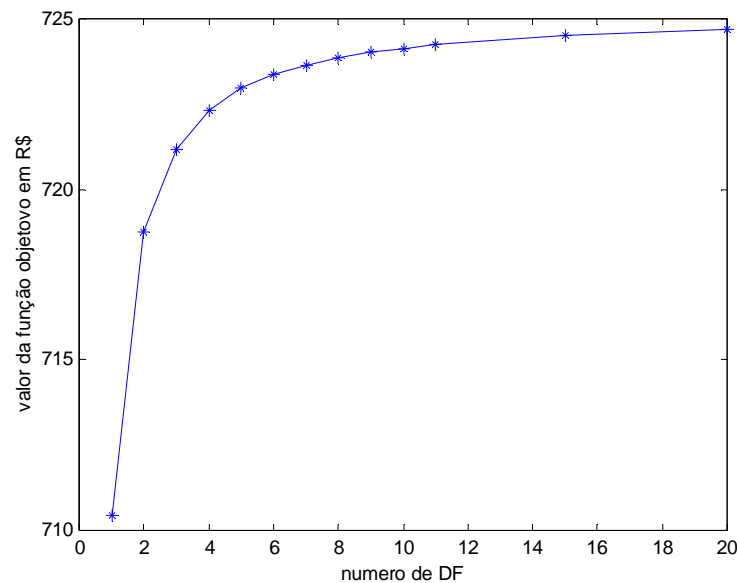


Figura 5.1: Curva de otimização para 30 L de soro.

Observa-se nesta figura, que o valor da função objetivo que representa a diferença entre o preço do produto e o custo, denominado doravante de lucro, é significativo e o lucro aumenta em função do número de DFs de forma assintótica. Teoricamente o número infinito de DFs maximiza o lucro. Contudo esta visão é parcial, uma vez que este é o lucro obtido no processamento de uma quantidade fixa de soro bruto. Para analisar o tempo de processamento é importante observar na próxima figura.

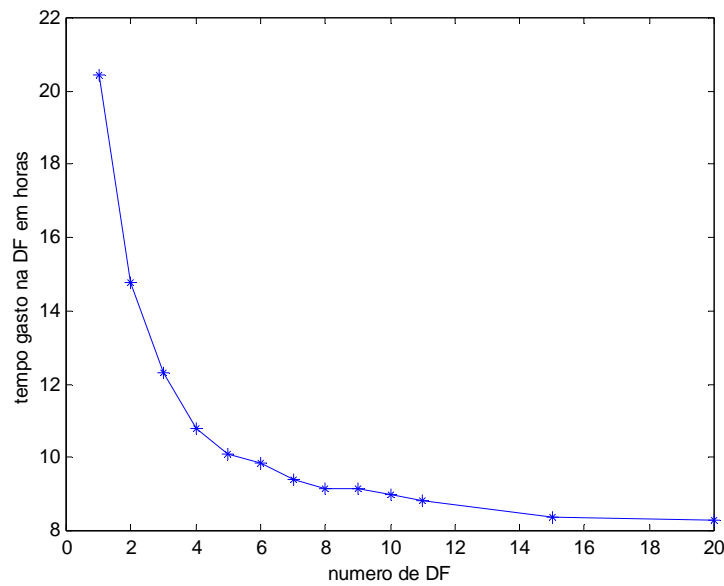


Figura 5.2: Tempo total do processo de purificação com DF em função do número de DFs.

Na Figura 5.2 pode-se observar que o tempo de processamento se reduz a menos da metade quando se usa cerca de 5 DFs quando comparado a uma única DF e que o aumento do número de DFs além deste número já não traz uma redução significativa de tempo. Se forem usadas 5 DFs, pode-se processar mais do que o dobro da quantidade de soro que seria processada com um única DF, aumentando ainda mais o lucro. Esta redução mais sensível no tempo de processamento se deve à redução do volume total de água necessário para alcançar o ponto ótimo, como pode ser observado na Figura 5.3. Observa-se nesta figura que de 1 DF a 4 ou 5 DFs ocorre sensível redução do volume total ótimo de água. Embora se utilize uma quantidade menor de água com maior número de DFs, o produto final é mais puro, conforme pode ser observado na próxima figura.

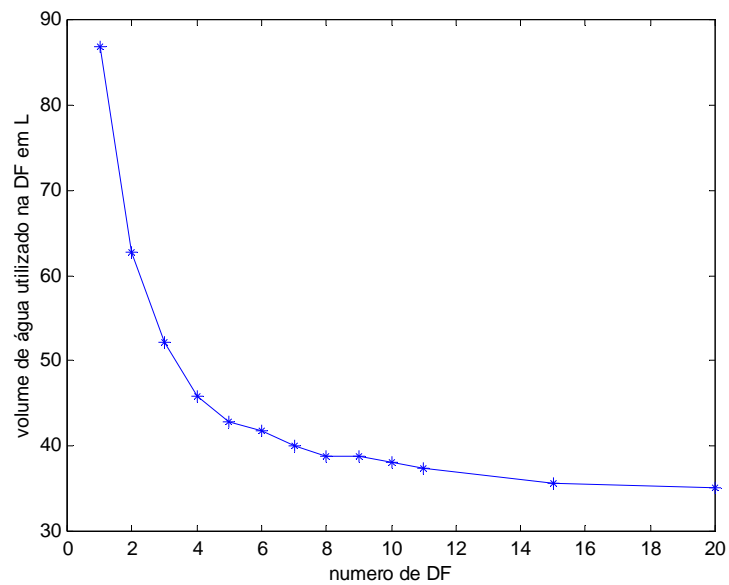


Figura 5.3: Volume ótimo de água em função do número de DFs.

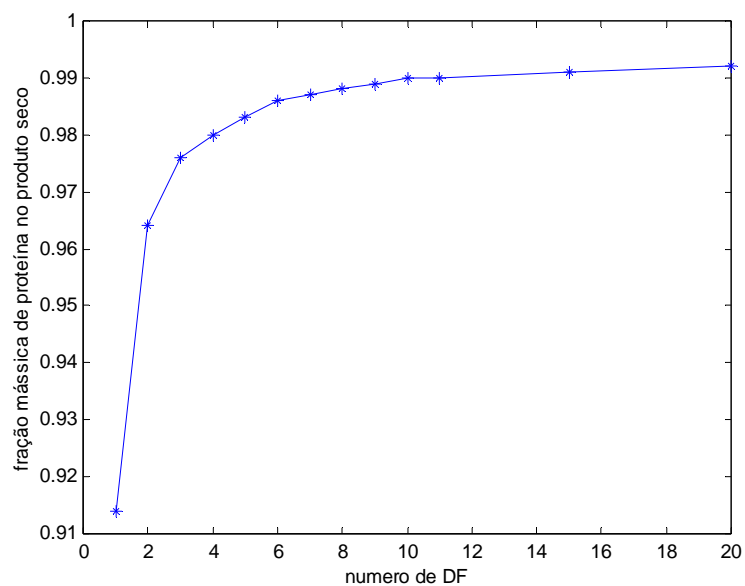


Figura 5.4: Fração mássica de proteína no produto obtido com volume ótimo de água.

Na Figura 5.4 mostra que o valor máximo de fração mássica tende para 0,99 e não para 1. Isto é provavelmente devido à equação que determina o valor do produto final, que varia linearmente com o teor de proteína. Acima de 5 DFs, a redução no volume de água já não é tão significativa. À medida que o número de DFs aumenta, reduz-se o volume total de água e isto faz com que o processo de purificação se realize com a concentração cada vez mais elevada de proteína no sistema, como pode ser observado nas seguintes figuras.

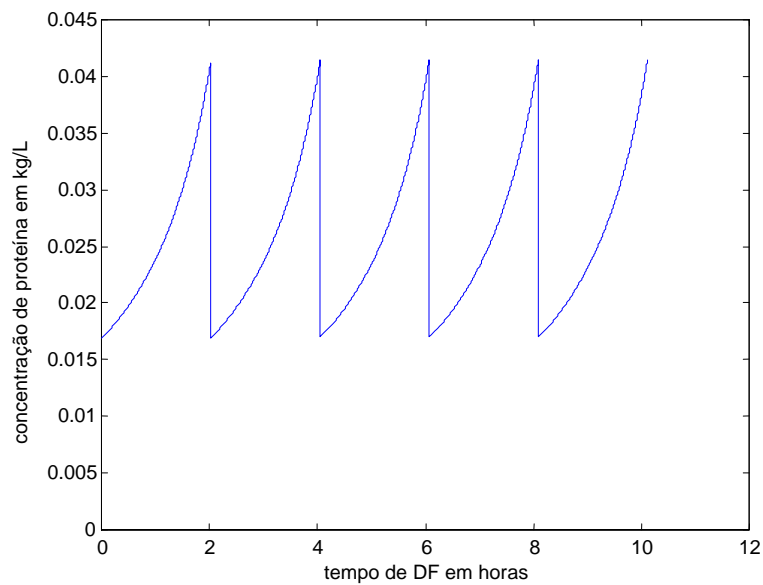


Figura 5.5: Concentração de proteína no sistema em função do tempo para 4 DFs.

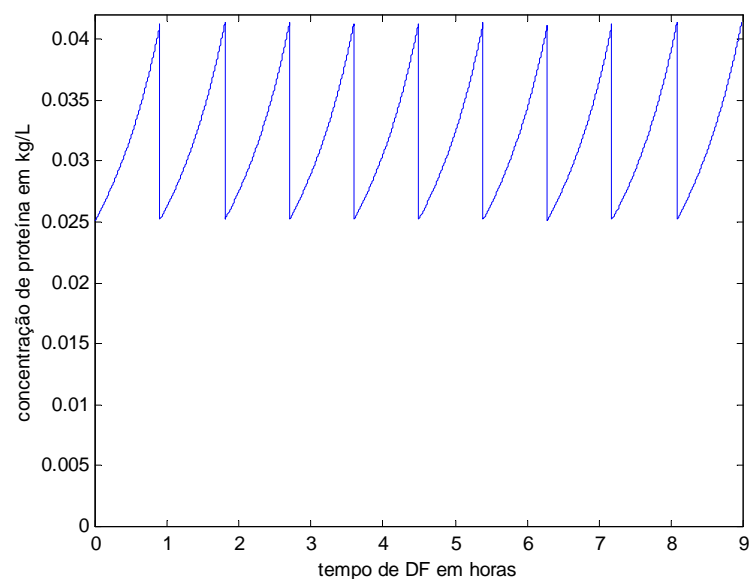


Figura 5.6: Concentração de proteína no sistema em função do tempo com 10 DFs.

Na Figura 5.5, a concentração mínima alcançada, logo após a adição de água está em torno de $0,014 \text{ kg. L}^{-1}$ ao passo que a mesma concentração na Figura 5.6 está em torno de $0,025 \text{ kg. L}^{-1}$. Além disso, a frequência com que a concentração máxima é alcançada é maior, quanto maior o número de DFs, o que permite mostrar que quanto maior o número de DFs, maior é a concentração média de proteína no sistema, logo, no limite, quando o número de DFs tender para infinito, a concentração seria constante e igual à concentração máxima. Salienta-se que o modelo não inclui a penalização necessária devida a este fato, pois, sabe-se

que a membrana pode sofrer problemas sérios de *fouling* quando se trabalha constantemente com elevada concentração de proteína, exigindo uma frequência maior de limpeza que diminui a vida útil da membrana, segundo Muller *et al.* (1999), Foley e Garcia (2000) e Cross (2002).

Em função do exposto, acredita-se que o número ótimo de DFs deva estar em torno de 4 ou 5.

Capítulo 6

Conclusões e Sugestões

As conclusões deste trabalho e sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros são apresentadas neste capítulo.

6.1 Conclusões

As seguintes conclusões podem ser tiradas de acordo com os resultados deste trabalho:

- a membrana de UF com MMC de 10 kDa apresentou uma retenção total para proteína do soro de queijo;
- houve um aumento significativo da concentração de proteínas inicial de (9 g. L⁻¹) para a concentração final de (40 g. L⁻¹);
- o teor de impurezas (sais e lactose) em base seca passou de 87 % para 37 %, após o uso das DFs;
- o fator de concentração máximo foi de 5, contudo o fluxo permeado não apresentou uma queda brusca o que permite supor que um FC superior possa ser alcançado;
- este processo é adequado para obtenção de concentrado protéico purificado de acordo com a exigência da aplicação;
- um programa computacional capaz de descrever o número de DFs e o volume de água no processo de purificação usando DFs foi obtido, o programa permite avaliar o número de DFs e a quantidade de água necessária para efetuar DFs com maximização do lucro.

6.2 Sugestões

Para a continuidade deste trabalho algumas questões foram levantadas durante o seu desenvolvimento e sugerem-se o desenvolvimento dos seguintes estudos:

- Estudo do aproveitamento do permeado resultante do processo de UF;
- Estudo do fracionamento das proteínas do soro por ED;
- Estudo da viabilidade econômica de uma planta processadora de concentrado do soro de queijo por UF;
- Estudo comparativo da concentração das proteínas do soro de queijo em membranas cerâmicas e poliméricas;
- Determinação da formação de *fouling* e polarização por concentração durante a concentração das proteínas do soro;
- Estudo da influência da viscosidade no fluxo permeado;
- Realização das análises microbiológicas nas amostras de concentrado e permeado da UF e das DFs.

Referências Bibliográficas

AKOUM, O., JAFFRIN, M. Y., DING, L. H., *Concentration of total milk proteins by high shear ultrafiltration in a vibrating membrane module*, **Journal of Membrane Science**, 2004.

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

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, p.411-419, 2004.

ANDRADE, R. L. P, MARTINS, J. F. P., *Influência da adição da fécula de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo*, **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 22, p.249-253, 2002.

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

ARAÚJO, J. J. A., **Química de alimentos: teoria prática**, Viçosa: UFV, 1995.

ARGÜELLO, M. A., ÁVAREZ, S., RIERA, F. A., ALVAREZ, R., *Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation*, **Journal of Membrane Science**, v. 216, p.121-134, 2003.

ARGÜELLO, M. A., ÁVAREZ, S., RIERA, F. A., ALVAREZ, R., *Utilization of enzymatic detergents to clean inorganic membranes fouled by whey proteins*, **Separation Purification Technology**, v.41, p.147-154, 2005.

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

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

BANSAL, B., AL-ALI, R., MERCADÉ-PRIETO, R., CHEN, X. D., *Rinsing and cleaning of α -lactalbumin fouled MF membranes*, **Separation Purification Technology**, v.48, p.202-207, 2006.

BARUAH, G. L., NAYAK, A., BELFORT, G., *Scale-up from laboratory microfiltration to a ceramic pilot plant: Design and performance*, **Journal of Membrane Science**, v.274, p.56-63, 2006.

BIRD, M. R., BARTLETT, M., *Measuring and modeling flux recovery during the chemical cleaning of MF membranes for the processing of whey protein concentrate*, **Journal of Food Engineering**, v. 53, p.143-152, 2002.

BRANS, G., SCHROËN, C. G. P. H., VAN DER SMAN, R. G. M., BOOM, R. M., *Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges*, **Journal of Food Engineering**, v. 243, p.263-272, 2004.

CARVALHO, H. H., JONG, E. V., BELLÓ, R. M., SOUZA, R. B., TERRA, M. F., **Alimentos: Métodos Físicos e Químicos de Análise**, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2002.

CARVALHO, I. C., HUHN, S., *Distribuição de nitrogênio no leite e índice de caseína*, **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios**, p.49-58, 1999.

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

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

CHEN, D., WEAVERS, L. K., WALKER, H. W., LENHART, J. J., *Ultrasonic control of ceramic membrane fouling caused by natural organic matter and silica particles*, **Journal of Membrane Science**, v.276, p.135-144, 2006.

CHERYAN, M., **Ultrafiltration Handbook**, Technomic Publishing Company, 1986.

CROSS, R. A., *Optimum process designs for ultrafiltration and crossflow microfiltration systems*, **Desalination**, v. 145, p.159-163, 2002.

CUNHA, C. R., VIOTTO, W. H., VIOTTO, L. A., *Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat "Minas Frescal" cheese manufacture: Effect on composition proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance*, **International Dairy Journal**, v. 16, p.215-224, 2006.

DE LA FUENTE, M. A., HEMAR, Y., TAMEHANA, M., MUNRO, P. A., SINGH, H., *Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates*, **International Dairy Journal**, v. 12, p.361-369, 2002.

ELEGÊ ALIMENTOS, *Especificação técnica do produto*. Porto Alegre, 2005.

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

ERDEM, Y. K., *Effect of ultrafiltration, fat reduction and salting on textural properties of white brined cheese*, **Journal of Food Engineering**, v. 71, p.366-372, 2005.

FOLEY, G.; GARCIA, J., *Ultrafiltration flux theory based on viscosity and osmotic effects: application to diafiltration optimization*, **Journal of Membrane Science**, v. 176, p.55-61, 2000.

GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., COIMBRA, J. S. R., GOMES, J. C., MINIM, L. A., ROJAS, E. E. G., GADE, A. D., *Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo*, **Dairy Journal Bimonthly The “Cândido Tostes” Dairy Institute**, v. 59, p.53-66, 2004.

GOVINDASAMY-LUCEY, S., JAEGGI, J. J., JOHNSON, M. E., WANG, T., LUCEY, J. A., *Use of cold ultrafiltered retentates for standardization of milks for pizza cheese: Impact on yield and functionality*, **International Dairy Journal**, v. 15, p.941-955, 2005.

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

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

HINRICHS, J., *Incorporation of whey proteins in cheese*, **International Dairy Journal**, v. 11, p.495-503, 2001.

HINRICHS, J., *Mediterranean milk and milk products*, **European Journal of Nutrition**, v. 43, p.12-17, 2004.

HUFFMAN, L. M., HARPER, J. W., *Maximizing the value of milk through separation technologies*, **International Dairy Journal**, v. 82, p.2238-2244, 1999.

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

LANARA, Laboratório Nacional de Referência Animal, Métodos físicos e químicos, Ministério da Agricultura – Secretaria de Defesa Agropecuária, Portaria 001/1981.

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

LIPNIZKI, F., BOELSMAND, J., MADSEN, R. F., *Concepts of industrial-scale diafiltration systems*, **Desalination**, v. 144, p.179-184, 2002.

MADAENI, S. S., MANSOURPANAH, Y., *Chemical cleaning of reverse osmosis membranes fouled by whey*, **Desalination**, v. 161, p.13-24, 2004.

MARIOTTI, M. P., PINTO, R., TREVISAN, H. C., MONTI, R., *Tratamento de soro de leite para uso em reatores com β -galactosidase imobilizada*, **Revista do Instituto de Laticínio "Candido Tostes"**, v. 54, p.175-279, 1999.

MARTINEZ-FEREZ, A., RUDLOFF, S., GUADIX, A., HENKEL, C. A., POHLENTZ, G., BOZA, J. J., GUADIX, E. M., KUNZ, Clemens., *Goats'milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology*, **International Dairy Journal**, v. 16, p.173-181, 2006.

MISTRY, V. V., *Manufacture and application of high milk protein powder*, **Lait**, v. 82, p.515-522, 2002.

MORISON, K. R., SHE, X., *Optimisation and graphical representation of multi-stage membrane plants*, **Journal of Membrane Science**, v. 211, p.59-70, 2003.

MOSQUIM, M. C. A. V., FURTADO, M. M., MONTEIRO, R. R., MAGALHÃES, G., *Development of "soft-drinks"*, **Revista do Instituto de Laticínio "Candido Tostes"**, v. 54, p.164-175, 1999.

MULDER, M., **Basic Principles of Membrane Technology**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1986.

MULLER, A., CHAUFER, B., MERING, U., DAUFIN, G., *Prepurification of α -lactalbumin with ultrafiltration ceramic membranes from acid casein whey: study of operating conditions*, **Journal of Membrane Science**, v. 83, p.111-129, 2003.

MULLER, A., GEORGES D., CHAUFER, B., *Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey*, **Journal of Membrane Science**, v. 153, p.9-21, 1999.

MUTHUKUMARAN, S., KENTISH, S. E., ASHOKKUMAR, M., *Mechanisms for the ultrasonic enhancement of dairy whey ultrafiltration*, **Journal of Membrane Science**, v. 258, p.106-114, 2005.

MUTHUKUMARAN, S., YANG, K., SEUREN, A., KENTISH, S., ASHOKKUMAR, M., STEVENS, G. W., GRIESER, F., *The use of ultrasonic for ultrafiltration membranes in the dairy industry*, **Separation Purification Technology**, v. 39, p.99-107, 2004.

NGUYEN, M., REYNOLDS, N., VIGNESWARAN, S., *By-product recovery from cottage cheese production by nanofiltration*, **Journal of Cleaner Production**, v. 11, p.803-807, 2003.

ONWULATA, C. I., SMITH, P. W., KONSTANCE, R. P., HOLSINGER, V. H., *Incorporation of whey products in extruded corn, potato or rice snacks*, **Food Research International**, v. 34, p.679-687, 2001.

PISECKY, J., *Spray drying in the cheese industry*, **International Dairy Journal**, v. 15, p.531-536, 2005.

POLLO, D. L., *Reaproveitamento de águas e efluentes inorgânicos de uma indústria petroquímica*. Porto Alegre: UFRGS 2004. Dissertação (Mestrado em engenharia química), Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

PRUDÊNCIO, E. S., MAGENIS, R. B., OLIVEIRA, M. C. L., FALCÃO, L. D., MAHAUT, M., HAMAD, A. J. S., *Comportamento do leite de búfala (*bubalus bubalis*) desnatado submetido a microfiltração*, **Dairy Journal Bimonthly The "Cândido Tostes" Dairy Institute**, v. 60, p.21-24, 2005.

PRUDÊNCIO, S. E., MAGENIS, R. B., MAHAUT, M., JEANTER, R., Luiz, M. T. B., HAMAD, A. J. S., *Caracterização físico-químico do permeado obtido da ultrafiltração do leite de búfala*

(*bubalus bubalis*), **Dairy Journal Bimonthly The “Cândido Tostes” Dairy Institute**, v. 59, p.27-30, 2004.

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

RAUTENBACH, R., ALBRECHT, R., **Membrane Process**, John Wiley & Sons, 1989.

RECH, R., *Estudo da produção da β -galactosidase por leveduras à partir do soro de queijo*. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2003. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Centro de biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

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

RIBEIRO, E. P., MASSAGUER-ROIG, S., *Aplicação da ultrafiltração de leite no processo de fabricação de queijo tipo prato: efeito do fator de concentração*, **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios**, p.145-152, 1996.

RODRIGUES, L. R. M., *Valorização da fração protéica do soro de queijo*. São Paulo: UMSP, 2001. Dissertação (Mestrado em biologia), Faculdade em Engenharia biológica, Universidade do Minho de São Paulo, 2001.

ROSSANO, R., D’ELIA, A., RICCIO, P., *One-step separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hydroxyapatite – A flexible procedure suitable for small and medium-scale preparations*, **Protein Expression and Purification**, v. 21, p.165-169, 2001.

SILVA, A. T., VAN DENDER, A. G. F., *Importance of reduced fat dairy products and strategies for developing and optimizing sensory quality*, **Dairy Journal Bimonthly The “Cândido Tostes” Dairy Institute**, v.60, p.3-12, 2005.

SISO, M. I. G., *The biotechnological utilization of cheese whey: a review*, **Bioresourve Technology**, v. 57, p.1-11, 1996.

U. S. DAIRY EXPORT COUNCIL - USDEC. **Ingredients News**, São Paulo, v. 4, n. 3, fev., 2002.

VAN DENDER, A. G. F., MASSAGUER-ROIG, S., *Efeito da diafiltração e do fator de diluição do retentado no fluxo de permeação e na porcentagem de recuperação de lactose no retentado durante a ultrafiltração de leite integral*, **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios**, p.143-144, 1996.

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

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

Apêndice A - Dados Experimentais

Tabela A.1: Experimento 1, dados da determinação de proteínas.

	Concentração de proteínas (%)	Concentração de proteínas (%)
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	0,88	-
1'	0,93	-
2	1,04	-
2'	1,05	-
3	1,14	-
3'	1,14	-
4	1,46	-
4'	1,42	-
5	1,80	-
5'	1,86	-
6	2,53	-
6'	2,57	-
7	3,94	-
7'	4,06	-
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	1,80	-
1'	1,82	-
2	2,43	-
2'	2,41	-
3	3,62	-
3'	3,58	-
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	1,73	-
1'	1,77	-
2	2,30	-
2'	2,33	-
3	2,98	-
3'	3,12	-
4	3,96	-
4'	3,98	-

Tabela A.2: Experimento 1, dados da determinação dos sólidos totais.

	Sólidos Totais (%)	Sólidos Totais (%)
Amostra UF	Concentrado	Permeado
1	6,02	5,1
1'	6,02	5,0
2	6,42	5,2
2'	6,43	5,2
3	7,01	5,3
3'	7,02	5,4
4	8,40	5,7
4'	8,01	5,6
5	8,81	5,5
5'	9,32	5,4
6	11,0	6,4
6'	10,0	6,4
7	14,7	6,7
7'	14,8	6,8
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	5,4	2,5
1'	5,8	2,6
2	6,8	2,8
2'	6,7	2,8
3	8,7	3,0
3'	8,3	3,0
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	3,8	1,2
1'	4,1	1,2
2	4,5	1,2
2'	4,6	1,2
3	6,5	1,3
3'	7,0	1,3
4	12,5	1,5
4'	13,0	1,7

Tabela A.3: Experimento 1, dados da determinação da lactose.

	Concentração de lactose (g. L ⁻¹)	Concentração de lactose (g. L ⁻¹)
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	47	40
1'	46	39
2	45	44
2'	49	43
3	47	27
3'	50	28
4	48	32
4'	49	31
5	55	37
5'	51	35
6	52	45
6'	51	45
7	54	31
7'	50	29
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	25	19
1'	23	17
2	25	22
2'	26	22
3	25	20
3'	26	20
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	11	10
1'	12	10
2	23	9
2'	23	9
3	12	9
3'	12	9
4	14	10
4'	12	10

Tabela A.4: Experimento 1, dados da determinação da condutividade elétrica.

	Condutividade elétrica (m.S cm⁻²)	Condutividade elétrica (m.S cm⁻²)
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	6,18	6,12
2	6,22	6,25
3	6,28	6,26
4	6,33	6,29
5	6,31	6,37
6	6,34	6,47
7	6,13	6,64
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	3,45	3,29
2	3,54	3,37
3	3,62	3,48
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	1,89	1,64
2	1,96	1,71
3	2,12	1,79
4	2,17	1,82

Tabela A.5: Experimento 1, dados da determinação do pH.

	pH	pH
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	6,36	6,40
2	6,37	6,39
3	6,38	6,39
4	6,39	6,38
5	6,39	6,38
6	6,38	6,39
7	6,38	6,38
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	6,45	6,45
2	6,46	6,45
3	6,46	6,46
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	6,52	6,51
2	6,52	6,53
3	6,51	6,52
4	6,41	6,51

Tabela A.6: Experimento 2, dados da determinação de proteínas.

	Concentração de proteínas (%)	Concentração de proteínas (%)
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	0,84	-
1'	0,83	-
2	0,90	-
2'	0,92	-
3	1,16	-
3'	1,17	-
4	1,51	-
4'	1,51	-
5	2,05	-
5'	2,06	-
6	3,27	-
6'	3,27	-
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	1,95	-
1'	1,96	-
2	2,12	-
2'	2,14	-
3	3,45	-
3'	3,44	-
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	1,66	-
1'	1,66	-
2	2,28	-
2'	2,30	-
3	3,38	-
3'	3,37	-

Tabela A.7: Experimento 2, dados da determinação dos sólidos totais.

	Sólidos Totais (%)	Sólidos Totais (%)
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	6,5	5,0
1'	6,5	5,0
2	7,0	4,9
2'	7,0	5,0
3	7,2	5,0
3'	7,5	5,1
4	7,9	5,2
4'	8,0	5,2
5	8,7	5,4
5'	9,1	5,4
6	10,0	5,6
6'	10,5	5,6
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	5,1	2,7
1'	5,1	2,7
2	6,1	2,8
2'	6,1	2,8
3	7,8	2,9
3'	7,8	2,9
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	3,7	1,3
1'	4,1	1,3
2	4,5	1,5
2'	4,5	1,4
3	6,1	1,4
3'	6,1	1,4

% em base úmida

Tabela A.8: Experimento 2, dados da determinação da lactose.

	Concentração de lactose (g. L⁻¹)	Concentração de lactose (g. L⁻¹)
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	45	52
1'	47	54
2	49	55
2'	47	56
3	43	55
3'	42	53
4	54	51
4'	55	52
5	55	57
5'	58	57
6	60	50
6'	56	49
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	33	24
1'	33	25
2	28	25
2'	30	26
3	49	26
3'	49	26
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	26	13
1'	27	13
2	14	10
2'	14	12
3	16	19
3'	14	20

Tabela A.9: Experimento 2, dados da determinação da condutividade elétrica.

	Condutividade elétrica (m.S cm⁻²)	Condutividade elétrica (m.S cm⁻²)
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	5,76	5,68
2	5,87	5,95
3	5,88	5,95
4	5,91	6,01
5	5,93	6,04
6	5,72	6,11
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	3,48	3,32
2	3,56	3,44
3	3,52	3,53
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	2,04	1,83
2	2,12	1,92
3	2,25	2,01

Tabela A.10: Experimento 2, dados da determinação do pH.

	pH	pH
Amostra da UF	Concentrado	Permeado
1	6,53	6,51
2	6,54	6,52
3	6,53	6,51
4	6,54	6,52
5	6,55	6,51
6	6,56	6,51
Amostra da 1° DF	Concentrado	Permeado
1	6,60	6,61
2	6,60	6,61
3	6,60	6,61
Amostra da 2° DF	Concentrado	Permeado
1	6,72	6,71
2	6,73	6,72
3	6,74	6,71

Curva de calibração do HPLC

As Figuras A1 e A2 apresentam as diferentes concentrações de lactose em função da área e do tempo de retenção respectivamente em milivolt (mV). No método de HPLC a área sob a curva representa a quantidade de lactose presente na amostra. Obteve-se um desvio padrão de 0,999 na curva de calibração o que mostra a precisão do método, sendo construída com lactose de pureza 95%. O tempo de retenção é o mínimo necessário para que ocorra o surgimento do pico. O maior pico representa a solução de acetonitrila de 75% sendo esta a fase móvel e as posteriores curvas representam a lactose em diferentes concentrações onde o tempo de retenção nessas curvas padrão é de aproximadamente 6 min na vazão de alimentação $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e na temperatura de 45°C . A curva $C_{6,0}$ corresponde à curva de maior concentração, ou seja, $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de lactose seguindo para as curvas de menor concentração, como a de $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de lactose. A análise de concentração de lactose tanto nas amostras de concentrado e de permeado da UF como nas DFs mostraram que seus resultados ficaram nesse intervalo de tempo entre 5,5 a 6,4 min.

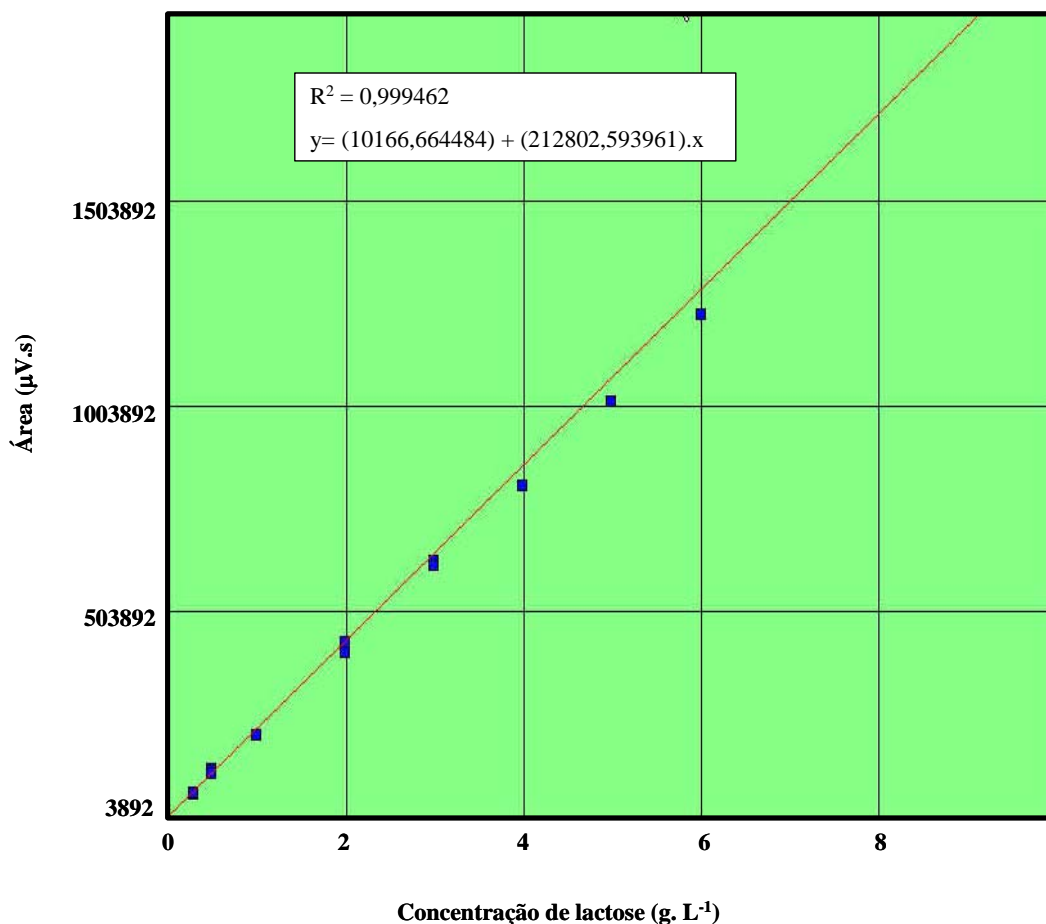


Figura A.1: Curva de calibração do HPLC com as concentrações de lactose.

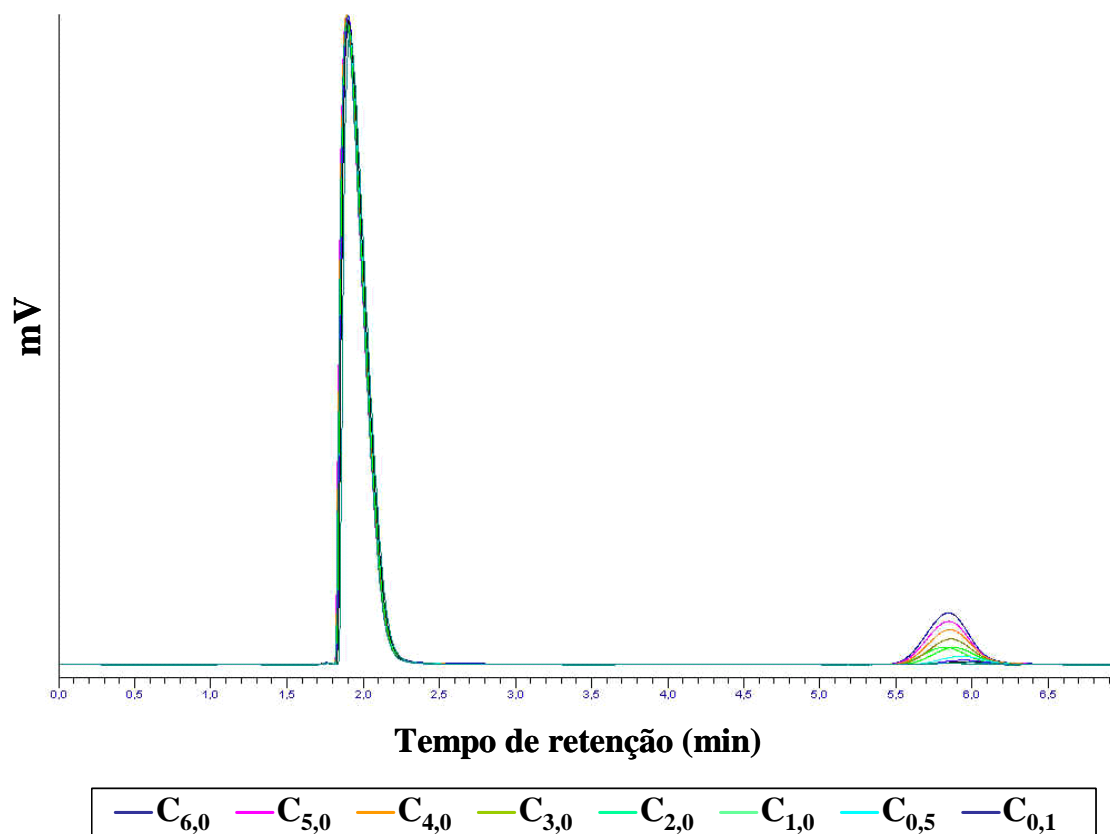


Figura A.2: Curva padrão do método HPLC com as respectivas concentrações.

Apêndice B - Resultados da Otimização para o processo de purificação das proteínas do soro de queijo

```
function dery=dyUF(t,y)
global par
global yUF
% parâmetros da equação de fluxo permeado
%y(1) = volume da solução em (L)
%y(2) = massa da solução sem proteína em (kg)
%y(3) = massa de lactose+sais+outros em (kg)

% vetor de constantes

%par(1) = areaS
%par(2) = mprot

% parâmetros da equação de fluxo permeado
a=14.167;
b=-.0218;
cprot = par(2)/y(1);
csol = y(2)/y(3);
%Jp = 14.165 * exp(-.0178*Cp); para diafiltração
%Jp = 14.167 * exp(-.0218*Cp); para ultrafiltração
J = a*exp(b*cprot);

dery(1) = -J*par(1);
dery(2) = -J*par(1)*csol;
dery(3) = -J*par(1)*y(3)/y(1);
dery=dery';

function dery=dyDF(t,y)
global par
global yUF
% parâmetros da equação de fluxo permeado
%y(1) = volume da solução em (L)
%y(2) = massa da solução sem proteína em (kg)
%y(3) = massa de lactose+sais+outros em (kg)

% vetor de constantes

%par(1) = areaS
%par(2) = mprot

% parâmetros da equação de fluxo permeado
a=14.165;
b=-.0178;
cprot = par(2)/y(1);
csol = y(2)/y(3);
J = a*exp(b*cprot);

dery(1) = -J*par(1);
```

```
dery(2) = -J*par(1)*csol;
dery(3) = -J*par(1)*y(3)/y(1);
dery=dery';
```

```
function vobj=diafiltra(x)
global par
global yUF

% condição inicial
%yUF(1) = volume da solução concentrada resultante da UF em (L)
%yUF(2) = massa da solução sem proteína no concentrado resultante da UF em
(kg)
%yUF(3) = massa de lactose+sais+outros no concentrado resultante da UF em
(kg)

% vetor de constantes
%par(1) = areaS;
%par(2) = mprot;
%par(3) = vfinal;
%par(4) = ndia;
%par(5) = mlacsal0;
%par(6) = vol0;

%parâmetros para função objetivo
convDQO = 1.121;% fator de conversão (1 kg/L de lactose) --
>(1.121kg_O2/L)limDQO = 5e-5;%DQO limite acima do qual encarece o
tratamento em (g/m3)
prekW = 0.3096; % preço em R$ por 1kW*h
potencia =1.49;% potência da bomba em kW
pretrat = 45e-2; % preço do tratamento de efluente (R$0,45 por
m3)equivalendo ao valor em R$ por m3
limDQO = 0.05;%valor de DQO acima do qual o tratamento de efluente se torna
mais caro (kg/m3)

v1=x/par(4);
vfinal =par(3);
ndia = par(4);
% Preparação para início do loop
dtempo = 0.01; % incremento de tempo em horas
tempo0 = 0; % tempo inicial
ymin = 10000; % valor usado na partida do loop
matsoma = [];% matriz do resultado da integração
tsoma = [];% vetor tempo
    y0(1) = yUF(1)+v1;
    y0(2) = yUF(2)+v1;
    y0(3) = yUF(3);

for j=1:ndia
    while ymin > vfinal
        tempol = tempo0+dtempo;
        tspan = [tempo0, tempol];
        [tempo,y]=ode15s('dyDF',tspan,y0);
        matsoma=[matsoma;y];
        tsoma = [tsoma;tempo];
        ymin = y(end,1);
        tempo0 = tempol;
        y0 = y(end,:);
    end
end
yfin = y0;
```

```

y0(1) = yfin(1)+v1;
y0(2) = yfin(2)+v1;
y0(3) = yfin(3);
ymin = y0(1);
end
volfim = matsoma(end,1);% volume final do concentrado (deve ser 6L)
lacsalfim = matsoma(end,3); % massa de lactose mais sais no concentrado
final
tempofin=tsoma(end);% tempo total de operação de DF
msolfim= matsoma(end,3);% massa de solução sem proteina final no
concentrado

Veflu = (par(6)+x-volfim)/1000; % volume total do efluente gerado na DF em
(m3)
lacsaleflu = par(5)-lacsalfim; % massa de lactose mais sais no efluente em
(kg)
clseflu = lacsaleflu/Veflu; % concentração de lactose e sais no efluente em
(kg/m3)

%verificar
%yUF(1) = volume da solução concentrada resultante da UF em (L)
%yUF(2) = massa da solução sem proteína no concentrado resultante da UF em
(kg)
%yUF(3) = massa de lactose+sais+outros no concentrado resultante da UF em
(kg)

DQO1 = clseflu*convDQO;% DQO provocado por lactose e sais no efluente
EXDQO = 10*Veflu*(DQO1-limDQO); % parte do DQO que encarece o tratamento de
efluente em (g/m3)
G1 = tempofin*potencia*prekW;% Gasto com bomba em R$
G2a = Veflu*pretrat;
G2b = EXDQO*pretrat;
G2 = G2a+G2b; % gasto com tratamento de efluente em R$
G3 = x/1000*2;% custo da água considerando R$2,00 por m3
G4 = 0.2*(matsoma(end,2)-matsoma(end,3))%custo com a secagem do produto
final
xprot = par(2)/(par(2)+msolfim);% fração mássica de proteína no concentrado
final
P = (par(2)+matsoma(end,3))*(34*xprot*100-408); %preço em R$ da proteína em
função da
% fração mássica de
proteína na solução
vobj = G1+G2+G3+G4-P ;% valor da função objetivo
xx=x
fobj=vobj

result = []
for ndia = 1:20

clear functions;clear all

% Este programa efetua oimização do processo de concentração da proteína do
soro de
% queijo mussarela e a purificação do concentrado utilizando processos com
membranas
% de ultrafiltração
global par

```



```

global yUF

%ndia=input('Entre com o número de diafiltrações:');
%x2 = input('Entre com o volume máximo de água usada na DF em L :');
% dados início
x2 = 100;
areaS = 0.3;% área efetiva da membrana em (m2)
vol0 = 30; % volume inicial da solução de soro em (L)
mpo = 2.057; % massa do soro em pó em (kg)
mag = 29.4; % massa de água no soro reconstituído em (kg)
xp0 = 0.12; % fração mássica de proteína no soro em pó
xlacsal = 0.88; % fração mássica de lactose + sais minerais e outros
vfinal = 6; % volume final do processo em (L)
% dados final

% cálculo das massas
mprot = mpo*xp0;% massa de proteína no soro em (kg)
msol0 = mpo-mprot+mag; % massa inicial da solução excluída de proteína em
(kg)
mlacsal0 = mpo*xlacsal; % massa inicial de lactose+sais+outros

% condição inicial da ultrafiltração
y0(1) = vol0; %volume da solução (aproximadamente o volume de água)em (L)
y0(2) = msol0; % massa da solução sem proteína em (kg)
y0(3) = mlacsal0; % massa de lactose+sais+outros em (kg)

% vetor de constantes
par(1) = areaS;
par(2) = mprot;
par(3) = vfinal;
par(4) = ndia;
par(5) = mlacsal0;
par(6) = vol0;

% Cálculo da ultrafiltração
dtempo = 0.01; % incremento de tempo em horas
tempo0 = 0; % tempo inicial
ymin = 10000;
matsomaU = [];
tsomaU = [];
while ymin > vfinal
    tempol = tempo0+dtempo;
    tspan = [tempo0, tempol];
    [tempo,y]=ode15s('dyUF',tspan,y0);
    matsomaU=[matsomaU;y];
    tsomaU = [tsomaU;tempo];
    ymin = y(end,1);
    tempo0 = tempol;
    y0 = y(end,:);
end

tempoini=tsomaU(1);
tempofin=tsomaU(end);
% Término do cálculo de UF

%Início da otimização
yUF = y(end,:);
x1=1;
[volop,fval] = fminbnd('diafiltra',x1,x2)
% volop = volume total de água a ser utilizado na DF otimizado
    
```

```

% Início do cálculo de DF com volume otimizado
v1=volop/par(4);
vfinal =par(3);
ndia = par(4)
    % Preparação para início do loop
    dtempo = 0.01; % incremento de tempo em horas
    tempo0 = 0; % tempo inicial
    ymin = 10000; % valor usado na partida do loop
    matsoma = []; % matriz do resultado da integração
    tsoma = []; % vetor tempo
    y0(1) = yUF(1)+v1;
    y0(2) = yUF(2)+v1;
    y0(3) = yUF(3);

for j=1:ndia
    while ymin > vfinal
        tempol = tempo0+dtempo;
        tspan = [tempo0, tempol];
        [tempo,y]=ode15s('dyDF',tspan,y0);
        matsoma=[matsoma;y];
        tsoma = [tsoma;tempo];
        ymin = y(end,1);
        tempo0 = tempol;
        y0 = y(end,:);
    end
    yfin = y0;
    y0(1) = yfin(1)+v1;
    y0(2) = yfin(2)+v1;
    y0(3) = yfin(3);
    ymin = y0(1);
end
tempotot=tsoma(end)
conc=par(2)./matsoma(:,1);
fraprot=par(2)/(matsoma(end,3)+par(2))
cls = matsoma(:,3)./matsoma(:,1);
% Fim do cálculo de DF com volume otimizado

plot(tsomaU, matsomaU(:,1))
xlabel('tempo de UF')
ylabel('volume da solução sem proteína na UF')

figure
plot(tsoma, matsoma(:,1))
xlabel('tempo de DF')
ylabel('volume da solução sem proteína na DF')

figure
plot(tsoma, cls)
xlabel('tempo de DF')
ylabel('conc de lactose e sais na DF')

figure
plot(tsoma, conc)
xlabel('tempo de DF')
ylabel('concentração de proteína')
    
```

Anexo A - Metodologia Analítica

Este anexo apresenta o método analítico adotado neste trabalho. Foram determinadas a concentração de proteínas e a concentração de sólidos totais nas amostras de concentrado e permeado da UF e DFs.

Metodologia do extrato seco total (método gravimétrico – LANARA, 1981)

Princípio

O princípio deste método é a determinação do material obtido após a evaporação da água da amostra analisada.

Determinação

A determinação gravimétrica do extrato seco total das amostras iniciou-se cobrindo as cápsulas de fundo chato com 10 g de areia tratada. As cápsulas foram levadas a estufa a uma temperatura de 105°C permanecendo por uma hora. Após foram levadas a um dessecador num período de 45 minutos e se fez a pesagem. Cada cápsula recebeu 10 mL de amostra distribuída na camada de areia formada. A amostra foi então levada ao banho-maria por 30 a 45 min e seca em estufa a 85°C por 2 horas. Esfriar em dessecador e pesar. As operações de secagem, resfriamento e pesagem foram repetidas até a obtenção de peso constante.

Material:

- cápsula de fundo chato de porcelana (7 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura);
- areia tratada;
- dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio;
- pipeta volumétrica de 10 mL;
- banho-maria;
- estufa a 85°C.

Cálculo do extrato seco total

$$\% \text{ Extrato} = \frac{100 \times P}{V}$$

onde:

P = peso do extrato seco em gramas;

V = mL de amostra.

Metodologia do teor de proteína bruta (método Kjeldahl – A.O.A.C, 1984 modificado por ICTA - UFRGS)**Princípio**

O princípio deste método é a determinação da matéria nitrogenada total de uma amostra, aplicando-se a qualquer tipo de alimento.

Determinação

A determinação da proteína total presente na amostra é realizada por três etapas: digestão, destilação e titulação.

1º) Digestão da amostra:

- pipetar 1 mL de amostra colocando no tubo digestor;
- adicionar 2,5 g de sulfato de sódio;
- veter de 12 a 14 mL da solução sulfo-cúprica;
- ligar trompa d'água do digestor;
- colocar os tubos no aparelho digestor e tampar com os cabeçotes;
- deixar digerindo por 50 min a 420°C;
- retirar os tubos do digestor e deixar esfriar.

2º) Destilação da amostra:

- verter cerca de 12 a 14 mL de ácido bórico a 4% em erlenmeyer de 250 mL;
- adicionar 40 mL de água destilada;
- colocar 3 gotas de indicador Taschiro no erlenmeyer de destilação;
- abrir a água do condensador;
- conectar o erlenmeyer ao destilador de modo que a ponteira fique submersa no líquido;

3°) Titulação da amostra:

- titular a solução destilada através de bureta com ácido sulfúrico 0,1 N de concentração exatamente conhecida, até a virada de cor (verde para roxo);
- anotar o volume de ácido sulfúrico gasto para que ocorra esta mudança.

Material:

- aparelho de destilação com retentor de amônia;
- aparelho de titulação semi-automático;
- balança analítica (precisão 0,0001g);
- balões Kjeldahl 500 mL (para destilação);
- digestor de proteína (Tekator) a 420°C;
- tubos para digestão (semi-micro marca Tekator);
- vidraria comum de laboratório.

Reagentes e soluções:

- carbonato de sódio P.A.;
- hidróxido de sódio a 40%;
- sulfato de sódio P.A.;
- indicador Taschiro: dissolver separadamente 0,1251g de vermelho de metila e 0,0825 g de azul de metileno em 30 mL de álcool etílico. Veter para balão volumétrico de 100

mL e completar o volume com álcool etílico. Filtrar com filtro comum pregueado para frasco âmbar;

- solução de ácido bórico a 4%;
- solução de ácido sulfúrico 0,1 N: misturar 16 mL de ácido sulfúrico em 4 L de água destilada.

Padronização: colocar em cadinho de vidro 2 g de carbonato de sódio secar a 280°C por 1 hora (deixar atingir a temperatura antes de colocar o cadinho). Passar para um pesa-filtro, pesar por diferença 0,19-0,24 g de carbonato de sódio em erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 50 mL de água destilada recentemente fervida e resfriada, usando como indicador 5 gotas de Tashirol. Titular com ácido sulfúrico até a viragem de cor roxa, aquecer a erlenmeyer até a fervura, para eliminar o CO₂ (passa para verde). Esfriar e prosseguir a titulação até a cor levemente roxa.

Cálculo do fator de correção:

$$F.C = \frac{1000 \times P}{V \times 5,3002}$$

onde:

P = peso de carbonato de sódio;

V = volume em mL de ácido sulfúrico usados na titulação.

- solução saturada de sulfato de cobre a 60%: dissolver 19,5 g de sulfato cúprico em 30 mL de água destilada. Deixar sob agitação a 40°C por 2 h;
- solução sulfo-cúprica: 2g de selenito de sódio em 1000 mL de ácido sulfúrico concentrado, de baixo teor de nitrogênio. Acrescentar, sob agitação constante, 4 porções de 5 mL (perigo de explosão) de solução saturada de sulfato de cobre. Deixar em repouso alguns dias. O excesso de sulfato de cobre depositado é desprezado por decantação ou filtração.

Cálculo do teor de proteína

1 mL de ácido sulfúrico a 0,1 N = 0,0014g de N₂

Relacionar para 100g de amostra e multiplicar pelo fator de correção apropriado do tipo de alimento.

$$\% \text{ Proteína} = \frac{K \times V \times \text{Fator}}{P}$$

onde:

K = FC x 0,0014 x 100;

P = volume da amostra;

FC = fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1 N;

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,1 N gasto na titulação;

Fator = fator de conversão nitrogênio para proteína.

Para amostra líquida multiplicar o resultado final por 10.

Este fator varia conforme for o alimento:

Leite e produtos lácteos = 6,38

Trigo e produtos tritícolas = 5,70

Gelatina = 5,55

Ovos = 6,68

Arroz = 5,95

Soja = 5,71

Cevada, aveia, centeio = 5,83

Nozes = 5,46

Carnes em geral e alimentos com mistura de proteína animal e vegetal = 6,25.