



**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E MISSÕES URI  
ERECHIM**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**SIDIANE ILTCHENCO**

**CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE POR  
ULTRAFILTRAÇÃO**

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**FEVEREIRO 2016**

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E MISSÕES URI  
ERECHIM**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE POR  
ULTRAFILTRAÇÃO**

**SIDIANE ILTCHENCO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós -  
Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim  
-RS como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre  
em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração:  
Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional  
Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Eunice Valduga  
Prof<sup>ª</sup>. Dr. Juliana Steffens

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**FEVEREIRO 2016**

# CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE POR ULTRAFILTRAÇÃO

**Sidiane Itchenco**

Dissertação de mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr. Eunice Valduga  
(Orientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr. Juliana Steffens  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião  
(UPF - Passo Fundo)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr. Clarice Steffens  
(URI - Erechim)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr. Ilizandra Aparecida Fernandes  
(URI - Erechim)

Erechim, Fevereiro de 2016

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – ERECHIM

*Dedico esta conquista aos meus pais,  
por todo apoio, dedicação e  
por nunca medirem esforços para que eu chegasse até aqui.  
O meu muito OBRIGADA.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda, por me ouvirem tantas e tantas vezes, me dar forças para seguir sempre em frente e iluminando meus pensamentos.

A minha família em especial aos meus pais Ione e Luiz. Obrigado por sempre me apoiarem em tudo que fiz, por todo amor e preocupação e por serem acima de tudo meus exemplos de vida.

Ao meu namorado, Adriano. Obrigada pelo seu amor, por sua paciência e por sempre acreditar em mim.

As minhas orientadoras, Professora Dr<sup>a</sup> Juliana e a Professora Dr<sup>a</sup> Eunice, pela disponibilidade, oportunidade, compreensão, apoio, paciência e dedicação em todas as fases do trabalho e por não desistirem de mim.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim pelas orientações, aconselhamentos e transmissão de seus conhecimentos e experiências. Em especial a banca dos seminários pelas contribuições e a professora Jamile Zeni por sua ajuda com os gráficos, e também a professora Juliana Barbosa por se disponibilizar no transporte do soro da empresa até a Universidade.

A Marcia e a Ilizandra, por todos os ensinamentos repassados e ajuda com a técnica de eletroforese.

As bolsistas, Eloise e Julia pela ajuda na realização dos experimentos.

A Relat - Laticínios Renner S.A. pela doação do soro de leite para a realização dos experimentos e parceria em Projeto apoiado pelo Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim tanto pela estrutura física como profissional disponibilizada aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao CNPq e ao Conselho Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e suporte financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE POR ULTRAFILTRAÇÃO

Sidiane Iltchenco  
Fevereiro/2016

**Orientadoras:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eunice Valduga; Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Juliana Steffens.

O objetivo do estudo foi avaliar o processo de UF na recuperação dos constituintes do soro de leite bovino utilizando um sistema de bancada com volume de operação de 200 mL, em escoamento *dead-end*, membrana plana de polisulfona amida (100 kDa e área de permeação de 0,001134 m<sup>2</sup>). Primeiramente, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, variando-se a temperatura (20 a 40°C) e a pressão 1 a 3 bar, e na sequência foi realizado um novo planejamento com temperaturas de 5 a 15°C e pressões de 1 a 3 bar, respectivamente. Como variáveis dependentes foram avaliadas o fluxo permeado de água e soro de leite, proteína, sólidos, condutividade elétrica, acidez, pH, lactose e minerais totais das frações concentradas e permeadas e as resistências das membranas frente às condições de processo. Da condição maximizada com a membrana de 100 kDa, também foram realizados experimentos com membrana plana de polietersulfona de 50 kDa. Em relação ao fluxo de permeado de soro ao longo do tempo verificou-se uma queda, onde a pressão e temperatura exerceram influência significativa ( $p < 0,05$ ) positiva no fluxo médio, indicando que à medida que aumenta-se a temperatura e a pressão obtêm-se aumento de fluxo. A máxima concentração de proteína obtida no concentrado foi de 1,35 % operando a 15°C e 3 bar. Na temperatura de 40°C e 1 bar foi verificado no concentrado a maior acidez (31,73°D e pH 4,37), como consequência uma redução no teor de lactose. Não foi detectada influência significativa ( $p > 0,05$ ) da temperatura e pressão sobre a condutividade e teores de minerais totais dos concentrados e permeados nas faixas estudadas. A resistência de permeação para a membrana de 100 kDa foi de  $2,43 \times 10^7$  a 40°C enquanto que a 15°C foi de  $2,77 \times 10^7$ . Em relação à membrana de 50 kDa foi verificado fluxo permeado menor 7,19 L/m<sup>2</sup>h, porém uma retenção de proteínas cerca de 3 vezes maior do que com a membrana de 100 kDa nas mesmas condições de UF, sendo verificado por eletroforese permeação com predominância das para as proteínas,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina. Desta forma, a utilização da UF (50 kDa) em temperaturas na faixa de 10°C e pressão de 2 bar torna-se uma alternativa recomendável para concentração e conservação de constituintes do soro de leite e aumento de escala.

**Palavras-chave:** Ultrafiltração; Soro de leite; Concentração; Caracterização.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

## WHEY PROTEIN CONCENTRATION IN ULTRAFILTRATION

Sidiane Iltchenco

February/2016

**Advisors:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eunice Valduga; Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Steffens

The aim of the study was to evaluate the UF process in the recovery of bovine whey constituents using a laboratory system with operation volume of 200 mL in flow dead-end, flat membrane of polysulfone amide (100 kDa and permeation area of 0.001134 m<sup>2</sup>). First, a factorial design 2<sup>2</sup>, the temperature (20 to 40°C) and the pressure (1 to 3 bar) was performed, and the sequence was carried out a new design with temperatures 5 to 15°C and pressures of 1 to 3 bar, respectively. The dependent variables measured were the flow of water permeate and milk whey, protein, solids, conductivity, acidity, pH, ash, lactose, concentrated and the permeated fractions and membranes across the resistances of the process conditions. The condition maximized with the membrane of 100 kDa were also made with flat membrane polyethersulfone 50 kDa. In relation to milk whey permeate flux over time was observed one decrease, where the pressure and temperature have positive influence (p<0.05) in the flow, indicating that as the temperature increases and pressure are obtained increased flow. The maximum protein concentration in the concentrate obtained was 1.35 % operating at 15°C and 3 bar. At 40°C and 1 bar was observed in concentrate the higher acidity (31.73°D and pH 4.37) results in a decrease in lactose content. The temperature and pressure no significant influence (p>0.05) on total conductivity and mineral contents of the concentrates and permeates. The permeation resistance of 100 kDa was 2.43 x 10<sup>7</sup> at 40°C while at 15°C was 2.77 x 10<sup>7</sup>. With respect to the membrane 50 kDa was observed lower permeate flow 7.19 L/m<sup>2</sup>h, however a high protein retention about 3 times greater than with the membrane of 100 kDa, was verified by electrophoresis permeation with predominance of proteins, β-lactoglobulin and α-lactalbumin. Thus the use of UF (50 kDa) at temperatures of 10°C and pressure of 2 bar, is one recommendable alternative for concentration and conservation constituents of milk whey and scale up.

**Keywords:** Ultrafiltration; Whey; Concentration; Characterization.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 SORO DE LEITE .....	4
2.1.1 Produção do soro de leite .....	5
2.2 ASPECTOS AMBIENTAIS.....	6
2.3 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO SORO DE LEITE .....	7
2.3.1 Lactose.....	8
2.3.2 Sais Minerais e Vitaminas .....	8
2.3.3 Proteínas .....	9
2.4 PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.....	11
2.5 PRODUTOS DERIVADOS DO SORO DE LEITE.....	12
2.6 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS .....	14
2.6.1 Características dos processos de separação por membranas .....	16
2.6.1.1 Força motriz e transporte.....	16
2.6.1.2 Geometria de membranas e módulos .....	18
2.6.1.3 Filtração convencional e em escoamento tangencial .....	19
2.6.1.4 Fluxo de permeado e seletividade .....	20
2.6.1.5 Fator de concentração.....	21
2.6.2 Classificação dos PSM .....	21
2.6.2.1 Ultrafiltração (UF).....	23
2.7 FATORES LIMITANTES DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS.....	23
2.7.1 Polarização de Concentração .....	24
2.7.2 Incrustações ( <i>Fouling</i> ).....	24
2.8 APLICAÇÕES DOS PSM NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS.....	26
2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS.....	29
3.2 PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	29
3.2.1 Aparato experimental .....	29
3.2.2 Estudo do efeito da temperatura e pressão na UF: planejamento de experimentos.....	31
3.2.3 Procedimento experimental .....	33

3.2.4 Fluxo de Permeado Resistência das Membranas e Rejeição .....	33
3.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	34
3.3.1 Proteína total .....	34
3.3.1.1 Frações das proteínas - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
3.3.2 Sólidos totais.....	35
3.3.3 Condutividade elétrica.....	35
3.3.4 Acidez total.....	35
3.3.5 pH.....	36
3.3.6 Lactose.....	36
3.3.7 Minerais Totais .....	36
3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE <i>IN NATURA</i> .....	37
4.2 PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	38
4.2.1 Efeitos da pressão e temperatura sob os fluxos de água e de soro de leite em UF de 100 kDa.....	38
4.2.1.1 Cálculo da resistência de permeação.....	46
4.2.2 Efeitos da pressão e temperatura sob os constituintes dos concentrados e permeados em UF de 100 kDa.....	48
4.2.2.1 Proteínas .....	48
4.2.2.2 Sólidos totais.....	54
4.2.2.3 Condutividade .....	61
4.2.2.4 Acidez.....	64
4.2.2.5 pH .....	67
4.2.2.6 Lactose.....	72
4.2.2.7 Minerais totais.....	77
4.2.3 Fluxo de permeado obtido da UF de soro de leite com membrana de 50 kDa.....	80
4.2.4 Caracterização do concentrado e permeado obtidos da UF de soro de leite com membrana de 50 kDa .....	81
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>86</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE A - MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE B - RESULTADOS ESTATÍSTICOS .....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fluxograma simplificado da produção de leite. ....	5
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas.....	17
<b>Figura 3</b> - Relação entre força motriz e tipo de transporte em membranas. ....	18
<b>Figura 4</b> - Filtração convencional ( <i>dead end filtration</i> ) e filtração em fluxo cruzado ou filtração tangencial ( <i>cross flow filtration</i> ). ....	19
<b>Figura 5</b> - Variação esquemática do fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por polarização de concentração e <i>fouling</i> . ....	25
<b>Figura 6</b> – Vista geral da unidade de UF em escala laboratorial: a) banho ultratermostato, b) cilindro de nitrogênio, c) módulo com membrana e d) agitador magnético. ....	30
<b>Figura 7</b> - Esquema do módulo com membrana plana detalhada.....	30
<b>Figura 8</b> - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o fluxo médio de soro de leite (L/ m <sup>2</sup> h), obtidos do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> - planejamento 1. ....	39
<b>Figura 9</b> - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o fluxo médio de soro de leite (L/m <sup>2</sup> h), obtidos do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> - Planejamento 2.....	41
<b>Figura 10</b> - Fluxos permeados de água (“a” e “c”) e do soro de leite (“b” e “d”) em função do tempo, para membrana de 100 kDa dos planejamentos 1 e 2, respectivamente. ....	43
<b>Figura 11</b> - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o teor de proteína total % (m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> - Planejamento 1. ....	49
<b>Figura 12</b> - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para proteína (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> - Planejamento 1 .....	50
<b>Figura 13</b> - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o teor de proteína total (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> - Planejamento 2. ....	52
<b>Figura 14</b> - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para proteína (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> - Planejamento 2. ....	52
<b>Figura 15</b> - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para os sólidos totais (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> - Planejamento 1. ....	55

- Figura 16** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para sólidos totais (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 1. .... 56
- Figura 17** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para os sólidos totais (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2. .... 58
- Figura 18** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para os sólidos totais (% m/v) dos permeados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$ - Planejamento 2. 59
- Figura 19** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para rejeição de sólidos totais (%), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2. .... 60
- Figura 20** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a condutividade (mS/cm) dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 1. .... 62
- Figura 21** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a condutividade (mS/cm) dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2. .... 63
- Figura 22**- Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para acidez ( $^{\circ}$ Dornic) dos concentrados (a) e dos permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 1. .... 65
- Figura 23** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para a acidez ( $^{\circ}$ D) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2. 66
- Figura 24** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para acidez ( $^{\circ}$ Dornic) dos permeados, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2. .... 67
- Figura 25** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para pH dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 1. .... 69
- Figura 26** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o pH dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2. .... 70
- Figura 27** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para o pH dos permeados obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2. .... 71
- Figura 28**- Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a lactose (g/100 mL) dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 1. .... 73
- Figura 29** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para rejeição (%) de lactose obtido do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 1. .... 74
- Figura 30** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para a lactose (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2. . 76

- Figura 31** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para lactose (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2. .... 76
- Figura 32** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para o teor de minerais totais (g/100 mL) dos concentrados (a-c) e permeados (b-d) obtidos após UF dos planejamentos fatoriais  $2^2$  – Planejamentos 1 e 2, respectivamente..... 79
- Figura 33** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para rejeição de minerais totais (%) obtidos dos planejamentos fatoriais (a) Planejamento 1 e (b) Planejamento 2. .... 79
- Figura 34** - Fluxo permeado de soro de leite ( $L/m^2h$ ) em função do tempo, para membrana de 50 kDa à temperatura de 10°C e pressão de 2 bar. .... 80
- Figura 35**- Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE para as amostras de concentrado e permeado da UF com membrana de 50 kDa.. .... 83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Composição aproximada do soro de leite doce.....	7
<b>Tabela 2-</b> Exemplos da aplicação funcional do soro de leite na indústria de alimentos.....	12
<b>Tabela 3-</b> Principais produtos derivados do soro de leite.....	13
<b>Tabela 4 -</b> Aplicações do PSM em diversas áreas. ....	15
<b>Tabela 5 -</b> Características e aplicações dos PSM.....	22
<b>Tabela 6-</b> Especificações das membranas de UF utilizadas nos experimentos. ....	31
<b>Tabela 7 -</b> Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (planejamento 1). ....	32
<b>Tabela 8 -</b> Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (planejamento 2). ....	32
<b>Tabela 9 -</b> Caracterização média do soro de leite utilizado neste estudo e caracterização do soro doce e ácido de acordo com a literatura. ....	37
<b>Tabela 10 -</b> Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) - Planejamento 2 e resposta em termos de fluxo de permeado médio (L/m <sup>2</sup> h) para água e soro de leite, obtidos após UF. ....	38
<b>Tabela 11 -</b> Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados)- Planejamento 2 e resposta em termos de fluxo de permeado médio (L/m <sup>2</sup> h) para água e soro de leite, obtidos após UF. ....	40
<b>Tabela 12 -</b> Viscosidade da água e do soro de leite em diferentes temperaturas e a resistência obtida nas condições extremas de cada planejamento. ....	47
<b>Tabela 13 -</b> Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) - Planejamento 1 e resposta em termos de proteína total (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente de rejeição (%) obtidos após UF.....	48
<b>Tabela 14 -</b> Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) - Planejamento 2 e resposta em termos de proteína total (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente de rejeição(%) obtidos após UF.....	51
<b>Tabela 15 -</b> Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados)-Planejamento 1 e resposta em termos de sólidos totais (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente de rejeição (%) obtidos após UF.....	54
<b>Tabela 16 -</b> Matriz do segundo planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) – Planejamento 2 e resposta em termos de sólidos totais (g/100 mL) para os concentrados e permeados e coeficiente de rejeição(%) obtidos após UF. ....	57

<b>Tabela 17</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados)- Planejamento 1 e resposta em termos de condutividade (mS/cm) para os concentrados e os permeados obtidos após UF. ....	61
<b>Tabela 18</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados) - Planejamento 2 e resposta em termos de condutividade (mS/cm) para os concentrados e os permeados obtidos após UF. ....	62
<b>Tabela 19</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados) - Planejamento 1 e resposta em termos de acidez ( $^{\circ}$ D) para os concentrados e os permeados obtidos após UF. ....	64
<b>Tabela 20</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados) – Planejamento 2 e resposta em termos de acidez ( $^{\circ}$ D) para os concentrados e os permeados obtidos após UF. ....	65
<b>Tabela 21</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados) – Planejamento 1 e resposta em termos de pH para os concentrados e os permeados obtidos após UF.....	68
<b>Tabela 22</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados) – Planejamento 2 e resposta em termos de pH para os concentrados e os permeados obtidos após UF.....	69
<b>Tabela 23</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados)- Planejamento 1 e resposta em termos de lactose (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente rejeição (%) obtidos após a UF.....	72
<b>Tabela 24</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados)- Planejamento 2 e resposta em termos de teor lactose (g/100 mL) para os concentrados e permeados e coeficiente de rejeição obtidos após UF.....	74
<b>Tabela 25</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ (valores reais e codificados) – Planejamentos 1 e 2 e resposta em termos de minerais totais (g/100 mL) para concentrados, permeados e coeficiente rejeição (%), obtidos após UF. ....	78
<b>Tabela 26</b> - Constituintes do soro de leite <i>in natura</i> , frações de concentrado e permeado e coeficiente de rejeição (%) obtidos por UF em membrana de 50 kDa a 10°C e 2 bar. ....	82

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA**

<b>A</b>	Área
<b>Bar</b>	Unidade de pressão
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovina
<b>Ca</b>	Concentração de soluto na alimentação
<b>Cp</b>	Concentração de soluto no permeado
<b>CPS</b>	Concentrado proteico de soro
<b>D</b>	Diálise
<b>DBO</b>	Demanda Biológica de Oxigênio
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demanda bioquímica de cinco dias
<b>DF</b>	Diafiltração
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
<b>ED</b>	Eletrodialise
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
<b>FC</b>	Fator de Concentração
<b>IEP</b>	Índice de Eficiência de Proteínas
<b>Ig</b>	Imunoglobulinas
<b>IPS</b>	Isolado proteico de soro
<b>Jm</b>	Fluxo de médio de permeado
<b>Jp</b>	Fluxo de permeado
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KDa</b>	Quilo Dalton
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>Kgf</b>	Quilograma força
<b>L</b>	Litros
<b>MF</b>	Microfiltração

**MWCO** *Molecular Weight Cut-Off* (massa molecular de corte)

**N<sub>2</sub>** Nitrogênio

**NaCl** Cloreto de sódio

**NF** Nanofiltração

**nm** Nanômetro

**°C** Graus Celsius

**OI** Osmose Inversa

**P** Pressão

**PG** Permeação gasosa

**PSM** Processo de Separações com Membranas

**PV** Pervaporação

**R** Coeficiente de Rejeição

**R<sub>m</sub>** Resistência da membrana

**ST** Sólidos Totais

**t** Tempo

**T** Temperatura

**UF** Ultrafiltração

**V** Volume

**WHO** Organização Mundial de Saúde

**μ** Viscosidade da solução de alimentação

**α** Fator de separação

**α-La** α-lactoalbumina

**β-Lg** β-lactoglobulina

**ΔC** Diferença de concentração

**ΔE** Diferença de potencial elétrico

**ΔP** Diferença de pressão

**Δμ** Diferença de potencial química

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de laticínios é uma das que mais cresce no mundo e com o Brasil não é diferente, porém um dos principais problemas na indústria de laticínios é a geração de um subproduto denominado de soro de leite. O soro de leite corresponde à fração líquida remanescente após a coagulação do leite e remoção de caseína durante a fabricação de queijo, sendo resultante da fabricação de queijos ou da produção de caseína. Esse subproduto representa cerca de 85 a 90 % do volume total do leite utilizado durante a produção de queijos e contém, aproximadamente, 55 % dos nutrientes do leite incluindo as proteínas, a lactose, vitaminas solúveis em água e minerais (BALDASSO et al., 2011b; BRANDELLI et al., 2015, PALATNIK et al., 2015).

O soro de queijo ainda é pouco aproveitado no setor tecnológico alimentício, sendo grandes volumes enviados para nutrição de suínos, ou direcionados a sistemas de tratamento de efluentes com baixa eficiência ou altos custos (SERPA et al., 2009, SOUZA et al., 2010). Devido não somente ao elevado conteúdo de substâncias orgânicas, mas também ao volume elevado de soro produzido, este se torna um dos maiores problemas para as indústrias de laticínios em todo o mundo. Quando o mesmo é incorporado às águas residuais dos laticínios, constitui a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada nesse setor, sendo que a carga poluente representada pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO) poderá atingir valores de aproximadamente 60.000 mg.O<sub>2</sub>/L, ou seja, cerca de 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico (BARBOSA et al., 2010; PRAZERES et al., 2012).

No entanto se o soro de leite é visto como um agente de poluição, por outro lado, pode ser considerado um produto nobre, rico em nutrientes, principalmente proteínas de alta qualidade biológica. O seu fracionamento pode contribuir assim para melhorar a expressão de suas propriedades permitindo a utilização dos constituintes de maior importância no âmbito comercial. Os minerais do soro, por exemplo, podem ser utilizados para fortificação de alimentos e bebidas enquanto que a lactose pode ser fonte de material energético podendo ser aproveitada para diversos processos biotecnológicos em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. Já as proteínas do soro consideradas a fração mais importante, possuem propriedades nutricionais além de importantes propriedades físico-químicas e funcionais como: emulsificante, espumante e geleificante, podendo ser incorporadas em uma vasta gama de alimentos (ZAVAREZE et al., 2010; BALDASSO, 2011; ARUNKUMAR & ETZEL 2015).

Tendo em vista que os constituintes do soro principalmente as proteínas apresentam grande potencial para aplicação em alimentos buscam-se técnicas para o aproveitamento do mesmo. Uma alternativa é o estudo da recuperação e fracionamento dos constituintes por meio de membranas utilizando os processos de separação por membranas (PSM). A indústria de laticínios é uma das pioneiras no desenvolvimento de equipamentos e técnicas com membranas, sendo a ultrafiltração (UF) o principal processo para fracionar os constituintes do soro (LEIDENS, 2013). A UF é um dos procedimentos de separação mediante membranas microporosas, que permite uma variação na relação de concentração entre os vários componentes do soro, devido à retenção seletiva de proteína e outros materiais coloidais, com permeação de constituintes como lactose, sais minerais e outros compostos com menor massa molar da membrana utilizada (ROSA et al., 2010; FAEDO et al., 2013; BAGUENA et al., 2015).

Uma vez que a quantidade de soro produzida vem aumentando anualmente e considerando seu desperdício, aliado ao seu valor nutritivo, o fracionamento do soro de leite é uma alternativa não apenas de interesse científico, mas também comercial. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi identificar alternativas para um adequado aproveitamento do soro de leite pelas indústrias de laticínios de forma a agregar mais valor a esse subproduto e conseqüentemente, diminuir a poluição gerada por esse setor contribuindo para a melhoria do meio ambiente e proporcionando ganhos às indústrias. Para tanto foram definidos alguns objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar o soro de leite *in natura* em termos de proteína total, sólidos totais, pH, acidez, lactose, condutividade elétrica e minerais;
- ✓ Avaliar os efeitos das variáveis temperatura (°C) e pressão (bar) sob os fluxos de permeado com membrana de 100 kDa para a água e para soro de leite, empregando metodologia de planejamento de experimentos;
- ✓ Verificar as resistências das membranas de 100 kDa frente às condições de processo;
- ✓ Caracterizar as frações de permeado e concentrado do soro de leite obtidas por ultrafiltração, em termos de proteína total, sólidos totais, condutividade elétrica, acidez, pH, lactose, e minerais;
- ✓ Determinar a rejeição das membranas para proteína, sólidos totais, lactose e minerais;
- ✓ Comparar a concentração dos constituintes do soro e fluxo de permeado da condição maximizada obtida com a membrana de 100 kDa com uma membrana de 50 kDa;
- ✓ Avaliar as frações proteicas do concentrado e do permeado obtidos da membrana de 50 kDa pela metodologia de eletroforese.

Esta dissertação está dividida em itens, conforme descrição resumida apresentada a seguir: No item 2, será apresentada uma breve revisão da literatura abrangendo as características do soro de leite bovino e principais constituintes, bem como suas propriedades e produtos derivados. Os fundamentos teóricos sobre os processos de separação com membranas, incluindo maiores detalhes sobre a ultrafiltração, fatores que afetam a eficiência destes processos, além da aplicação desta tecnologia na indústria de laticínios. No item 3 serão apresentados os materiais, equipamentos e técnicas necessárias ao processo de ultrafiltração (UF) em escala laboratorial, tipos de membranas utilizadas bem como a descrição dos métodos analíticos utilizados na análise das amostras.

No item 4, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos dos efeitos das variáveis (pressão e temperatura) sob os fluxos de água e de soro de leite e também sob os constituintes dos concentrados e permeados de soro utilizando membrana de 100 kDa e posteriormente os resultados de fluxo e separação dos constituintes obtidos da condição otimizada para a membranas de 50 kDa. Nos itens 5 e 6 serão apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros e finalizando a lista de referências e os apêndices.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item é apresentada uma revisão da literatura sobre as características do soro de leite, dando ênfase para o soro de leite doce que foi o utilizado neste estudo e nas proteínas de grande interesse nas indústrias. Além disso, são apresentados fundamentos teóricos sobre os Processo de Separação com Membranas (PSM) e fatores que afetam a eficiência destes processos.

### 2.1 SORO DE LEITE

A indústria de lácteos é um dos setores mais importantes da economia de países industrializados e em desenvolvimento. Em geral, os queijos são, em termos de volume, o principal destino do leite processado com quase 45% da produção total de leite. Entretanto, um dos principais problemas associados à produção de queijo é a geração de um subproduto denominado soro de leite (POPPI et al., 2010; PALATNIK et al., 2015).

O soro de leite também conhecido como soro de queijo, soro lácteo ou lacto soro, é um subproduto da indústria de laticínios que pode ser definido como sendo a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijos ou da caseína (GUIMARÃES et al., 2010; BALDASSO et al., 2011a). Em sua forma líquida apresenta-se opaco com coloração amarelo-esverdeado, sendo que sua composição química é variável em função do tipo queijo ou caseína produzidos, do tipo de leite utilizado, do período do ano, do tipo de nutrição oferecida aos animais, do estágio de lactação e também da qualidade e tipo do processamento industrial a que foi submetido (SMITHERS, 2008; POPPI et al., 2010).

Do ponto de vista industrial, existem dois tipos de soro fluido: o soro de leite doce e o soro de leite ácido, classificados por sua acidez total ou por seu conteúdo em ácido láctico (OLIVEIRA et al., 2012; PA'EE et al., 2015). O soro ácido é um subproduto da fabricação do caseinato, requeijão, queijo Quark ou queijo tipo Cottage e apresenta um pH não superior a 5,1. O soro doce é obtido pela coagulação enzimática na produção de queijos tipo Minas Frescal, Mussarela, Prato, Colonial entre outros e apresenta pH de pelo menos 5.6 (SILVA et al., 2015; SMITHERS, 2015).

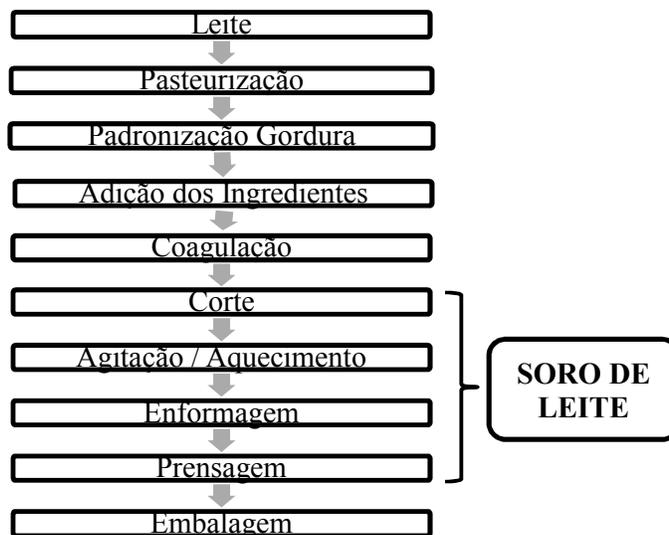
O soro de leite ácido tende a ter um teor de mineral mais elevado em comparação com soro de leite doce. Já a concentração de lactose é menor no soro ácido do que no soro doce, devido ao processo de fermentação na produção do soro ácido, onde uma fração de lactose é transformada em ácido láctico, durante a formação do coalho. Com relação à composição

proteica, ambos os soros são semelhantes no que se refere à maioria das proteínas (ALVES et al., 2014; PA'EE et al., 2015). Com relação a aplicações industriais, o soro ácido tem uso limitado devido ao sabor ácido elevado, mas pode ser utilizado como realçador de sabor de molhos para saladas, retentor de água, emulsificante e como fonte de cálcio, já o soro doce é bastante utilizado em produtos de panificação, salgadinhos, sorvetes e sobremesas lácteas (PELEGRINI & CARRASQUEIRA 2008; CARVALHO et al., 2013).

### 2.1.1 Produção do soro de leite

A quantidade de soro que é gerado no processo de fabricação de queijo depende muito do tipo de queijo produzido, além das técnicas de processamento empregadas, mas em média estima-se, que para a fabricação de um quilo de queijo são necessários dez litros de leite e dependendo da água utilizada no processo recuperam-se de nove a doze litros de soro (PRAZERES, et al., 2012; BRANDELLI, et al., 2015). A Figura 1 ilustra o fluxograma simplificado da produção de queijo.

**Figura 1-** Fluxograma simplificado da produção de leite.



**Fonte:** Adaptado de Carvalhaes (2002) e Baldasso (2008).

O número de estágios da produção de queijo depende muito da variedade a ser obtida, mas de forma geral, a produção de queijo é iniciada com o tratamento térmico em que o leite é aquecido a temperaturas entre 70 e 80°C durante 15 a 20 s para eliminar as bactérias

patogênicas e as formas vegetativas de micro-organismos prejudiciais. Em seguida, ocorre a correção do índice de gordura do leite e a adição de ingredientes, tais como: fermento láctico, coalho e cloreto de cálcio. A etapa seguinte é a coagulação do leite, no qual o aumento da acidez do leite faz a caseína precipitar, formando o coalho. Quando o coágulo se encontra com a consistência desejada, é cortado e pode passar por agitação e também aquecimento para acelerar a remoção do soro. Após essa operação o queijo é enformado e prensado para remover o restante de soro e finalmente embalado (CARVALHAES, 2002; BALDASSO, 2008).

Durante a fabricação do queijo há uma separação dos nutrientes do leite no coalho e no soro. Os componentes insolúveis em água (caseína e gordura) permanecem no coalho, enquanto que os constituintes solúveis em água (lactose, sais e proteínas do soro) são retidos no soro. A distribuição dos componentes no soro depende do tipo de queijo que está sendo fabricado e das formas de coagulação da caseína, mas em média, 52 % dos sólidos totais, 94 % da lactose, 96 % das proteínas solúveis em 38 % dos minerais presentes no leite, permanecem no soro após a fabricação de queijo. A fração proteica do soro, por sua vez, contém, aproximadamente, 50 % de  $\beta$ -lactoglobulina, 25 % de  $\alpha$ -lactoalbumina e 25 % de outras frações proteicas, incluindo as imunoglobulinas (MILLER et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012).

## 2.2 ASPECTOS AMBIENTAIS

Devido ao seu elevado conteúdo em matéria orgânica, que é associado principalmente à presença de lactose e proteínas, o soro possui alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (PRAZERES et al., 2012; BRANDELLI et al., 2015). Quando o mesmo é disposto incorretamente pode conduzir a poluição das águas, geração de odor desagradável, destruição da flora e fauna, comprometimento da estrutura físico-química do solo dessa forma causando graves problemas ambientais (POPPI et al., 2010).

Geralmente o parâmetro mais empregado para medir a poluição é a demanda bioquímica de cinco dias ( $DBO_5$ ). A  $DBO_5$  do soro encontra-se entre 30.000 a 50.000 mg/L, isto significa que para cada litro de soro descartado nos efluentes, cerca de 30 a 50 g de oxigênio dissolvido na água desaparecerão. Este valor é aproximadamente 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico, assim um laticínio com produção média de 10.000 L de soro por dia, provoca a mesma carga poluente de uma população de 5000 habitantes (BARBOSA et al., 2010; LEITE et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; SILVA, 2013). Além da

contribuição orgânica o soro de leite também apresenta altas concentrações de sais minerais, principalmente cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl), e sais de cálcio provenientes do processamento do queijo, conferindo uma contaminação inorgânica. Devido a essas características, o soro, se lançado em corpos d'água, pode causar um excesso de consumo de oxigênio das águas, levando à impermeabilização, eutrofização e à toxicidade dos corpos receptores (PAN et al., 2011; PRAZERES et al., 2012).

Embora os métodos de eliminação do soro nos cursos de água foram toleradas por um tempo, a elevada DBO levou à introdução de rígidas normas ambientais em muitas jurisdições que hoje impedem a eliminação do soro de leite não tratado (SMITHERS, 2015). Processos biológicos aeróbios e métodos físico-químicos podem ser utilizados para tratar este tipo de efluente, mas requerem alto investimento por parte das queijarias, além de elevado gasto energético pelas instalações (SPACHOS & STAMATIS, 2011). Além disso, o descarte incorreto do soro com ou sem tratamento eficiente não é somente um crime previsto por lei, como também um desperdício de um alimento que possui significativa qualidade nutricional e bioquímica (BARBOSA et al., 2010; POPPI et al., 2010). No sentido de atender as legislações ambientais, as indústrias vêm buscando alternativas para a utilização do soro de leite e ao invés de tratá-lo como um efluente industrial (BARBOSA et al., 2010) utilizá-lo como ingrediente em produtos alimentícios.

### 2.3 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO SORO DE LEITE

A Tabela 1 apresenta os principais constituintes do soro de leite doce.

**Tabela 1-** Composição aproximada do soro de leite doce.

<b>Componentes</b>	<b>Soro doce (%) *</b>
Água	93-95
Sólidos Totais (ST)	5,5-6,5
Proteína	0,7-1,2
Gordura	0,04-0,05
Lactose	3,8-5,0
Minerais totais	0,5-0,8

\*Percentual mássico

**Fonte:** Adaptado de Miller et al.(2000); Antunes (2003); Baldasso (2008).

O soro é composto de água, lactose, proteínas, uma quantidade mínima de gordura e minerais incluindo NaCl e KCl, sais de cálcio (principalmente fosfatos) (PESCUMA et al., 2010). O mesmo ainda contém ácido láctico ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e ácido cítrico, compostos nitrogenados não-proteicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (DRAGONE et al., 2009).

O soro doce geralmente apresenta composição igual ou próxima ao apresentado na Tabela 1, entretanto cabe ressaltar que o teor destes compostos pode variar em função da raça do rebanho e alimentação, da sazonalidade, além do tipo de tratamento a que o leite foi submetido (aquecimento, centrifugação, homogeneização) e da técnica de produção de queijo (PRAZERES et al., 2012). Devido a sua importância nos processos de separação as características dos principais componentes são apresentados nos tópicos a seguir.

### **2.3.1 Lactose**

A lactose é um carboidrato característico do leite, é um dissacarídeo constituído por glicose e galactose. No leite integral a mesma é responsável por 40% do total de sólidos enquanto que em leites desengordurados representa em torno de 54%. No soro de leite a mesma é o composto sólido presente em maior quantidade ficando em torno de 70% em base seca (MATTILA-SANSHOLM & SAARELA, 2003).

Esse carboidrato apresenta a mesma massa molar da sacarose, diferindo desta na configuração molecular, no poder edulcorante, na solubilidade e no poder redutor. A lactose é cerca de dez vezes menos solúvel que a sacarose, o que pode causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento de alguns produtos na indústria de laticínios. Na indústria alimentícia sua maior utilização é como ingrediente, sendo empregada em formulações de alimentos infantis; indústria farmacêutica e derivados de lactose, inclusive a produção de glicose e galactose por hidrólise (KOBBLITZ 2008; CAMPOS et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

### **2.3.2 Sais Minerais e Vitaminas**

O soro apresenta quantidades razoáveis de minerais e vitaminas. Grande parte das vitaminas presentes no leite está presente no soro, com predominância das vitaminas do complexo B, tais como a: tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), cobalamina (B12), também estão presentes o ácido ascórbico (vitamina C), a niacina, o retinol (vitamina A) e tocoferol (vitamina E). Além das vitaminas, o soro pode ser considerado uma boa fonte de minerais, pois possui porções de cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio entre outros (ARANHA et al., 2000).

### 2.3.3 Proteínas

Proteínas de soro de leite podem ser definidas como aquelas que permanecem solúveis na fase líquida após a precipitação da caseína; estas apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem um grau de estabilidade estrutural, além disso, apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e, portanto um elevado valor nutritivo. O soro bovino contém aproximadamente 20 % das proteínas originais do leite sendo a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) as proteínas majoritárias representando de 70 a 80 % do total das proteínas (SGARBIERI, 2005; ALMEIDA et al., 2013). Nos últimos anos, o interesse na purificação e no fracionamento de proteínas de soro de leite tem crescido, devido às suas características funcionais, nutricionais e biológicas e suas aplicações terapêuticas e em alimentos (BÁGUENA et al., 2014). Abaixo estão descritas as principais características das proteínas presentes no soro de leite:

-  **$\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg):** Esta proteína é a mais abundante do soro, representa aproximadamente 50% de todas as proteínas do soro e 10 % do leite, no entanto essa fração não está presente no leite humano. É uma proteína globular constituída de 162 resíduos de aminoácidos e massa molar de 18,3 kDa (GAÚCHE et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; KHEM et al., 2015). A  $\beta$ -Lg é considerada estabilizante de proteínas, usada para produção de balas e guloseimas. Possui capacidade de ligar-se a compostos, por exemplo, ácido palmítico, tolueno, azul de bromo-fenol, ácido retinóico e o retinol, além de apresentar um efeito protetor na destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa. Além disso, por ser uma proteína de grande valor nutritivo e elevada solubilidade e estabilidade pode ser usada para a fortificação de bebidas e sucos de frutas. A partir de hidrolisados de  $\beta$ -Lg, também, podem ser preparados leites com baixo conteúdo de fenilalanina, utilizados na alimentação de lactantes com fenilcetonúria (GRASSELLI et al., 1997; POPPI et al., 2010).

-  **$\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La):** Esta proteína é a segunda maior fração presente no soro do leite, representando cerca de 20 % das proteínas totais, com uma massa molar de 14,2 kDa, ponto isoelétrico na faixa de 4,0-5,0 e uma elevada estabilidade térmica (EDWARDS et al., 2009; GAÚCHE et al., 2010; KHEM et al., 2015), sendo rica em aminoácidos essenciais, principalmente o triptofano, um aminoácido precursor de niacina, vitamina hidrossolúvel, cujos derivados desempenham um importante papel no metabolismo energético celular (SGARBIERI, 2005; ALMEIDA et al., 2013).

A  $\alpha$ -La possui capacidade de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção. A fração ainda apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, como por exemplo, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, devido ao seu alto teor de triptofano é utilizada na indústria de alimentação infantil, pode ser usado como agente contraceptivo e ainda possui atividade potencial contra o câncer (HARAGUCHI et al., 2006).

- **Albumina de soro bovina (BSA)**: Esta fração é um polipeptídeo simples contendo cerca de 582 aminoácidos e massa molar entre 66 a 69 kDa, correspondendo a cerca de 10% das proteínas do soro de leite. Caracteriza-se pelo baixo número de triptofano e metionina, porém é rico em cistina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina, sendo uma relevante precursora da síntese de glutatona (HARAGUCHI et al., 2006; SANTOS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013).

Além da  $\beta$ -Lg da  $\alpha$ -La e da BSA, outras proteínas tais como imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase são encontradas no soro de leite em pequenas quantidades, consideradas como proteínas minoritárias. As imunoglobulinas (Ig) representam pelo menos 2% da proteína total do leite, sendo proteínas de alta massa molar 150-1000 kDa. Existem quatro classes de Ig encontradas no leite: IgG1, IgG2, IgA e IgM. Suas principais ações biológicas residem na imunidade passiva e atividade antioxidante, oferecendo proteção contra infecções, pois estimulam a produção de linfócitos, também são responsáveis pela indução da morte celular de células tumorais e atividade antiviral (HARAGUCHI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013).

A lactoferrina é sintetizada pelos neutrófilos, possui uma cadeia de 689 aminoácidos e uma massa molar de aproximadamente 80 kDa, apresenta um ponto isoelétrico de 9,4, e alta afinidade pelo ferro. A lactoferrina presente no soro de leite tem similaridade com a lactoferrina encontrada na corrente sanguínea, onde funciona como transportadora de ferro. Estudos na área indicam que a mesma aparenta ser responsável por vários papéis biológicos, como na atividade imunomoduladora, ação antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (ALMÉCIJA et al., 2006; POPPI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013).

As lactoperoxidasas consistem de uma única cadeia polipeptídica contendo 612 resíduos de aminoácidos. Apresenta massa molar média de 78 kDa representando cerca de 0,5 a 1,0 % das proteínas do soro. A mesma tem sido objeto de vários estudos visando a sua utilização como meio de controlar o desenvolvimento da acidez e mudanças de pH durante a estocagem e produtos de leite resfriados (BALDASSO, 2008; ALMEIDA et al., 2013).

Ainda é possível encontrar no soro os glicomacropéptidos e alguns polipeptídeos (proteose-peptonas). O glicomacropéptido é encontrado apenas no soro doce e não apresenta aminoácidos sulfurados e aromáticos. É uma das únicas proteínas naturais livres de fenilalanina podendo assim ser utilizado em alimentos para o tratamento da fenilcetonúria. As proteose-peptonas são resultantes da proteólise das caseínas por enzimas do leite e correspondem a aproximadamente 1,1 % da proteína total do leite (BALDASSO, 2008; LEIDENS, 2013).

#### 2.4 PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

As proteínas do soro do leite têm sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos, em razão da descoberta do elevado valor biológico de seus peptídeos, fonte de aminoácidos essenciais, os quais os seres humanos não são capazes de sintetizar. As mesmas ainda constituem ingredientes dos mais valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais (ALMEIDA et al., 2013).

De acordo com Smithers, (2008), as proteínas do soro possuem altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes naturais de proteínas, como ovos, peixes, carne bovina e soja. O Índice de Eficiência de Proteínas (IEP) do soro é de 3,2, índice esse que avalia a qualidade das proteínas, numa escala que varia de 0 a 3,5 permitindo, assim, considerá-las como excelente do ponto de vista nutricional (BARBOSA et al., 2010). A alta qualidade nutricional das proteínas é atribuída à presença de aminoácidos essenciais (não sintetizados pelo organismo humano), sendo que esse perfil de aminoácidos essenciais atende ou supera todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (WHO) (BALDASSO, 2008; SMITHERS, 2015).

As proteínas do soro de leite ainda são conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais tecnológicas como ingredientes em inúmeros produtos alimentícios (ALVES et al., 2014). As propriedades funcionais mais importantes das proteínas do soro são a solubilidade, a viscosidade, capacidade de retenção de água, a gelificação, a emulsificação e a capacidade de formação de espuma (ALMÉCIJA et al., 2007). Para Haraguchi, et al., (2006), devido a essas propriedades, as proteínas do soro apresentam extensa aplicação na indústria de alimentos na produção de fórmulas infantis, panificação, embutidos e sorveteria. Na Tabela 2 são apresentadas algumas aplicações do soro de leite na indústria de alimentos e o efeito da sua adição a nível funcional.

**Tabela 2-** Exemplos da aplicação funcional do soro de leite na indústria de alimentos.

<b>Aplicação</b>	<b>Efeito Funcional</b>
Produtos de panificação, sorvetes, molhos e produtos cárneos	Emulsões estáveis
Produtos lácteos (sobremesas e iogurtes)	Gelificação, textura lisa e cremosa
Molhos para saladas e sopas	Retenção de água, aumento de viscosidade, melhoria da textura
Bebidas nutricionais	Melhoria da qualidade nutricional, aumento da viscosidade
Merengue, bolos e produtos de confeitaria	Estabilidade de espuma e melhoria da capacidade de aeração

**Fonte:** Adaptado de Zuñiga et al., (2002).

Além de propriedades nutricionais e funcionais as proteínas do soro podem apresentar propriedades fisiológicas. Estudos indicam que as mesmas possuem várias sequências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo animal, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, anti-hipertensiva, anticoagulante, fatores de crescimento celular, aumento no combate a infecções e processos inflamatórios, ação no sistema cardiovascular, além de outros benefícios (SGARBIERI, 2004; BUTYLINA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013).

## 2.5 PRODUTOS DERIVADOS DO SORO DE LEITE

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

Atualmente existem vários produtos derivados do soro de leite disponíveis comercialmente. Eles são obtidos a partir de processos de fracionamento, principalmente de proteínas, e tem inúmeras funções na alimentação. As frações dos produtos de soro podem ser agrupadas em categorias, de acordo com as características determinadas pelo tipo e grau de processamento aos quais são submetidas. São elas: soro em pó, soro deslactosado, soro desmineralizado, concentrados proteicos de soro (CPS), isolados proteicos de soro (IPS) e lactose. Cada um desses produtos de soro é utilizado com base nas características funcionais

específicas apresentadas por cada um deles (ANTUNES, 2003; LEIDENS, 2013; LEIFELD, 2014). A Tabela 3 apresenta os principais produtos que podem ser obtidos do soro de leite.

**Tabela 3-** Principais produtos derivados do soro de leite.

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

**Fonte:** Adaptado de Baldasso (2008).

O soro em pó pode ser considerado a forma mais popular para o uso em alimentos, o mesmo é obtido através da remoção de aproximadamente 95% da sua umidade, mas todos os constituintes presentes no soro original são mantidos na mesma proporção. Assim o soro pode ser armazenado por um tempo maior, sem danos para suas propriedades nutricionais (ANTUNES, 2003; BALDASSO, 2008).

Algumas limitações nas propriedades do soro seco para uso direto em alimentos, principalmente altas concentrações de lactose e de sais, levaram ao seu fracionamento. O soro em pó deslactosado apresenta teor de lactose inferior a 60 %, enquanto que o soro em pó desmineralizado apresenta teor máximo de minerais de 7 % (MILLER, et al., 2000; DE WIT, 2001). A desmineralização do soro envolve a remoção de minerais e alguns ácidos orgânicos pelos processos de nanofiltração, eletrodialise e troca iônica, sendo a maior parte de sua produção é utilizado em alimentos infantis (DIBLÍKOVÁ et al., 2013). O soro em pó deslactosado é empregado principalmente em queijos processados, carnes industrializadas e em alguns casos em que são desejadas concentrações mais baixas de lactose e mais elevadas de proteínas (CORREIA et al., 2011).

Os concentrados proteicos de soro (CPS) são definidos como sendo o produto obtido pela remoção de constituintes não proteicos do soro de leite, contendo ao menos 25% de

proteínas em base seca. Os CPS disponíveis comercialmente apresentam em geral teores de proteína na faixa de 34 e 90 % mas a sua composição pode variar muito, dependendo do método de manufatura (LUCENA et al., 2007; ALVES et al., 2014). Os isolados proteicos de soro (IPS) são considerados a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contem entre 90 e 95 % de proteína em base seca. As quantidades de gordura e lactose presente são muito pequenas, sendo muitas vezes este é isento desses dois componentes (ANTUNES, 2003). Na indústria alimentar, os CPS e IPS têm uma vasta aplicação, devido à maior especificidade do produto, e o valor funcional e nutricional excelente e seu valor comercial chega a ser de 3 a 40 vezes maior do que o do soro de leite em pó (BALDASSO et al., 2011a).

As operações envolvidas na produção de concentrados e isolados proteicos de soro são principalmente, os processos e separação com membranas, como microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI) associada com a diafiltração (DF). Na UF, por exemplo, o soro pode ser separado em duas frações: o retentado que é utilizado para a produção de CPS em concentrações diferentes e também o IPS; e um permeado que pode ser evaporado posteriormente para produzir lactose em diferentes graus (DE WIT, 2001; YEE et al., 2007).

## 2.6 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Os processos de separação por membranas (PSM) utilizam membranas no fracionamento de misturas, soluções e suspensões baseado nas diferenças de tamanho, afinidade química entre os componentes da mistura e membrana, e na mobilidade destes na matriz da membrana. De modo geral, pode se dizer que os principais objetivos de qualquer PSM são a separação, a concentração e/ou a purificação de componentes presentes em solução, sendo estes alcançados devido à capacidade da membrana de transportar um determinado componente da fase de alimentação mais prontamente que outro componente presente (MULDER, 2000).

Os processos de separação com membranas surgiram na década de 1970, para complementar os processos clássicos de separação como destilação, filtração, absorção, troca iônica, centrifugação, extração por solvente, cristalização entre outros. Esta nova classe de processos passou a utilizar membranas sintéticas como barreira seletiva. Os PSM vêm sendo amplamente utilizados para diferentes aplicações, mas principalmente, como um processo alternativo aos processos de separação convencionais, tais como a destilação, centrifugação e a evaporação (HABERT et al., 2006).

Quando comparados aos diversos processos de separação convencionais usados industrialmente, os PSM apresentam inúmeras vantagens, que incluem o baixo consumo energético visto que a maioria dos processos ocorre à temperatura ambiente, podendo assim ser aplicados no fracionamento de substâncias termolábeis como as proteínas do soro; a possibilidade de operar em sistema contínuo ou em batelada; a alta seletividade da membrana; a simplicidade de operação e escalonamento (HABERT et al., 2006; SAXENA et al., 2009; SANTOS et al., 2014). Devido às inúmeras vantagens apresentadas, os PSM têm sido utilizados nos mais diferentes setores da indústria química, alimentícia e farmacêutica, além da área médica. A Tabela 4 apresenta alguns exemplos do uso dos PSM.

**Tabela 4** - Aplicações do PSM em diversas áreas.

Área	Aplicação
Química	Quebra do azeótropo benzeno/hexano Recuperação de H <sub>2</sub> - síntese da amônia Fracionamento CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub> Fracionamento do ar: gás inerte e de corrente rica em O <sub>2</sub>
Biotecnologia e Farmacêutica	Separação de substâncias termolábeis Desidratação de etano Purificação de enzimas Fracionamento de proteínas Esterilização de meios de fermentação Bioreatores com membranas
Alimentícia e Bebidas	Concentração do leite Concentração do soro de leite Concentração de sucos de frutas Clarificação e desalcoholização de vinhos e cervejas
Tratamento de águas	Dessalinização de águas Eliminação de traços de orgânicos Tratamento de esgotos municipais Desmineralização de águas para caldeiras
Tratamento de Resíduos Industriais	Separação água/óleo Recuperação de íons metálicos - Couro Recuperação de proteínas- Laticínio Tratamento de águas- Papel e celulose

**Fonte:** Adaptado de Habert et al. (2006).

Na área alimentícia as vantagens da tecnologia de separação com membranas no processamento de alimentos incluem condições brandas de processamento, melhoramento de

qualidade, baixo consumo de energia, simultâneo fracionamento e concentração, desmineralização, melhoramento do rendimento e um esquema relativamente simples para implantação em nível industrial. Os fatores limitantes desta tecnologia incluem polarização de concentração, incrustação (*fouling*), pressão osmótica e viscosidade das correntes a serem tratadas (HABERT et al., 2006).

## **2.6.1 Características dos processos de separação por membranas**

### **2.6.1.1 Força motriz e transporte**

Uma membrana pode ser definida como uma interface ou uma barreira semi-seletiva que separa duas fases (alimentação e permeado) restringindo, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas que estão presentes nestas fases. Quando à aplicação de uma força motriz, a corrente de alimentação é separada em duas novas correntes: o permeado (parte da alimentação que passou pela membrana) e o concentrado ou retentado (parte da alimentação que não passou pela membrana) (MULDER, 2000; LE et al., 2014).

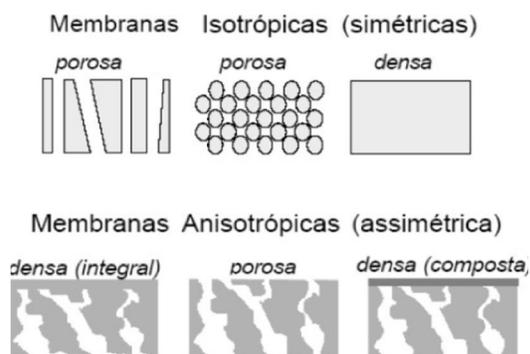
Para que ocorra o transporte de uma espécie através de uma membrana, é necessário que haja uma força motriz agindo sobre esta. Os processos comerciais de separação com membranas empregam como força motriz o gradiente potencial químico ( $\Delta\mu$ ) e/ou o gradiente de potencial eletrostático ( $\Delta E$ ). O gradiente de potencial químico é a força motriz do transporte através das membranas, que pode ser causado por diferenças de pressão, concentração e temperatura entre as duas fases separadas pela membrana, entretanto, como os processos com membranas são, na sua maioria, atérmicos, o gradiente de potencial químico pode ser expresso, apenas, em termos do gradiente de pressão ( $\Delta P$ ) e de concentração ( $\Delta C$ ) (HABERT et al., 2006).

As membranas podem apresentar inúmeras características, podendo ser naturais ou sintéticas, neutras ou carregadas, espessas ou finas, de estrutura homogênea ou heterogênea, com mecanismo de transporte ativo ou passivo, entre outras (HABERT et al., 2006). De acordo com tipo de material utilizado para sua produção, as membranas sintéticas comerciais são classificadas em dois grupos: membranas orgânicas e membranas inorgânicas. As membranas inorgânicas são produzidas com materiais cerâmicos, vítreos e metálicos e são geralmente empregadas em processos industriais sujeitos às condições severas de limpeza e

esterilização. As membranas orgânicas são produzidas com materiais poliméricos sintéticos ou biológicos, sendo estas mais utilizadas comercialmente que as inorgânicas (MULDER, 2000; HABERT et al., 2006).

Com relação à morfologia, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. A membrana é denominada porosa quando o transporte através da mesma ocorre devido à diferença de tamanhos entre as partículas e os poros da membrana. Já as membranas densas não possuem poros e o transporte dos componentes envolve a sorção e a difusão através do material que constitui a membrana. Tanto as membranas densas quanto as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo da sua espessura (HABERT et al., 2006). A Figura 2 apresenta as morfologias mais comuns observadas nas seções transversais de membranas comerciais.

**Figura 2** - Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas.

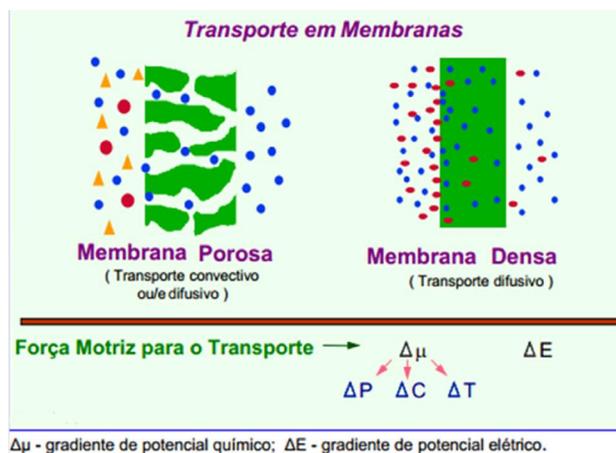


**Fonte:** Adaptado de Habert et al. (2006).

Em função da morfologia da membrana e do tipo de força motriz empregada, o transporte através da membrana pode ocorrer tanto pelo mecanismo de convecção quanto por difusão ou também por ambos (HABERT et al., 2006). Em processos que utilizam membranas porosas o transporte através destas é fundamentalmente convectivo e a separação está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes no meio e o tamanho dos poros da membrana. Nos processos que utilizam membranas densas, o transporte dos componentes é de natureza difusiva e a capacidade seletiva depende da afinidade das espécies com o material da membrana e da difusão das mesmas através do filme polimérico (HABERT et al., 2006; WIBISONO et al., 2014).

A Figura 3 apresenta um esquema ilustrando as relações entre a força motriz e morfologia com o tipo de transporte esperado para cada tipo de membrana.

**Figura 3** - Relação entre força motriz e tipo de transporte em membranas.



**Fonte:** Adaptado de Habert et al. (2006).

#### 2.6.1.2 Geometria de membranas e módulos

As membranas podem ser preparadas tanto na geometria plana quanto na cilíndrica. A partir dessas duas geometrias, diferentes tipos de módulos podem ser construídos (HABERT et al., 2006). As membranas planas se apresentam sob forma de placas de diversas dimensões. Os módulos são constituídos por suportes planos, que comportam uma folha de membrana em cada um dos lados e por espaçadores colocados entre estes suportes. Existem basicamente dois módulos que utilizam membranas planas que são os de placas e quadro e os de cartuchos em espiral (CARVALHO, 2008). Os módulos de membranas cilíndricas dividem-se em dois grupos: módulos tubulares e módulos de fibras ocas. Para cada processo e aplicação, deve-se escolher a configuração mais adequada, sendo por vezes faz-se necessário efetuar ensaios laboratoriais para uma melhor seleção (HABERT et al., 2006).

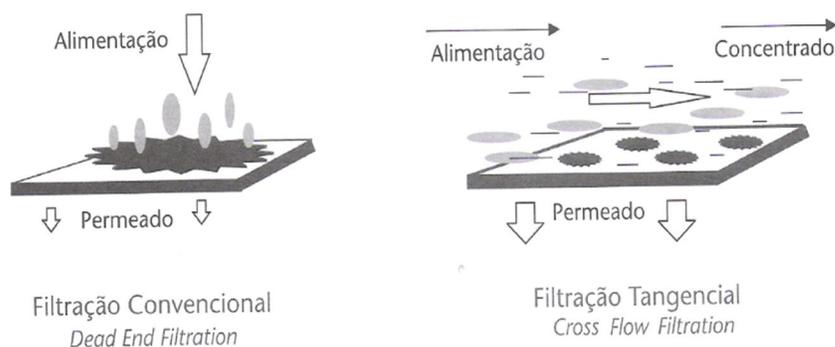
Os principais critérios necessários a serem considerados durante a seleção do módulo de membrana são de custo, a densidade de empacotamento, resistência ao *fouling*, considerações operacionais, características da mistura a ser separada, facilidade de operação, limpeza e manutenção (SHENVI et al., 2015).

### 2.6.1.3 Filtração convencional e em escoamento tangencial

Nos sistemas de PSM, basicamente, duas configurações de escoamento são utilizadas: o modo convencional ou *dead-end* o modo tangencial ou *cross-flow* (MULDER, 2000). Na filtração convencional, o fluxo do fluido é forçado através de toda a parede da membrana sob pressão, a solução de alimentação escoava perpendicularmente à superfície da membrana. A concentração elevada de partículas na região próxima à membrana tende a aumentar em função do tempo ocasionando uma queda do fluxo permeado pelo aumento da resistência à filtração (HABERT et al., 2006; MAESTRI, 2007).

Na filtração tangencial, a solução de alimentação flui paralelamente à membrana, e o fluxo de permeado, perpendicularmente (SAXENA et al., 2009; LE et al., 2014). Deste modo, o escoamento paralelo à membrana limita o acúmulo do material retido sobre a mesma, tornando possível uma operação do sistema em condições de regime estabelecido, proporcionando melhor eficiência ao sistema de filtração além de se obter um fluxo permeado quase constante por um longo período de tempo (HABERT et al., 2006). Esse tipo de sistema de filtração é largamente utilizado em processamento do leite e soro de leite, pois facilita o arraste dos solutos, evitando que estes se acumulem sobre a superfície da membrana (GIACOBBO, 2010; KELLNER, 2014). Na Figura 4 são apresentados esquematicamente os dois modos de operação.

**Figura 4** - Filtração convencional (*dead end filtration*) e filtração em fluxo cruzado ou filtração tangencial (*cross flow filtration*).



**Fonte:** Adaptado de Habert et al.(2006).

#### 2.6.1.4 Fluxo de permeado e seletividade

O PSM pode ser caracterizado em função de dois parâmetros: a) fluxo de permeado; b) capacidade seletiva da membrana, a qual, dependendo do tipo de processo em questão, pode ser definida de diversas formas (HABERT et al., 2006).

O fluxo de permeado representa uma variável crítica para qualquer processo com membranas. Pode ser definido como a vazão (volumétrica, mássica ou molar) de permeado por unidade de área da membrana, ou seja, é o volume da solução alimentada que permeia através da membrana numa determinada área e em um determinado tempo, sendo expressa geralmente em L/m<sup>2</sup>h ou kg/m<sup>2</sup>h (HABERT et al., 2006; SILVA, 2013). O fluxo volumétrico de permeado pode ser calculado segundo a Equação 1:

$$J_p = \frac{V}{A \cdot t} \quad (1)$$

Onde  $J_p$  é o fluxo do permeado em (L/m<sup>2</sup> h);  $A$  é a área permeável da membrana (m<sup>2</sup>);  $V$  é o volume de permeado coletado (L) em função do tempo ( $t$ ) para permeação (h).

O fluxo de permeado depende das propriedades da membrana, das condições de operação tais como a pressão aplicada, velocidade de escoamento tangencial, fator de concentração e também das características da solução a ser filtrada. O mesmo também é fortemente influenciado pela temperatura da solução de alimentação, pois o fluxo é função da viscosidade dinâmica da solução que, por sua vez, é função da temperatura. Assim, quanto maior a temperatura, menor a viscosidade e maior o fluxo de permeado. Outros parâmetros importantes que afetam o fluxo através das membranas são o pH e a força iônica, seu efeito porém varia muito em função da solução de alimentação e da membrana utilizada (HABERT et al., 2006; RAZI et al., 2012).

A seletividade de uma membrana a determinada solução pode ser expressa por dois parâmetros: a retenção/rejeição ( $R$ ) ou o fator de separação ( $\alpha$ ). Para misturas aquosas diluídas, que consistem em um solvente (água, na maioria das vezes) e um soluto, é mais conveniente expressar a seletividade em função da retenção ao soluto. Nestes casos, o soluto é parcialmente, ou totalmente, retido pela membrana, enquanto que as moléculas de solvente passam livremente por ela. O valor de  $R$  varia entre 100% (retenção completa do soluto) e 0% (soluto e solvente atravessam livremente a membrana) (MULDER, 2000).

O Coeficiente de Rejeição (R) pode ser definido por uma relação entre a concentração da espécie na alimentação e sua concentração no permeado. Assim a rejeição observada (R) pode ser estimada pela Equação 2:

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: R é a rejeição observada de solutos pela membrana [%],  $C_a$  é a concentração de soluto na alimentação, e  $C_p$  é a concentração de soluto no permeado.

#### 2.6.1.5 Fator de concentração

Durante a filtração tem-se a rejeição ou seletividade do soluto, o qual retorna para a alimentação com parte do solvente promovendo um aumento da concentração da alimentação com o tempo (BALLANEC et al., 2002). O fator de concentração ( $F_c$ ) indica a relação entre a quantidade de solução/massa concentrada obtida em relação à solução/massa inicial de alimentação, podendo ser determinado através da Equação 3 (MELLO et al., 2010):

$$F_c = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{(V_0 - V_F)} \quad (3)$$

Onde:  $F_c$  é o fator de concentração de uma dada espécie;  $V_0$  é o volume inicial da solução (L);  $V_R$  é o volume do retido (L);  $V_F$  é o volume da solução permeada (L).

#### 2.6.2 Classificação dos PSM

Os PSM podem ser divididos em dois tipos: aqueles que envolvem difusão do solvente (água) e os que envolvem a difusão do soluto. Os primeiros, mais comumente utilizados industrialmente, são denominados de processos de osmose e envolvem a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI); os demais se denominam processos de diálise (D) e envolvem a eletrodialise (ED), a pervaporação (PV) e a permeação gasosa (PG) (MULDER, 2000). A classificação dos principais processos de separação com membranas, as suas principais características, a força motriz empregada e alguns exemplos típicos de aplicação podem ser observados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Características e aplicações dos PSM.

Processo Aplicações	Força Motriz	Material Retido	Material Permeado	Aplicações
Microfiltração (MF)	Gradiente de pressão ( $\Delta P$ ) (0,5 – 2 atm)	Material em suspensão, bactérias Massa molar >500.000g/mol.	Água e sais dissolvidos	Esterilização; Clarificação de vinhos e cervejas; Concentração e células; Oxigenação de sangue
Ultrafiltração (UF) Água, sais	Gradiente de pressão ( $\Delta P$ ) (1 - 7 atm)	Colóides, Macromoléculas. Massa molar > 5.000 g/mol	Água, sais solúveis de baixa massa molecular, açúcares	Fracionamento e concentração de proteínas; Recuperação de pigmentos; Recuperação de óleos
Nanofiltração (NF)	Gradiente de pressão ( $\Delta P$ ) (5 - 20 atm)	Moléculas de massa molecular média entre 500 e 2.000 g/mol	Água, sais e moléculas e baixa massa molecular	Purificação de enzimas; Biorreatores a membrana
Osmose inversa (OI)	Gradiente de pressão ( $\Delta P$ ) (15 – 80 atm)	Todo material solúvel ou em suspensão	Água (Solvente)	Dessalinização de águas; Concentração de suco de frutas; Desmineralização de águas;
Diálise (D)	Gradiente de concentração ( $\Delta C$ )	Moléculas de massa molecular maior que 5.000 g/mol	Íons e orgânicos de baixo peso molecular	Hemodiálise – Rim Artificial; Recuperação de NaOH
Eletrodialise (ED)	Gradiente de potencial elétrico ( $\Delta E$ )	Macromoléculas e compostos não iônicos	Íons	Concentração de soluções salinas; Purificação de águas

**Fonte:** Adaptado de Habert et al. (2006).

Nos processos de osmose, a força motriz é o gradiente de pressão e estes podem ser considerados como uma extensão dos processos de filtração clássica sendo que o diferencial é o tamanho do poro e a pressão necessária para operação. Os processos de MF, UF, NF e OI empregam, nessa sequência, meios filtrantes (membranas) cada vez mais fechados, ou seja, com os poros cada vez menores (no caso da osmose inversa admite-se mesmo a ausência de poros na superfície da membrana). Meios mais “fechados” oferecem maior resistência à transferência de massa. Assim, para que seja possível obter fluxos permeados economicamente viáveis é necessário aumentar a pressão de operação, à medida que é caminhada da MF para OI (HABERT et al., 2006).

### 2.6.2.1 Ultrafiltração (UF)

A UF foi originalmente desenvolvida como uma técnica de fracionamento na década de 1960. Desde então, esta tecnologia vem apresentando um desenvolvimento contínuo, e as suas aplicações já cobriram uma grande variedade de campos que vão desde a recuperação de produtos químicos, tratamento de água, recuperação de águas residuais, concentração de suco, aplicações em laticínios, uso médico entre muitos outros (SHI et al., 2014). A UF é um PSM no qual uma solução contendo macromoléculas é forçada contra uma membrana que permite a passagem do solvente e retém o soluto macromolecular. As membranas de UF apresentam poros na faixa entre 1 a 100 nm, sendo adequadas à concentração de soluções, em pressões inferiores a 10 bar (HABERT et al., 2006; FELLOWS, 2006; BRIÃO & TAVARES, 2012a; LE et al., 2014).

Na maioria das vezes as membranas de UF comerciais são especificadas através da sua massa molar de corte (MWCO), cuja unidade mais utilizada é o Dalton (Da). A MWCO pode ser definida como a massa molar para o qual a membrana apresenta um coeficiente de rejeição igual ou maior que 90%. Assim, uma membrana com retenção nominal de 15 kDa é aquela capaz de rejeitar 90% das moléculas presentes em uma solução de um soluto com massa molar de 15.000 Da (HABERT et al., 2006; SAXENA et al., 2009).

A aplicação comercial mais comum da UF está na indústria de laticínios para a concentração do leite antes da fabricação de derivados lácteos; concentração do soro de leite; fracionamento e purificação de proteínas de soro de leite, enriquecimento de caseína micelar (FELLOWS, 2006; BÁGUENA et al., 2015)

## 2.7 FATORES LIMITANTES DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

O desempenho dos PSM pode variar de forma significativa com o decorrer do tempo, ocasionando uma diminuição do fluxo permeado e mudanças na retenção de solutos. Dois fatores comuns nos processos de separação por membranas podem ocasionar os problemas de *fouling* e polarização por concentração (MULDER, 2000; HABERT et al., 2006) Esses fenômenos dependerão do tipo de membrana e do tipo de solução que será utilizada e ocasionam a adição de resistências ao transporte da alimentação através da membrana (HABERT et al., 2006).

### 2.7.1 Polarização de Concentração

A polarização por concentração surge devido à retenção de solutos e formação de uma camada na interface de membrana com uma elevada concentração de solutos (MACEDO et al., 2011; LE et al., 2014). De acordo com Shi et al. (2014), a mesma é uma consequência natural da semi-permeabilidade e seletividade de uma membrana, o que resulta numa acumulação de solutos ou partículas rejeitadas numa camada limite de transferência de massa adjacente à superfície da membrana. Com o aumento de acúmulo de soluto na superfície da membrana, ocorre o um aumento do 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. Esse fenômeno se estabelece rapidamente, provocando uma queda do fluxo de permeado nos instantes iniciais do processo de filtração (HABERT et al., 2006)

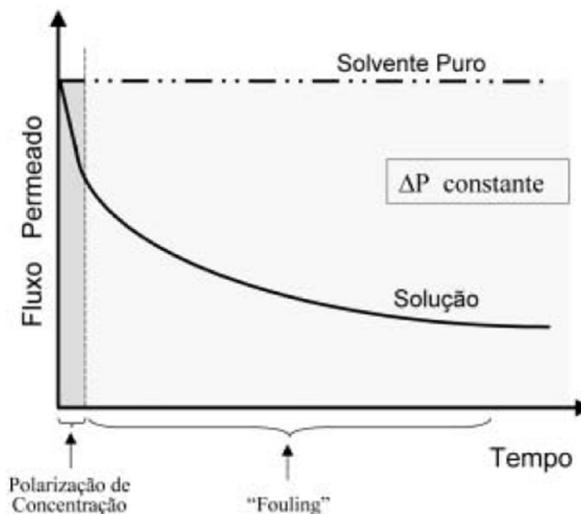
Dentre as principais desvantagens da polarização por concentração, destaca-se o aumento da passagem de soluto através da membrana, a redução do fluxo de permeado devido ao aumento da pressão osmótica na superfície da membrana, o favorecimento de incrustações por deposição, e a precipitação de soluto, caso a concentração exceda o limite de solubilidade da solução (MULDER, 2000).

A polarização por concentração é um processo inevitável, porém reversível, e pode muitas vezes ser minimizada através da alteração dos parâmetros operacionais como velocidade de recirculação, concentração do fluxo de alimentação, pressão transmembrana, temperatura e agitação que podem levar a uma dispersão dos solutos armazenados à superfície da membrana, levando a uma diminuição do gradiente de concentração (CARVALHO, 2008; SHI et al., 2014).

### 2.7.2 Incrustações (*Fouling*)

O desempenho de uma membrana diminui com a polarização por concentração, onde ocorre a redução de fluxo até um valor limite. A queda contínua do fluxo resulta de outro fator, chamado *fouling* que é causado pela deposição e retenção de partículas, coloides, emulsões, suspensões, macromoléculas, sais, entre outros, sob ou no interior dos poros da membrana (MULDER, 2000). Na Figura 5 é demonstrada a influência da polarização de concentração e do *fouling* na redução do fluxo permeado ao longo do tempo.

**Figura 5** - Variação esquemática do fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por polarização de concentração e *fouling*.



**Fonte:** Adaptado de Habert et al. (2006).

Muitas pesquisas distinguem a incrustação como reversível e irreversível, com base na sua resistência relativa à limpeza. Incrustação reversível é o tipo que pode ser removida facilmente com certos métodos de limpeza, enquanto a incrustação irreversível ainda permanece após a limpeza (SHI et al., 2014).

Na UF em específico, a incrustação geralmente surge através de vários mecanismos, incluindo adsorção; bloqueio dos poros ou formação de bolo. Quando as moléculas de soluto são menores ou similares ao tamanho dos poros da membrana, estas moléculas podem penetrar no interior dos poros da membrana, reduzindo o seu raio gradualmente (incrustação por adsorção) ou fazendo com que todo o poro seja completamente bloqueado (bloqueio mecânico do poro). Se as moléculas de soluto são muito maiores do que os poros da membrana, elas são depositadas sobre a superfície externa da membrana formando, em alguns casos, uma camada de bolo que conduz a uma resistência adicional ao fluxo de permeado (SHI et al., 2014; BÁGUENA et al., 2015). A incrustação nas membranas é um fenômeno muito complexo, principalmente quando o fluido é composto de leite ou derivados, sendo as proteínas e os minerais os principais componentes associados às incrustações. Em níveis industriais o *fouling* diminui a produtividade do processo e, conseqüentemente, os custos operacionais em função da formação de depósitos de difícil remoção, de danos permanentes causados à membrana e da necessidade de limpezas frequentes (ANTUNES, 2014; WIBISONO et al., 2014).

## 2.8 APLICAÇÕES DOS PSM NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

Os PSM apresentam uma alternativa ao processamento do leite e do soro de leite, pois podem atuar em diversas aplicações como a remoção de gordura e microrganismos, concentração, purificação e separação das proteínas do soro. Além disso, as várias técnicas de separação por membranas existentes permitem extrair do leite e/ou do soro certos componentes com atividades biológicas, funcionais e nutricionais de grande interesse na área alimentícia (BRANS et al., 2004; BALDASSO et al., 2011a).

Na literatura alguns estudos vêm demonstrando a importância da UF na indústria de laticínios. Pagno et al. (2009), utilizaram o processo de UF associada à diafiltração (DF) para obter CPS e caracterizar suas propriedades funcionais e tecnológicas. Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade de utilizar a UF na obtenção de CPS e a eficiência da DF na purificação das proteínas. De acordo com os autores como o processo não utiliza altas temperaturas as propriedades funcionais e tecnologias das proteínas pouco são afetadas.

Na mesma linha de pesquisa a concentração e purificação de proteínas do soro usando membrana de UF de 10 kDa em associação com o DF alterando o fator de concentração volumétrico também foi estudada por Baldasso et al. (2011a). Os resultados mostraram que a UF é o processo mais adequado para a produção de concentrados proteicos. O experimento com maior fator de concentração volumétrico de 6,0 resultou em uma concentração de proteína de 71% em (base seca) após a DF. De acordo com os autores a DF foi muito eficaz quando realizada com pequenos volumes.

Sluková et al. (2016), avaliaram o potencial do soro como um ingrediente para a produção de massa fermentada, o objetivo era obter um permeado de UF rico em ácidos orgânicos e lactose. Para isso o soro de leite doce foi tratado por UF com membrana cerâmica tubular de 50 kDa seguida de três passos de DF para diminuir os teores de lactose, glicose, galactose, e ácidos orgânicos no concentrado. Os permeados UF foram tratados por nanofiltração em membrana espiral a fim de concentrar componentes importantes para a qualidade da massa fermentada, tais como ácidos orgânicos e açúcares. Os resultados mostraram elevada recuperação de proteínas (81 %) durante a UF e redução de lactose usando DF. A rejeição de componentes pela membrana de nanofiltração foi de: 93 % de lactose, 77 % de galactose e 76 % ácido láctico.

Svanborg et al. (2014), estudaram os efeitos de pasteurização inicial sobre o fracionamento de proteínas do leite desnatado por microfiltração (MF) utilizando membranas cerâmicas de 0,2 mm. A partir da análise química das frações obtidas após a MF, verificaram

que o permeado obtido do leite não pasteurizado apresentou quantidades mais elevadas de proteínas, cálcio, fósforo, além de uma menor quantidade de caseína que o leite pasteurizado, enquanto que o concentrado que foi obtido a partir de MF do leite não pasteurizado continha menor teor de proteína total e caseína.

Palatnik et al. (2015), investigaram a recuperação de proteínas de soro leite caprino. Um processo de membrana incluindo MF seguida de UF com membrana de 10 kDa e escoamento tangencial foi utilizada para purificar e concentrar proteína, atingindo após 30 min de processo para o permeado e concentrado teores de proteína de  $0,23 \pm 0,04$  e  $2,68 \pm 0,04$  (g/100g), respectivamente. O concentrado foi liofilizado e caracterizado apresentando boas características emulsificantes sendo apropriado para a aplicação em formulações que requerem a geleificação.

Baldasso et al. (2011b), avaliaram a eficiência de duas membranas de MF (uma plana e outra espiral) com tamanho de poro de  $0,1\mu\text{m}$ , para obter duas frações, uma rica em  $\beta$ -lactoglobulina e outra rica em  $\alpha$ -lactalbumina a partir de um concentrado proteico de soro de leite. Com a membrana plana obteve-se um retido com 78 % de proteínas sendo que esta mostrou-se permeável a ambas as proteínas. A retenção de proteína com a membrana espiral foi de 65%, no qual a  $\alpha$ -lactalbumina permeou preferencialmente pelo sistema.

## 2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O soro é um subproduto da indústria de laticínios gerado durante a produção de todo e qualquer tipo de queijo, é considerado um produto nobre rico em nutrientes, principalmente lactose e proteínas estas com alta qualidade biológica, nutricional e funcional. Apesar de ser uma fonte de proteínas e lactose de baixo custo, o soro ainda é muitas vezes considerado como um efluente industrial, sendo ainda grandes volumes enviados para nutrição de suínos, ou direcionados a sistemas de tratamento de efluentes com baixa eficiência ou altos custos, assim, desperdiçando enormes quantidades de nutrientes, que podem ter diversas aplicações na indústria alimentícia e demais áreas.

Tendo em vista que o soro apresenta grande potencial para aplicação em alimentos, torna-se atrativo o incentivo a novas tecnologias e estudos que permitam o seu aproveitamento. Dentre as tecnologias para o processamento do soro, os processos de separação com membranas têm ganhado espaço na indústria conforme os diversos estudos citados anteriormente, sendo ultrafiltração (UF) uma técnica que vem ganhando destaque,

pois permite uma variação na relação de concentração entre os vários componentes do soro de leite, devido à retenção seletiva de proteína e outros materiais coloidais, com permeação de constituintes como lactose, sais minerais e outros compostos com menor massa molar da membrana utilizada.

Após as considerações apresentadas, verifica-se a importância do estudo visando a criação de alternativas para minimizar os desperdícios e o mau aproveitamento do soro de leite. Além disso, a relevância de se avaliar as melhores condições de operação para ultrafiltração do soro a fim de aperfeiçoar os processos, visando também à recuperação de nutrientes de interesse.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item são apresentados os materiais, equipamentos e metodologias empregadas no processo de ultrafiltração (UF) em escala laboratorial, bem como a descrição dos métodos analíticos utilizados na análise das amostras de concentrados e permeados obtidos do processo de UF, e também do soro de leite *in-natura*.

#### 3.1 COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

O soro de leite utilizado neste estudo foi gentilmente fornecido pela Indústria Relat Laticínios Renner de Estação – RS o qual recebe o mesmo de diversas queijarias distribuídas na região Sul. O soro leite foi transportado em recipientes plásticos de 5 L em caixas térmicas até o laboratório de tecnologia de leites e derivados da URI– Erechim, onde foi transferido para garrafas plásticas com capacidade de 0,3 L, e armazenado em câmara fria à temperatura de -18 °C. A cada ensaio uma amostra de 0,3 L era descongelada a temperatura ambiente sob água corrente, homogeneizada e filtrada em peneira com tamanho de poro de  $\pm 1$  mm para a retirada de partículas em suspensão sendo posteriormente submetido ao processo de UF.

#### 3.2 PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

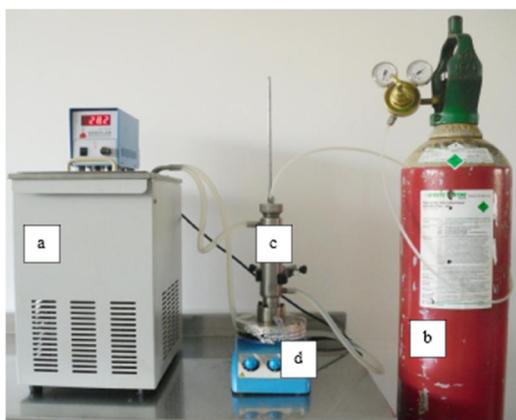
Para a concentração de soro de leite foram realizados dois planejamentos de experimentos empregando membrana de UF, de 100 kDa, avaliando os efeitos das variáveis temperatura e pressão em relação aos fluxos e composição (proteína, sólidos totais, condutividade elétrica, pH, acidez, lactose e minerais totais) dos concentrados e permeados. Na condição maximizada da UF com membrana de 100 kDa também foram realizados experimentos de UF utilizando membrana de 50 kDa.

##### 3.2.1 Aparato experimental

As Figuras 6 e 7 apresentam respectivamente o sistema de UF e o esquema do módulo de UF utilizado nos experimentos em escala laboratorial. O sistema era composto por: (a) Banho ultratermostato (Servilab, SE- 100AG) utilizado para manter a temperatura constante do sistema, através do encamisamento do módulo da membrana, nas temperaturas definidas experimentalmente; (b) Cilindro de nitrogênio (N<sub>2</sub> analítico 5.0- White Martins) de 25 Kg

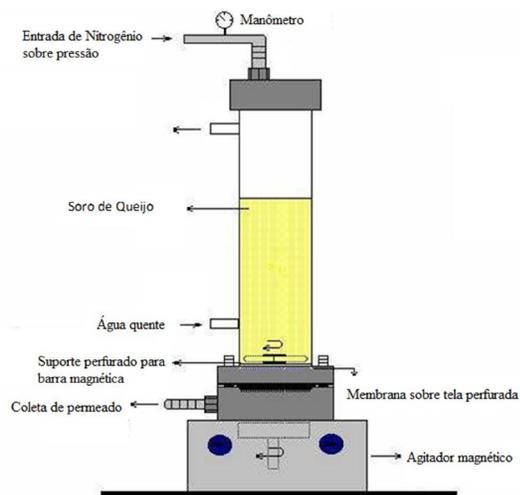
com a função de pressurizar o sistema; (c) Módulo de separação com membrana - Ultrafiltração, (um sistema em batelada, com escoamento convencional e com volume de 200 mL, de aço, dividido em 3 sessões: a inferior era composta pela base e com um suporte perfurado para a membrana, na qual, era acoplado à parte central por 2 anéis de vedação e 4 parafusos para promover vedação necessária ao sistema, onde foi fechado com a parte superior que possuía mais um anel de vedação com uma conexão para fazer a alimentação do sistema com o gás nitrogênio; (d) Agitador magnético (ARE Heating Magnetic Stirrer- Velp científica) para manter o sistema sob agitação.

**Figura 6** – Vista geral da unidade de UF em escala laboratorial: a) banho ultratermostato, b) cilindro de nitrogênio, c) módulo com membrana e d) agitador magnético.



**Fonte:** O autor.

**Figura 7** - Esquema do módulo com membrana plana detalhada.



**Fonte:** Adaptado de Petrus, (1998).

Na Tabela 6 apresentam-se as especificações das membranas planas de UF (100 e 50 kDa) utilizadas nos ensaios.

**Tabela 6-** Especificações das membranas de UF utilizadas nos experimentos.

MWCO <sup>a</sup>	Material	Faixa de pH	Fluxo de água (L/m <sup>2</sup> h) <sup>b</sup>	Pressão (bar)	Fabricante
100 kDa	Polisulfona amida	1-10	298,85	1,38	GE- Osmonics (Sepa MW)
50 kDa	Polietersulfona	0-14	>250	3,0	Microdyn-Nadir GmbH

a - MWCO: massa molar de corte; b- Conforme especificações do fabricante.

As membranas foram cortadas em discos no formato do suporte, com área de permeação de 0,001134 m<sup>2</sup> de forma que coubessem exatamente no sistema. Antes de iniciar os testes, as membranas de 100 kDa precisaram ser condicionadas devido ao fato de serem enviadas pelo fabricante no estado seco, para que a mesma não perde-se o fluxo permeado indicado. O condicionamento foi feito por imersão das membranas em etanol (Vetec 99,8 %) por 12 h e posteriormente por 2h em água mili-Q.

As membranas de 50 kDa não foram condicionadas antes do uso, visto que em testes preliminares foi verificado que o condicionamento fez com que o soro passasse direto pela mesma.

### 3.2.2 Estudo do efeito da temperatura e pressão na UF: planejamento de experimentos

Para estudo do efeito da temperatura e pressão de alimentação sob o fluxo de permeado e sob a concentração do soro de leite na membrana de 100 kDa, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos que é uma ferramenta estatística que permite determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar possíveis interações entre variáveis de um processo.

Primeiramente foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (planejamento 1), com temperaturas e pressões variando na faixa de 20 a 40°C e 1 a 3 bar respectivamente, e mantendo-se fixos o volume alimentação (200 mL). As variáveis independentes de estudo e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 7.

**Tabela 7** - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (planejamento 1).

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>		
		<i>-1</i>	<i>0**</i>	<i>+1</i>
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	20	30	40
Pressão (bar)	X <sub>2</sub>	1,0	2,0	3,0

\*Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL);\*\* Triplicata do ponto central.

Os níveis das variáveis apresentados na Tabela 7 foram definidos com base na literatura e nos limites técnicos do equipamento de UF. Trabalhos realizados na mesma linha de pesquisa definiram faixas de temperatura entre 20 a 50°C para UF de soro de leite (ATRA et al., 2005; BALDASSO et al., 2011a; SERPA, 2012, LEIDENS, 2013; BARUKCIC et al., 2014). A faixa de pressão utilizada no planejamento foi limitada em decorrência de o módulo de UF não estabilizar em pressões maiores que 3 bar.

Em função dos resultados obtidos no planejamento 1 realizou-se um novo planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (Tabela 8), denominado planejamento 2. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura (5 a 15°C) e pressão (1 à 3 bar). Os níveis de temperatura deste novo estudo foram definidos com base em uma indústria processadora de soro de leite por processos de membranas (Relat - Laticínios Renner S.A) e a faixa de pressão permaneceu a mesma em função das limitações técnicas do equipamento.

**Tabela 8** - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (planejamento 2).

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>		
		<i>-1</i>	<i>0**</i>	<i>+1</i>
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	5	10	15
Pressão (bar)	X <sub>2</sub>	1,0	2,0	3,0

\*Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL); \*\* Triplicata do ponto central.

As variáveis dependentes deste estudo para os dois planejamentos foram o fluxo de permeado de água e do soro de leite, conteúdo proteico total, quantidade de sólidos, condutividade elétrica, acidez, pH, lactose e os minerais totais nos concentrados e permeados.

Da condição maximizada com a membrana de 100 kDa também foram realizados experimentos com a membrana de 50 kDa, no qual foram avaliados fluxo de permeado de soro e composição das frações de permeado e concentrado obtidas.

### 3.2.3 Procedimento experimental

Para a membrana de 100 kDa, inicialmente, os ensaios de UF foram realizados com água destilada para verificar o fluxo de permeado e o comportamento das membranas e posteriormente com o soro de leite de acordo com matriz de cada planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Após a montagem e ajuste do sistema de UF alimentou-se a unidade com o volume inicial de 200 mL de amostra, submetido agitação em agitador magnético (Velp Científica) para evitar incrustações na superfície da membrana. Com o módulo montado, conectava-se no mesmo as mangueiras do banho ultratermostato, uma de entrada e outra de saída para manter a temperatura desejada no sistema e também o gás nitrogênio na parte superior, controlando por um manômetro a pressão requerida em cada experimento. A partir do momento que obtinha-se permeado, mantinha-se a estabilização do sistema por 5 min. Posteriormente a estabilização, o sistema foi operado por 10 min para água e por 90 min para o soro, sendo coletadas amostras periodicamente, a cada min para água, e 10 min para o soro, para o cálculo de fluxo. Ressalta-se que em cada ensaio era empregada um novo disco de membrana (cortado). Para a membrana de 50 kDa foram realizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente, entretanto apenas foi avaliado o comportamento da mesma para o soro de leite, sendo o experimento realizado em triplicata.

Após cada ensaio, o sistema de UF era higienizado com água a 45°C e detergente neutro, seguido de sucessivas lavagens com água destilada e etanol (70%) e empregava-se uma nova membrana. Ressalta-se, que as membranas não foram reutilizadas devido à grande incrustação do soro, sendo inviável a utilização de solventes e métodos de lavagem.

### 3.2.4 Fluxo de Permeado Resistência das Membranas e Rejeição

As medidas de fluxo permeado foram realizadas a partir da medida do volume de permeado coletado em uma proveta durante um tempo fixo. O fluxo permeado ( $J_p$ ) foi calculado pelo volume de permeado (L) em relação à área de permeação (m<sup>2</sup>) e o tempo de permeação (h) através da Equação (1). Tendo em vista que as membranas de UF apresentam uma distribuição de tamanho de poros elas podem reter de maneira distinta, solutos de pesos moleculares diferentes. Neste sentido, torna-se interessante o estudo da resistência da membrana. A resistência da membrana ( $R_m$ ) para a água e resistência de permeação ( $R_t$ ) para os soro foi determinada por meio da lei de Darcy (Equação 4) para a membrana de 100 kDa, nos níveis superiores dos planejamentos (planejamento 1: 40°C e 3 bar e planejamento 2:

15°C e 3 bar). A viscosidade do soro de leite *in natura* nas temperaturas de (15 e 40 °C), foi determinada utilizando um viscosímetro rotacional, (Marca Brookfield - PROGRAMMABLE DV-III + Rheometer). Os dados de viscosidade da água nas temperaturas de (15 e 40°C) foram retirados de Shames (1995).

$$Jm = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_{(m)(t)}} \quad (4)$$

Onde o  $Jm$  é o fluxo médio de permeado (L/m<sup>2</sup>h);  $\Delta P$ , é a pressão aplicada (Pa);  $Rm$  e  $Rt$  representam a resistência da membrana e de permeação respectivamente (m<sup>-1</sup>), e  $\mu$  é a viscosidade dinâmica da solução de alimentação (Pa.s).

O coeficiente de rejeição foi calculado para proteína, sólidos totais, lactose e minerais pela relação entre a concentração da espécie na alimentação e a sua concentração média no permeado através da Equação 2.

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: R é a rejeição observada de solutos pela membrana [%],  $C_a$  é a concentração de soluto na alimentação, e  $C_p$  é a concentração de soluto no permeado.

### 3.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

A caracterização do soro de leite *in natura* e das frações dos concentrados e dos permeados obtidos dos processos da UF foram analisadas conforme descrito nos procedimentos a seguir. As medidas de pH acidez e condutividade elétrica foram realizadas imediatamente após o processo de UF, para as demais análises as frações foram congeladas a -18 °C por um período máximo de 15 dias, sendo descongeladas a temperatura ambiente sob água corrente.

#### 3.3.1 Proteína total

O nitrogênio total nas amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl, segundo metodologia nº 920.123 da AOAC (2005). O método de Kjeldahl consta de três etapas distintas: - Digestão da amostra, em sistema digestor Kjeldahl (VELP), empregando ácido sulfúrico e pastilha catalisadora (3,5 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 3,5 mg de Se, FOSS); - Destilação em sistema com destilador Kjeldahl (VELP – UDK 126 A), empregando solução de ácido bórico a 4 % com indicador misto como solução receptora da amônia destilada; - Titulação do borato

de amônia formado com solução de HCl 0,1 N. Na quantificação da proteína foi empregado o teor de nitrogênio multiplicando-se pelo fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,38.

#### 3.3.1.1 Frações das proteínas - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese é uma técnica de controle de pureza, onde as moléculas são separadas de acordo com seu tamanho forma ou carga. As proteínas migram por ação de um campo elétrico, sendo esta migração diferente para cada proteína. A eletroforese foi realizada no soro *in natura* submetido à UF com membrana de 50 kDa e nas frações de concentrado e permeado obtidos após o processo de acordo com metodologia descrita por Laemmli (1970). O protocolo detalhado da técnica é descrito no Apêndice A1.

### 3.3.2 Sólidos totais

Os sólidos totais das amostras foram determinados por método gravimétrico em estufa de recirculação (Fanem – modelo 320 - SE) a 105°C por aproximadamente 4 h e/ou até peso constante, empregando areia do mar para facilitar a transferência de calor, segundo metodologia descrita por IAL (2005).

### 3.3.3 Condutividade elétrica

A medida da condutividade elétrica é essencial para determinar a presença de substâncias com carga em amostras líquidas. Soluções inorgânicas conduzem melhor a corrente elétrica do que substâncias orgânicas. Assim a medida da condutividade elétrica é uma medida indireta da concentração de íons na solução. As medidas de condutividade elétrica foram realizadas em condutivímetro (RS 232-METER 8306), realizando-se leituras diretamente nas amostras.

### 3.3.4 Acidez total

A acidez total foi determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença do indicador fenolftaleína, segundo método AOAC (2005). O resultado foi expresso em °Dornic.

### 3.3.5 pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, segundo metodologia nº 4022 descrita pela AOAC (2005), utilizando-se pHmetro (Digimed DM-22), realizando-se leituras diretamente na amostra. O equipamento foi previamente calibrado com soluções padrões de pH 4,0; 6,86; 9,0 e 10,01, conforme instruções do fabricante.

### 3.3.6 Lactose

A determinação da concentração de lactose foi realizada segundo metodologia descrita por Miller (1959) pelo método de DNS (3,5-dinitro salicilato). Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria com espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, modelo 8453E) a 570 nm e para quantificação utilizou-se uma curva padrão de lactose cuja concentração varia no intervalo de 0,5 a 5,0 g/L. O protocolo detalhado da técnica é descrito no Apêndice A2.

### 3.3.7 Minerais Totais

O conteúdo de minerais totais (teor de cinzas) foi determinado conforme metodologia descrita por IAL (2005). Inicialmente, as amostras (~4 g) foram evaporadas, pré-carbonizadas em chapa elétrica e posteriormente incineradas em mufla (Quimis) a 550°C por aproximadamente 8 h (aspecto das cinzas). A quantificação foi realizada pelo método gravimétrico.

## 3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Nos ensaios dos planejamentos de experimentos foram realizadas triplicatas do ponto central e nas determinações analíticas triplicatas de análises. Os resultados foram tratados estatisticamente mediante metodologia de planejamento de experimentos e também mediante análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey e/ou *t student*, com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, ao nível de significância de 95 % de confiança.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente item tem por objetivo apresentar e discutir os resultados obtidos no decorrer deste trabalho. Para uma melhor compreensão, primeiramente são apresentados os resultados da caracterização dos lotes de soro de leite *in-natura* obtidos para a realização dos procedimentos de UF com membrana de 100 kDa. Em seguida, os resultados dos fluxos e resistências das membranas e caracterização das frações obtidas para os planejamentos 1 e 2. Posteriormente, os resultados obtidos para a membranas de 50 kDa, da condição maximizada do planejamento 2.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE *IN NATURA*

Na Tabela 9 é apresentada a caracterização média do soro de leite *in natura* utilizado nos planejamentos de experimentos para a membrana de 100 kDa em comparação com informações da literatura (Macedo et al. 2015; Smithers, 2015) de características de soro doce e ácido.

**Tabela 9** - Caracterização média do soro de leite utilizado neste estudo e caracterização do soro doce e ácido de acordo com a literatura.

Componentes	Soro de leite deste estudo*	Soro doce**	Soro ácido**'
Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	5,71 $\pm$ 0,37	-	-
Sólidos Totais (%)	5,60 $\pm$ 0,11	6,0-7,0	6,6
Lactose (%)	4,66 $\pm$ 0,20	4,2-5,0	4,9
Proteína (%)	0,91 $\pm$ 0,02	0,7-0,9	0,75
Minerais (%)	0,6 $\pm$ 0,02	0,5-0,6	0,8

**Fonte:** \* O autor

\*\*Adaptado de Macedo et al., (2015);\*\*' Smithers (2015).

De acordo com. Carvalho et al., (2013) Smithers (2015) e Macedo et al. (2015), o soro de leite ácido apresenta um pH menor que 5,1 enquanto que o soro de leite doce apresenta pH mais elevados acima de 5,6. Os lotes de soro de leite utilizados neste estudo apresentaram pH médio de 6,49 ( $\pm$ 0,04) e acidez média em ( $^{\circ}\text{D}$ ) de 12,20 ( $\pm$ 0,52) podendo dessa forma com base na literatura ser classificado como soro doce. Valores próximos aos encontrados em nosso estudo foram também obtidos na literatura. Román et al.(2011), obtiveram valores de proteína, sólidos totais e lactose de 0,54 %, 5,77 % e 4,26 % para o soro bovino doce, respectivamente. Já Bald et al. (2014), encontraram para o soro de leite doce proveniente da

fabricação de queijo tipo mussarela um teor de 0,86 % de proteínas; 4,8 % de lactose, 0,52 % de minerais totais, e 5,65 % de sólidos totais, enquanto que Smithers (2015), cita valores de sólidos totais, lactose, proteína e minerais totais de respectivamente, 6,3 %; 4,9 %; 0,75 % e 0,5 %.

Ressalta-se que o soro de leite pode apresentar composição variada em função de fatores que interferem na composição do leite e do soro, tais como espécie, raça, idade, fase de lactação e alimentação do animal, sazonalidade e clima, assim como tratamento térmico empregado no leite e o processo de fabricação do queijo.

## 4.2 PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

### 4.2.1 Efeitos da pressão e temperatura sob os fluxos de água e de soro de leite em UF de 100 kDa

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores codificados e reais) – Planejamento 1 e respostas do fluxo de permeado médio ( $L/m^2h$ ) para água e soro de leite, obtidos do processo de UF com membrana plana de 100 kDa.

**Tabela 10** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) - Planejamento 2 e resposta em termos de fluxo de permeado médio ( $L/m^2h$ ) para água e soro de leite, obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Fluxo de permeado ( $L/m^2h$ )	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Água	Soro de leite
1	20 (-1)	1,0 (-1)	120,33	15,41
2	40 (1)	1,0 (-1)	165,68	18,17
3	20 (-1)	3,0 (1)	389,05	23,35
4	40 (1)	3,0 (1)	431,92	24,82
5	30 (0)	2,0 (0)	440,39	22,17
6	30 (0)	2,0 (0)	433,51	22,29
7	30 (0)	2,0 (0)	443,57	22,53

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL).

Os resultados obtidos para fluxo médio de água apresentaram uma expressiva queda em relação aos fluxos de soro de leite que no caso específico do ensaio 4 reduziu de 431,92  $L/m^2h$  (operando com água), para 24,82  $L/m^2h$  (operando com soro de leite). Para a água os fluxos médios mais elevados foram verificados no ponto central (ensaio 5, 6 e 7) os quais operaram a 30°C e 2 bar, enquanto que para o do soro o fluxo mais elevado de 24,82  $L/m^2h$ ,

foi obtido a 40°C e 3 bar (ensaio 4) e o mais baixo foi de 15,41 L/m<sup>2</sup>h a 1 bar e 20°C (ensaio 1).

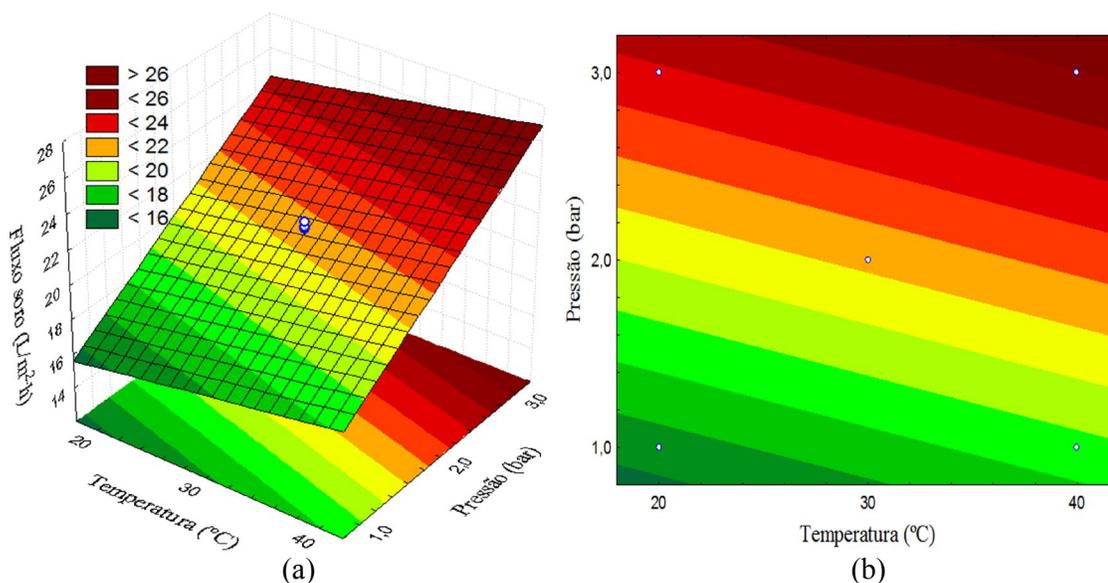
Os resultados apresentados na Tabela 10 foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta em fluxo de permeado de soro de leite. A pressão e temperatura exerceram influência significativa positiva ( $p < 0,05$ ) sobre o fluxo médio de soro de leite, dentro da faixa estudada (Tabela 1B- Apêndice B). Os efeitos que não foram significativos ( $p < 0,05$ ) foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância - ANOVA (Tabela 2B – Apêndice B).

A Equação 5 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o fluxo médio de soro de leite (L/m<sup>2</sup>h) em função da pressão e temperatura, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância com um coeficiente de correlação de 0,95 e um F calculado 2,51 vezes superior ao F tabelado, o qual permitiu também a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 8.

$$\text{FMS} = 21,25 + 1,05X_1 + 3,65 X_2 \quad (5)$$

Onde o FMS é o fluxo médio de soro de leite (L/m<sup>2</sup>h),  $X_1$  é a temperatura (°C) e  $X_2$  é a Pressão (bar).

**Figura 8** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o fluxo médio de soro de leite (L/ m<sup>2</sup>h), obtidos do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - planejamento 1.



De acordo com a Figura 8 (a) e (b), maiores fluxos médios de soro de leite foram obtidos a pressões mais elevadas acima de 2,5 bar e temperaturas superiores a 30°C. Este efeito é esperado uma vez que a pressão é a força motriz do processo e o aumento da temperatura diminui a viscosidade da solução, aumenta a difusividade do soluto e taxa de transporte de solutos, facilitando a passagem desta pela membrana. Embora há uma indicação de que aumentando a temperatura tem-se maior fluxo, foi verificado um acréscimo de acidez e uma diminuição do teor de lactose no concentrado (Tabelas 19 e 23 respectivamente).

Baseado nesses resultados um novo planejamento foi conduzido com níveis de temperaturas menores (5, 10 e 15°C) e os resultados de fluxos do planejamento 2 UF com membrana plana de 100 kDa são apresentados na Tabela 11. Os maiores fluxos tanto para a água (434,04 L/m<sup>2</sup> h), quanto para o soro (18,73 L/m<sup>2</sup> h) foram obtidos no ensaio 4 operado a pressão e temperatura máximas do planejamento (15°C e 3 bar).

**Tabela 11** - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados)- Planejamento 2 e resposta em termos de fluxo de permeado médio (L/m<sup>2</sup>h) para água e soro de leite, obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Fluxo de permeado (L/m <sup>2</sup> h)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Água	Soro de leite
1	5 (-1)	1,0 (-1)	114,86	14,17
2	15 (1)	1,0 (-1)	170,97	15,53
3	5 (-1)	3,0 (1)	392,22	17,53
4	15 (1)	3,0 (1)	434,04	18,73
5	10 (0)	2,0 (0)	226,02	17,70
6	10 (0)	2,0 (0)	230,78	17,73
7	10 (0)	2,0 (0)	222,84	17,76

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL).

Ao comparar-se o fluxo médio de soro de leite obtido no planejamento 2, o maior fluxo foi de 18,73 L/ m<sup>2</sup> h operado a 3 bar e 15°C, já no planejamento 1 foi de 24,82L/ m<sup>2</sup> h obtido a 3 bar e 40°C, demonstrando uma redução de fluxo de aproximadamente 25%. O menor fluxo observado possui relação com a viscosidade do soro de leite, visto que a temperatura de 15°C obteve se uma viscosidade de 2,07x10<sup>-3</sup> superior a obtida a 40°C (1,79 x 10<sup>-3</sup>). Metsämuuronen e Nyström (2009), enfatizam que em temperaturas mais elevadas tem-se menores viscosidades da solução de alimentação, no entanto ocorre arraste de uma maior quantidade de solutos em direção da membrana acelerando a incrustação desta, justificando assim a baixa redução de fluxo observado a temperatura 15°C quando comparado ao processo operado a 40°C.

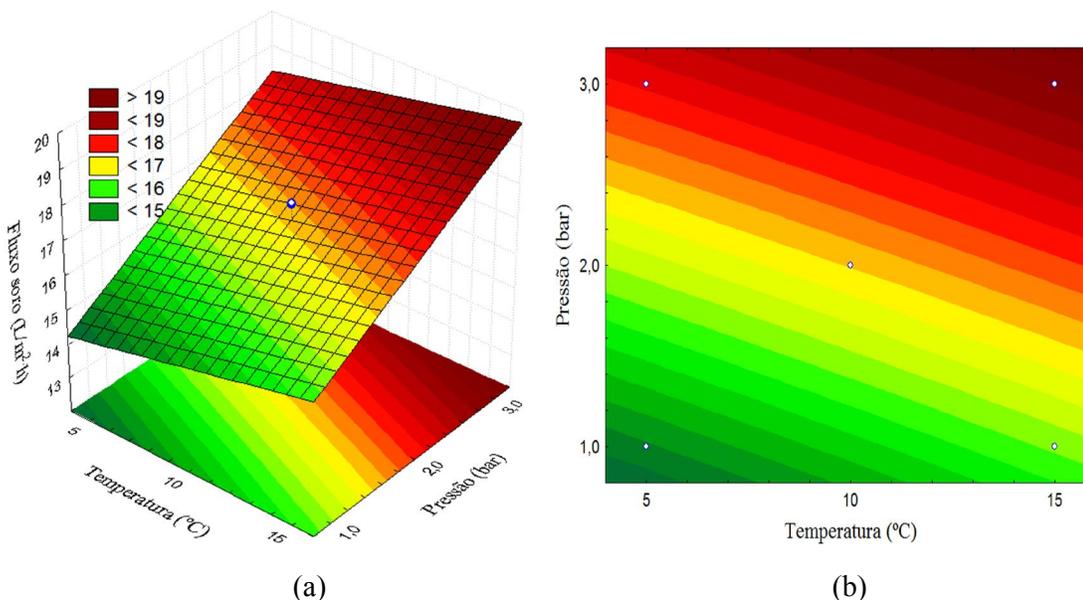
Os resultados apresentados referentes ao fluxo médio de soro foram tratados estatisticamente (Tabela 3B - Apêndice B). As variáveis pressão e temperatura exerceram influência significativa ( $p < 0,05$ ) positiva dentro da faixa estudada. Os efeitos que não foram significativos ( $p < 0,05$ ) foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância - ANOVA (Tabela 4B - Apêndice B).

A Equação 6 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o fluxo médio de soro de leite ( $L/m^2h$ ) em função das variáveis analisadas (temperatura e pressão). O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 4B - Apêndice B), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,91 e um F calculado 1,35 vezes maior que o F tabelado, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 9.

$$FMS = 17,02 + 0,64X_1 + 1,64 X_2 \quad (6)$$

Onde o FMS é o Fluxo médio de soro de leite ( $L/m^2h$ ),  $X_1$  é a temperatura ( $^{\circ}C$ ) e  $X_2$  é a Pressão (bar).

**Figura 9** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o fluxo médio de soro de leite ( $L/m^2h$ ), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$ - Planejamento 2.



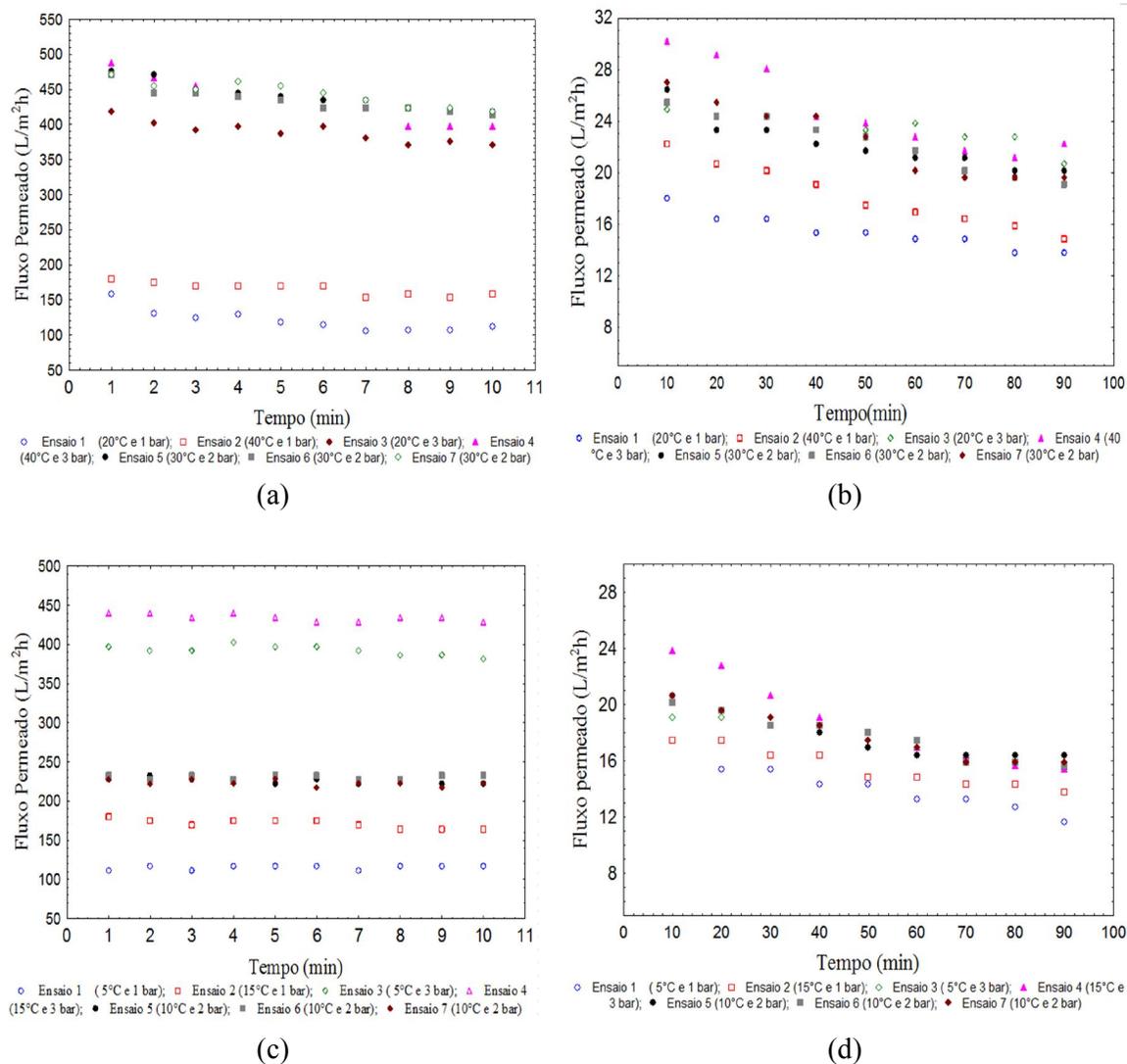
Pode se observar através da Figura 9 (a) e (b), que esta apresenta o mesmo comportamento verificado na Figura 8, onde os maiores fluxos médios de permeado de soro

foram obtidos em pressões e temperaturas mais elevadas, sendo recomendadas faixa de pressões superiores a 2 bar e temperaturas acima de 10°C. Estas condições de temperatura parecem ser mais adequadas, uma vez que não foi verificado acidificação dos concentrados obtidos (Tabela 20). Para Steinhauer et al. (2015b), o crescimento de bactérias mesófilas ou de deterioração da flora só pode ser evitada na gama de temperaturas abaixo de 20°C ou acima de 50°C. Em estudo sobre a micro e ultrafiltração de soro de leite ácido e doce das temperaturas de 10 a 50 °C, estes concluíram que para o processamento higiênico tanto do soro de leite doce e ácido por longo períodos, uma temperatura  $\leq 10^\circ\text{C}$  parece ser mais adequada. Liu et al. (2014), e Crowley et al. (2015), afirmam ainda, que temperaturas baixas de filtração podem apresentar benefícios adicionais reduzindo a desnaturação de proteínas do soro, a incrustação na membrana causada por fosfatos de cálcio, além de reduzir o crescimento de bactérias termófilas. No entanto, as temperaturas mais baixas reduzem difusividade, e, portanto o coeficiente de transferência de massa, resultando em velocidades de fluxo inferiores a UF realizada a temperaturas mais elevadas, independentemente do tamanho dos poros da membrana.

Embora as superfícies de resposta indiquem que os maiores fluxos permeados são obtidos em pressões de 3 bar é necessário cautela ao definir a pressão de operação. Para este sistema foi observado que para o soro de leite pressões mais elevadas intensificaram os fenômenos de polarização por concentração e entupimento da membrana ocasionando fluxos permeados semelhantes aos obtidos a pressões de 2 bar, assim a pressão de 2 °bar parece ser mais indicada para ultrafiltração do soro neste sistema.

O comportamento dos fluxos de permeado em função do tempo foi acompanhado ao longo de 10 minutos para água pura e ao longo de 90 minutos para o soro de leite. A Figura 10 apresenta o comportamento do fluxo em função do tempo para a água (a e c) e para o soro de leite ( b e d), respectivamente.

**Figura 10** - Fluxos permeados de água (“a” e “c”) e do soro de leite (“b” e “d”) em função do tempo, para membrana de 100 kDa dos planejamentos 1 e 2, respectivamente.



Observa-se na Figura 10a e 10c que os fluxos de permeados para água apresentaram perfil praticamente estacionário ao longo do tempo em todos os ensaios, sendo este comportamento já esperado uma vez que o fluido utilizado (água deionizada) é livre de contaminantes (material suspenso e dissolvido) que são responsáveis pela polarização por concentração e *fouling*. Para o planejamento 1 (Figura 10a) é possível observar que o fluxo de permeado de água aumenta consideravelmente com o aumento de pressão de 1 bar (ensaios 1 e 2) para 2 bar (ensaios 5; 6 e 7), entretanto nota-se que não existe diferença expressiva entre os fluxos obtidos para os ensaios que operaram a 3 bar (ensaios 3 e 4) aos que operaram a 2 bar (ensaios 5; 6 e 7). A pouca diferença verificada entre os ensaios que operaram a pressões de 2 e 3 bar deve-se possivelmente ao fato que nessas condições, a pressão de 3 bar

houve a compactação da membrana, no qual o efeito da pressão sobre a espessura da membrana comprimiu-a ocasionando a diminuição do tamanho dos poros e, conseqüentemente levando a um aumento na resistência hidráulica e uma diminuição na taxa de permeação. Para Habert et al., (2006) a compactação além de ser em função da pressão aplicada depende das características estruturais da membrana incluindo o tipo de polímero utilizado. Esse mesmo efeito de compactação para água foi também observado em estudos realizados por Atra et al. (2005); Baldasso et al. (2011a). Para o planejamento 2 (Figura 10c) o fluxo permeado de água apresentou um comportamento linear tanto para pressão como para temperatura, sendo que à medida que se tem o aumento de ambos ocorreu um aumento do fluxo de permeação.

Quanto aos fluxos de soro de leite em função no tempo Figura (10b) e (10d) é possível observar que em todos os ensaios ocorreu uma queda do fluxo de permeado ao longo do tempo de operação do processo, essa queda de fluxo operação, deve-se principalmente aos fenômenos de polarização de concentração e *fouling*. Este fato já era esperado uma vez que os componentes do soro, principalmente as proteínas são retidas e se acumulam na superfície da membrana formando uma barreira. Para Steinhauer et al. (2015a), a principal desvantagem da concentração de proteína de soro de leite por meio de UF é entupimento da membrana, sendo que as proteínas do soro, principalmente a  $\beta$ -lactoglobulina é a responsável pela diminuição do fluxo de permeado. Perfil semelhante para UF de soro de leite foi também evidenciado por Almécija et al. (2007); Baldasso et al. (2011a); Serpa (2012) e Leidens (2013). Outro fator que pode ocasionar a diminuição do fluxo é o tipo de escoamento (convencional) uma vez que neste tipo de escoamento tem-se se uma maior concentração de partículas na região próxima à membrana com o decorrer do tempo, ocasionando uma queda maior do fluxo permeado em função do aumento da resistência à filtração.

Crowley et al. (2015), investigaram a filtração de leite desnatado com membranas poliméricas a temperaturas de refrigeração ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ) usando duas membranas de microfiltração de polivinilideno-difluoreto com tamanho de poro de  $0,1 \mu\text{m}$  e  $0,45 \mu\text{m}$ , e uma membrana de ultrafiltração de polietersulfona de 1000 kDa. Foi observado uma diminuição de fluxo de permeado durante a filtração com as três membranas testadas, provavelmente devido a uma combinação de polarização de concentração e incrustação gradual, sendo que o fluxo inicial mais elevado foi obtido com a membrana de polietersulfona de 1000 kDa. De acordo com os autores, os materiais da membrana podem ter uma influência acentuada no desempenho da filtração do leite desnatado a temperaturas de refrigeração.

Observa-se ainda que para o fluxo permeado de soro Figura 10b e 10d, que os ensaios 1 e 2 que operaram a pressão de 1 bar apresentaram fluxo menor que os demais ensaios, não havendo grande diferença entre os ensaios 3 e 4 aos ensaios 5 6 e 7 que operaram as pressões de 3 e 2 bar respectivamente. Possivelmente para este processo na pressão de 2 bar encontra-se o fluxo limite, o qual é atingido quando o aumento da pressão no sistema não influencia mais no aumento do fluxo de forma significativa tornando o fluxo praticamente constante independente do aumento da pressão. De acordo com Atrá et al. (2005), o fluxo torna-se independente da pressão, pois as moléculas de proteínas se depositam na superfície da membrana, formando uma camada gel, causando os fenômenos de *fouling* e polarização por concentração, e essa camada causa uma resistência adicional ao fluxo de permeado. Além disso, membranas com poros mais abertos apresentam fluxos mais elevados havendo maior polarização por concentração e por conseguinte, a região independente da pressão ocorre a pressões mais baixas. Comportamento de fluxo limite foi também evidenciado para UF de soro de leite em estudos realizados por Almécija et al. (2009); Baldasso et al. (2011a); Macedo et al. (2011) e também para UF de leite ovino e bovino por Catarino et al. (2013) e Atrá et al. (2005), respectivamente.

Os ensaios com pressões e temperaturas máximas 40°C e 3 bar e 15°C e 3 bar apresentaram maior fluxo permeado inicial porém uma queda de fluxo mais acentuada ao longo do tempo de operação. Neste caso, a maior pressão associada à temperatura mais elevada fez com que uma maior quantidade de soluto chegasse à superfície da membrana intensificando os fenômenos de polarização por concentração e *fouling*. Esta observação esta de acordo com Brans (2006) e Metsämuuronen e Nyström (2009), os quais afirmam que um aumento de pressão acarreta em um aumento inicial do fluxo, entretanto a mesma acelera a formação de incrustações prejudicando dessa forma operações de longa duração. Além disso, temperaturas mais altas reduzem a viscosidade do soro, aumentando a velocidade com que o fluido é direcionado do seio da solução em direção à membrana, aumentando dessa forma a sua permeação inicial e conseqüentemente o arraste de solutos em direção à membrana, acelerando a polarização de concentração (STEINHAUER et al., 2015b).

Brião e Tavares (2012b), avaliaram o processo de UF para a recuperação de sólidos do leite proveniente de águas residuárias de laticínios utilizando membrana tubular polivinilideno (PVDF) de 80 kDa membrana espiral de polietersulfona (PES) de 5 kDa. Duas variáveis independentes (pressão e velocidade de fluxo cruzado), com três níveis diferentes ( $3^2$ ) foram aplicados a cada uma das membranas. Segundo os autores para a membrana de 80 kDa no início da filtração, pressões mais elevadas aumentaram o fluxo. No entanto, como o passar do

tempo, a pressão também aumentou incrustação, aumentando a resistência e reduzindo assim o fluxo.

O menor fluxo observado para o soro em relação à água (Figura 10) justifica-se pela presença de sólidos na corrente de alimentação, criando uma camada polarizada na superfície da membrana e/ou bloqueando poros. Para Arguello et al. (2002), quando há presença de solutos na alimentação é inevitável que ocorra a redução de fluxo de permeação, em função dos efeitos como polarização por concentração e incrustações. Butylina et al. (2006); Chollangi e Hossan (2007); Baldasso et al. (2011a), Macedo et al. (2015), em UF de soro de leite também observaram um fluxo menor para o soro em comparação a água. Para esses autores as possíveis causas para os fluxos inferiores incluem interações entre a membrana e solução, efeitos de difusividade de massa e, principalmente, a viscosidade mais elevada ( $\mu$ ) da solução. Ainda de acordo com Baldasso et al. (2011a) o fluxo de permeado de soro de leite menor do que o fluxo de água mostra que o efeito da concentração de polarização é bastante significativa para o soro de leite e este efeito tende a se agravar à medida que o soro é concentrado.

Barukcic et al. (2014), utilizando membranas cerâmicas com poros de 0,1, 0,5 e 0,8 nm, a temperaturas de 20, 40 e 50°C para a microfiltração do soro de leite doce constatou fluxos mais elevados de permeado a temperatura de filtração a 50°C em todos os tamanhos de poros investigados. Entretanto para Steinhauer et al. (2015b), a temperatura deve ser usada com cautela. Os mesmos avaliaram a influencia da temperatura (10 a 50°C) sobre o desempenho de UF de soro de leite e sua relação com a incrustação na membrana. Os autores observaram que a temperaturas iguais ou superiores a 35°C o fluxo diminuiu significativamente com o tempo de processo, segundo os mesmos, os resultados obtidos indicam claramente que a incrustação da membrana aumentou acima de 30°C, apesar do fato da viscosidade diminuir. Os autores concluíram que a transformação industrial do soro de leite a temperaturas de filtração acima de 40°C pode ser desvantajoso uma vez que foi observado declínio contínuo do fluxo a temperaturas superiores.

#### 4.2.1.1 Cálculo da resistência de permeação

A redução do fluxo é o resultado do aumento na resistência de permeação pelo bloqueio dos poros e a formação de uma camada de torta sobre sua superfície. O bloqueio de poro faz com que a resistência de permeação aumente, enquanto que a formação de torta cria uma camada adicional de resistência ao fluxo permeado. Esse processo reduz a taxa de

produção de permeado, aumentando a complexidade da operação de filtração por membranas (ABDELRASOUL et al., 2013).

A resistência da membrana e de permeação foi calculada para filtração com água e soro de leite respectivamente nas condições extremas dos dois planejamentos trabalhados, ou seja, temperaturas de 15 e 40°C e pressão de 300000 Pa (equivalente a 3 bar). A Tabela 12 apresenta a viscosidade dinâmica da água obtida de acordo com Shames (1995) e a viscosidade do soro obtida experimentalmente a 15 e 40°C, bem como as resistências calculadas.

**Tabela 12** - Viscosidade da água e do soro de leite em diferentes temperaturas e a resistência obtida nas condições extremas de cada planejamento.

Temperatura (°C)	Viscosidade Água (Pa.s)*	Viscosidade Soro (Pa.s)	Resistência para água ( $m^{-1}$ )	Resistência para o soro ( $m^{-1}$ )
15	$1,14 \times 10^{-3}$	$2,07 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^6$	$2,77 \times 10^7$
40	$6,53 \times 10^{-4}$	$1,79 \times 10^{-3}$	$3,83 \times 10^6$	$2,43 \times 10^7$

\*Fonte: Shames (1995).

Pode se observar que em uma mesma temperatura a viscosidade dinâmica do soro é superior do que a da água. Isso se deve ao fato de que o soro apresenta solutos altamente polares dissolvidos em sua composição, o que faz aumentar as forças intermoleculares e as coesivas, aumentando dessa forma a viscosidade. Com relação à resistência da membrana, observa-se que para o soro de leite, tem-se uma menor resistência a temperatura de 40°C do que a 15°C, devido a uma menor viscosidade do soro. De acordo com Strathmann (2001) o efeito da temperatura decorre da redução ocasionada na viscosidade do fluido e na mobilidade das moléculas, ou seja, na difusividade da solução.

A resistência da membrana para UF utilizando soro de leite a 40°C apresentou um valor  $2,43 \times 10^7 m^{-1}$  cerca de 6,34 vezes superior a obtida para água pura que foi de  $3,83 \times 10^6 m^{-1}$ . Enquanto que na temperatura de 15°C a resistência para o soro foi de 12,70 vezes superior a encontrada para a água. A maior resistência verificada para o soro de leite em relação à água em ambas as temperaturas é dada em função dos sólidos presentes na solução que dificultam a sua passagem pela membrana, além disso, a viscosidade do soro é bem superior a da água, dificultando sua passagem pela membrana. Racoski et al., (2014) investigando a resistência de uma membrana de UF de 100 kDa para água e leite semidesnatado, verificaram que a resistência da membrana pra o leite foi de 7 vezes maior que a água devido aos sólidos presentes no leite.

## 4.2.2 Efeitos da pressão e temperatura sob os constituintes dos concentrados e permeados em UF de 100 kDa

### 4.2.2.1 Proteínas

A Tabela 13 apresenta a matriz planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) – Planejamento 1 e a resposta da proteína (g/100 mL) e coeficiente de rejeição, obtidos após o processo de UF com membrana plana de 100 kDa.

**Tabela 13** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) - Planejamento 1 e resposta em termos de proteína total (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente de rejeição (%) obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Proteína** (g/100 mL)		Coeficiente de Rejeição (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados	
1	20 (-1)	1,0 (-1)	1,05 <sup>a</sup> (±0,05)	0,20 <sup>b</sup> (±0,02)	78,02
2	40 (1)	1,0 (-1)	1,03 <sup>a</sup> (±0,03)	0,32 <sup>b</sup> (±0,01)	64,84
3	20 (-1)	3,0 (1)	1,13 <sup>a</sup> (±0,01)	0,41 <sup>b</sup> (±0,05)	54,95
4	40 (1)	3,0 (1)	1,11 <sup>a</sup> (±0,02)	0,33 <sup>b</sup> (±0,02)	63,74
5	30 (0)	2,0 (0)	1,11 <sup>a</sup> (±0,02)	0,45 <sup>b</sup> (±0,02)	50,55
6	30 (0)	2,0 (0)	1,09 <sup>a</sup> (±0,04)	0,47 <sup>b</sup> (±0,03)	48,35
7	30 (0)	2,0 (0)	1,07 <sup>a</sup> (±0,02)	0,43 <sup>b</sup> (±0,02)	52,75

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem a nível de 5% (Teste de t student) para os concentrados e permeados. Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

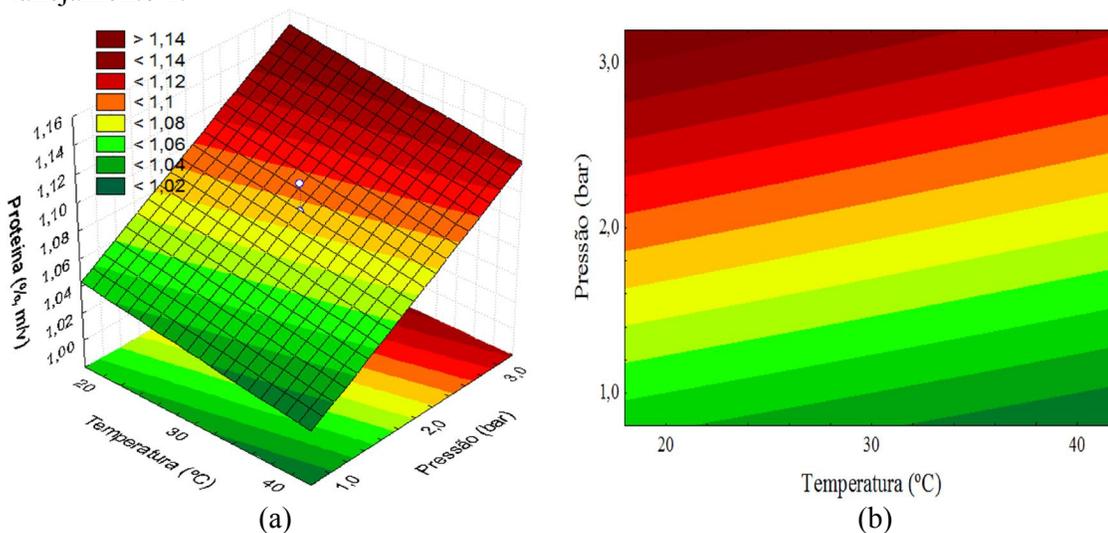
Os resultados de proteína para os concentrados variaram de 1,03 a 1,13 g/100 mL sendo que o maior percentual de proteína foi observado a 3 bar e 20°C (ensaio 3). A maior concentração de proteínas em pressões mais elevadas deve-se possivelmente ao fato do processo ser operado em forma de batelada. Dessa forma, como já verificado para os resultados de fluxo em uma maior pressão tem-se um maior fluxo e conseqüentemente um maior fator de concentração do soro já que todos os ensaios utilizaram o mesmo tempo de processo (90 min). Em termos de permeado, no processo de UF de soro de leite deseja-se que permeie o mínimo possível de proteína, sendo menor percentual foi de 0,20 g/100 mL a 20°C e 1 bar (ensaio 1). A maior rejeição da membrana observada foi de 78 % (ensaio 1) à 20°C e 1 bar.

Para os concentrados os resultados foram tratados estatisticamente (Tabela 5B, Apêndice B) e a Equação 7 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o teor de proteína em função da variável pressão, dentro da faixa estudada, onde observa-se que a variável pressão exerceu influência significativa positiva ( $p < 0,05$ ) sobre a concentração da proteína do soro de leite dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela Análise Variância (Tabela 6B, Apêndice B), onde o coeficiente de correlação obtido foi de 0,91 e o F calculado foi de 3,77 vezes superior ao F tabelado, o qual permitiu também a construção de superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 11.

$$PTc = 1,083 + 0,043X_2 \quad (7)$$

Onde o PTc é proteína total do concentrado (g/100 mL) e  $X_2$  é a pressão (bar).

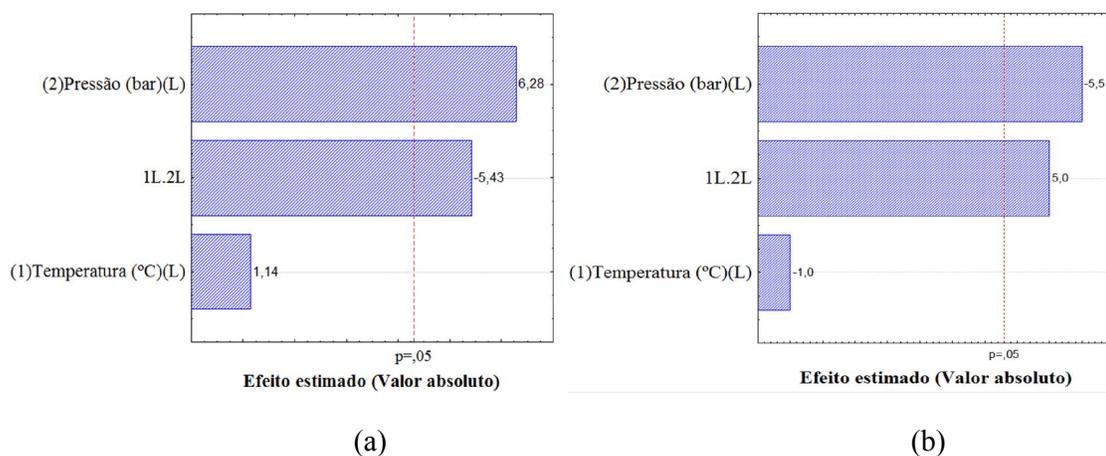
**Figura 11** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o teor de proteína total % (m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$ -Planejamento 1.



De acordo com a Figura 11 (a) e (b) observa-se que as maiores concentrações de proteína foram obtidas em pressões mais elevadas acima de 2,5 bar, e uma ampla faixa de temperatura, porém com uma tendência de diminuição à medida que aumenta-se a temperatura. Baseado nestes resultados e também em função da acidificação do concentrado em temperaturas maiores, um novo planejamento (Tabela 14) com temperaturas na faixa de 5 a 15°C foi realizado. Zuñiga et al. (2004), ressaltam que temperaturas elevadas podem provocar a desnaturação da  $\beta$ -Lg e polimerização irreversível ou um significativo aumento na susceptibilidade de degradação desta proteína.

Para do permeados os resultados podem ser melhores visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 12a), onde apresenta-se os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^2$ - Planejamento 1. Observa-se que o teor de proteínas foi influenciado significativamente ( $p < 0,05$ ) pela interação temperatura e pressão com efeito negativo. Enquanto que a variável independente pressão exerceu influencia significativa positiva ( $p < 0,05$ ), ou seja, à medida que se aumenta a pressão tem se um aumento no teor de proteínas no permeado. O efeito positivo da pressão pode ser explicado possivelmente em função de que maiores pressões exercem maior força sob a membrana arrastando um maior teor de solutos incluindo as proteínas.

**Figura 12** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para proteína (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 1.



Para a rejeição, os dados foram tratados estisticamente sendo possível observar através do gráfico de pareto (Figura 12b) que a variável pressão exerceu influência significativa negativa ( $p < 0,05$ ), enquanto que interação pressão e temperatura exerceu influência significativa positiva ( $p < 0,05$ ). O efeito negativo da pressão justifica-se em função de que pressões mais elevadas arrastaram uma maior quantidade de proteínas para a fração permeada ocasionando dessa forma menor retenção.

A Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados)- Planejamento 2 e a resposta em termos de proteína (g/100 mL) e coeficiente de rejeição (%) obtidas após o processo de UF com membrana plana de 100 kDa.

**Tabela 14** - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) - Planejamento 2 e resposta em termos de proteína total (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente de rejeição(%) obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Proteína** (g/100 mL)		Coeficiente de Rejeição (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados	
1	5 (-1)	1,0 (-1)	1,03 <sup>a</sup> (±0,03)	0,27 <sup>b</sup> (±0,06)	70,33
2	15 (1)	1,0 (-1)	1,01 <sup>a</sup> (±0,07)	0,32 <sup>b</sup> (±0,01)	64,84
3	5 (-1)	3,0 (1)	1,34 <sup>a</sup> (±0,03)	0,30 <sup>b</sup> (±0,03)	67,03
4	15 (1)	3,0 (1)	1,35 <sup>a</sup> (±0,03)	0,32 <sup>b</sup> (±0,01)	64,84
5	10 (0)	2,0 (0)	1,07 <sup>a</sup> (±0,02)	0,25 <sup>b</sup> (±0,01)	72,53
6	10 (0)	2,0 (0)	1,07 <sup>a</sup> (±0,03)	0,27 <sup>b</sup> (±0,03)	70,33
7	10 (0)	2,0 (0)	1,09 <sup>a</sup> (±0,01)	0,26 <sup>b</sup> (±0,03)	71,43

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student) para os concentrados e permeados. Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

De acordo com a Tabela 14, é possível verificar, que como esperado os valores de proteína obtidos para os permeados mostraram-se inferiores ao dos concentrados diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em todos os ensaios. A maior concentração de proteínas foi de 1,35 g/100 mL a 3 bar e 15°C (ensaio 4) e nos permeados, os teores de proteínas não ultrapassam 0,32 g/100 mL, variando entre 0,25 a 0,32 g/100 mL.

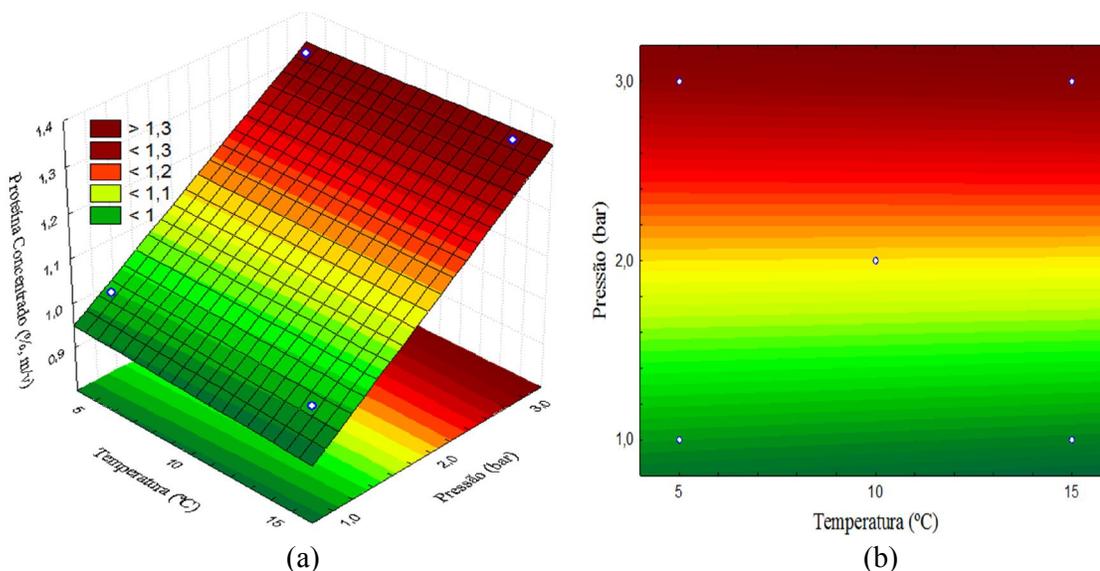
Para o planejamento 2, obteve-se uma rejeição média de 70,3 %. A maior rejeição de 72,53 % (ensaio 5) dá-se possivelmente devido as menores viscosidades do soro nestas temperaturas (5 à 15°C) o que dificultam a passagem deste soluto para a fração permeada, isto associado também aos fenômenos de polarização por concentração e *fouling*.

Os resultados apresentados referentes à proteína dos concentrados foram tratados estatisticamente (Tabela 7B - Apêndice B), sendo que a variável pressão exerceu influência significativa ( $p < 0,05$ ) positiva, dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 8B – Apêndice B), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,92 e o F calculado de 4,33 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a construção de superfície de resposta e de curva de contorno apresentadas na Figura 13. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA.

$$PTc = 1,133 + 0,165X_2 \quad (8)$$

Onde o PTc é proteína total do concentrado (g/100 mL) e X<sub>2</sub> é a pressão (bar).

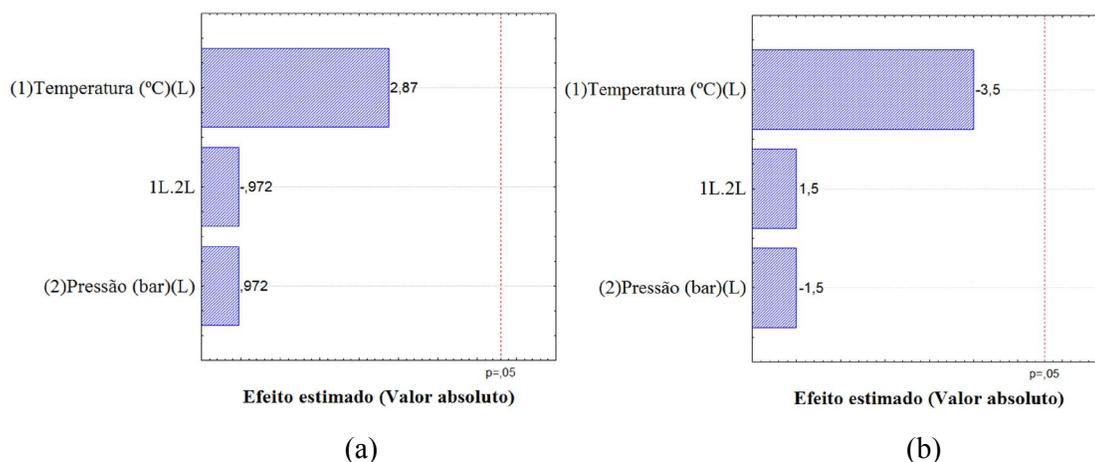
**Figura 13** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o teor de proteína total (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos no planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2.



De acordo com a Figura 13 (a-b) as maiores concentrações de proteína foram obtidas em pressões acima de 2,5 bar e uma ampla faixa de temperatura (5 a 15°C). Assim, se os limites de pressão forem aumentados, possivelmente haverá um aumento do teor de proteínas para este processo. No entanto os limites de pressão não foram deslocados para níveis superiores, em função das limitações técnicas do equipamento e para evitar problemas de fluxo limite (como relatado anteriormente).

Em relação a proteína dos permeados e a rejeição, verificou-se que não houve influencia significativa ( $p < 0,05$ ) das variáveis estudadas Figura 14a e 14b, respectivamente.

**Figura 14** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para proteína (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2.



Existem poucos trabalhos na literatura que estudam os efeitos da UF à temperaturas na faixa de 5° a 15 °C. Crowley et al. (2015), utilizando uma membrana de UF de polietersulfona com massa molar de corte de 1000 kDa para a filtração tangencial de leite desnatado a temperaturas de refrigeração ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ), verificaram um aumento dos níveis de proteína e sólidos na fração concentrada e a permeação de uma quantidade limitada de proteína para o permeado após 80 min de processo, comportamento este, também verificado no presente estudo operado nas temperatura de 5 à 15°C. A recuperação de proteínas de soro de leite caprino por microfiltração seguida de ultrafiltração utilizando uma membrana de 10 kDa, fluxo tangencial e temperatura de  $11 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e pressão de 420 KPa foi estudada Palatnik et al. (2015), os autores obtiveram após 30 min de processo para o permeado e concentrado teores de proteína de  $0,23 \pm 0,04$  e  $2,68 \pm 0,04$  (g/100g), respectivamente.

Na literatura raros são os trabalhos que trazem informações sobre a utilização de membranas planas de 100 kDa no processamento de soro de leite. Galanakis et al. (2014), investigaram a separação e recuperação de proteínas e açúcares de soro de leite doce obtido do processo de fabricação do queijo Halloumi com um módulo de UF de fluxo cruzado e três membranas comerciais (100, 50, 20 kDa), de acordo com os autores a retenção de proteína foi bastante elevado para todas as membranas testadas, não havendo diferença significativa para o coeficiente de retenção entre as três membranas estudadas nas condições testadas no estudo.

Apesar da membrana utilizada de 100 kDa possuir MWCO superior a boa parte das proteínas presentes no soro de leite, os resultados encontrados para proteína indicam que a mesma pode ser uma boa alternativa para a concentração de proteínas. Serpa (2012), utilizando membrana de 50 kDa em configuração fibra oca para UF do soro de leite obteve valores de proteína total para o concentrado entre 0,80 a 1,28 % e de permeado 0,36 à 0,59 %, quando utilizou variações de pressão e temperatura respectivamente de 1,0 a 3,7  $\text{kgf/cm}^2$  e 25 a 52°C, resultados estes semelhantes aos encontrados nesse estudo o qual utilizou membranas com o dobro do tamanho de poro. Além disso, os valores de retenção obtidos para proteína para esse autor foram em torno de 36 %, valor este inferior aos obtidos no presente estudo. Para Habert et al.(2006), a baixa concentração de soluto na corrente de alimentação, sua fraca interação com a membrana, elevado número de *Reynolds* e baixos fluxos de permeação, são os principais fatores que contribuem para obtenção de bons resultados de rejeição parcial de compostos na corrente concentrada.

Arunkumar e Etzel (2015), afirmam ainda que na prática industrial para a produção de concentrados de proteína de soro de leite é comum a utilização de membranas de UF com um MWCO de 10 kDa a 20 kDa, entretanto o uso de membranas deste tipo apresenta limitações

como baixa permeabilidade hidráulica e baixo rendimento volumétrico devido aos poros serem menores. Os autores avaliaram a eficiência do uso de membranas com poros mais abertos 100 kDa carregadas negativamente em comparação a uma membrana de 10 kDa não modificada para a concentração das proteínas do soro de leite. Foi verificado que a membrana de 100 kDa carregada negativamente apresentou a mesma recuperação de proteína que a membrana de 10 kDa não modificada, porém com um fluxo pelo menos 2 vezes maior.

#### 4.2.2.2 Sólidos totais

A Tabela 15 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados)-Planejamento 1 e a resposta dos sólidos totais (g/100 mL) para os concentrados e permeados e coeficiente de rejeição (%) obtidos após o processo de UF com membrana plana de 100 kDa.

**Tabela 15** - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados)-Planejamento 1 e resposta em termos de sólidos totais (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente de rejeição (%) obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Sólidos Totais** (g/100 mL)		Coeficiente de Rejeição (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados	
1	20 (-1)	1,0 (-1)	5,65 <sup>a</sup> (±0,35)	4,18 <sup>b</sup> (±0,17)	25,36
2	40 (1)	1,0 (-1)	5,59 <sup>a</sup> (±0,06)	4,50 <sup>b</sup> (±0,10)	19,64
3	20 (-1)	3,0 (1)	6,37 <sup>a</sup> (±0,04)	4,71 <sup>b</sup> (±0,03)	15,89
4	40 (1)	3,0 (1)	6,80 <sup>a</sup> (±0,53)	4,99 <sup>b</sup> (±0,04)	10,89
5	30 (0)	2,0 (0)	6,10 <sup>a</sup> (±0,09)	4,20 <sup>b</sup> (±0,08)	25,00
6	30 (0)	2,0 (0)	6,07 <sup>a</sup> (±0,02)	4,29 <sup>b</sup> (±0,04)	23,39
7	30 (0)	2,0 (0)	6,08 <sup>a</sup> (±0,17)	4,25 <sup>b</sup> (±0,07)	24,11

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student) para concentrados e permeados. Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

Observa-se que os teores de sólidos totais apresentaram-se superiores em todos os ensaios (p<0.05) nos concentrados em relação aos permeados evidenciando que a membrana de 100 kDa pode ser utilizada na concentração dos componentes do soro de leite. Os teores de sólidos totais para os concentrados situaram-se entre 5,59 a 6,80 g/100 mL. Nos permeados o menor teor de sólidos pode ser evidenciado no ensaio 1 em 20°C e 1 bar. Quanto a rejeição de

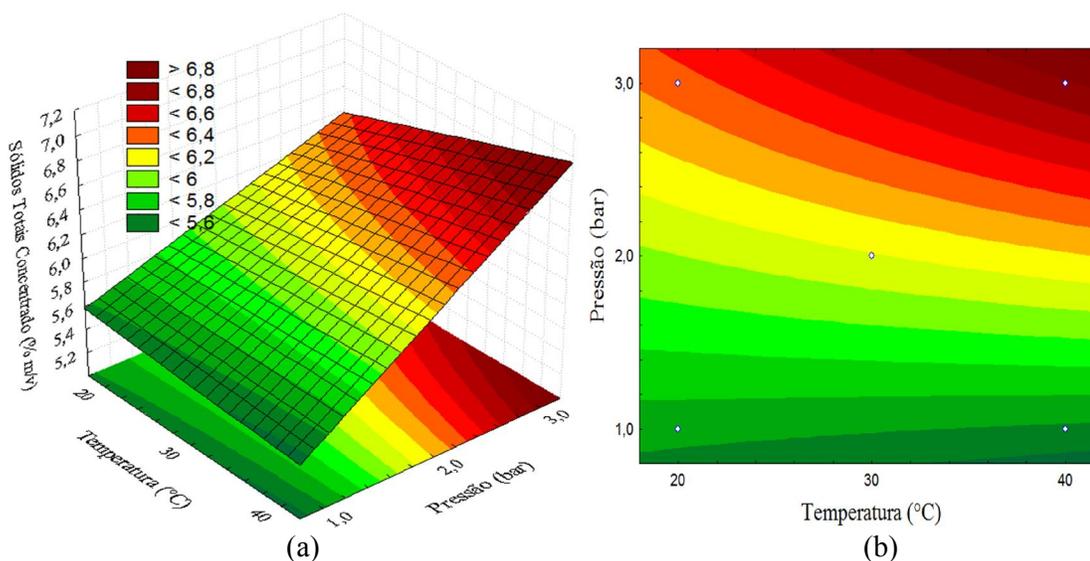
sólidos (%) os valores variaram entre 10,89 a 25,36%, sendo a menor retenção observada no ensaio 4 a 40°C e 3 bar.

Os resultados apresentados referentes o teor de sólidos totais dos concentrados foram tratados estatisticamente (Tabela 9B - Apêndice B) para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre o teor de sólidos. A Equação 9 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o teor de sólidos totais nos concentrados em função da pressão, temperatura, e interação, os quais exerceram influência significativa ( $p < 0,05$ ) positiva, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela Análise Variância, (Tabela 10B, Apêndice B), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,99 e o F calculado 74,98 vezes superior ao F tabelado, os quais permitiram também a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 15.

$$STc = 6,09 + 0,094X_1 + 0,481X_2 + 0,123X_1 \cdot X_2 \quad (9)$$

Onde o STc é o teor de sólidos totais do concentrado (g/100 mL),  $X_1$  é a temperatura (°C) e  $X_2$  e a pressão (bar).

**Figura 15** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para os sólidos totais (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$ - Planejamento 1.

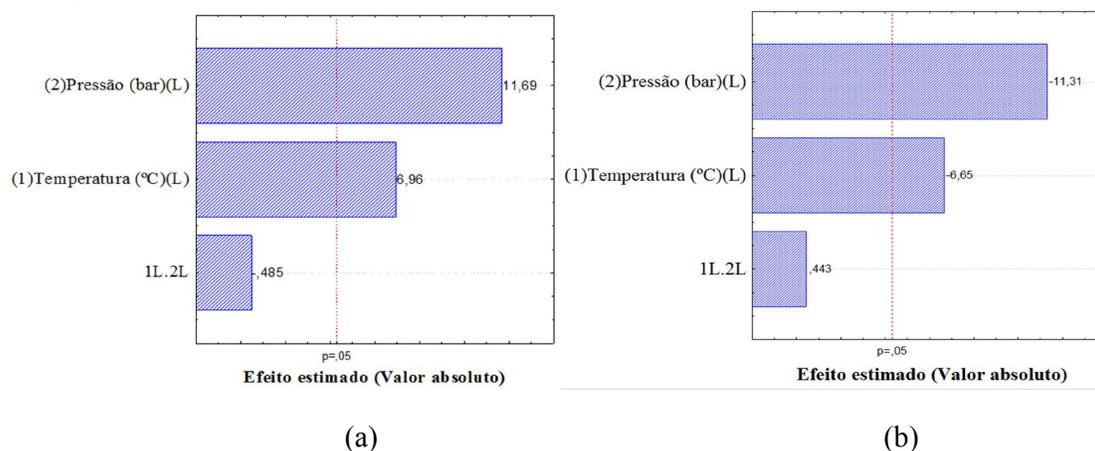


De acordo com a Figura 15 (a) e (b) observa-se que os maiores teores de sólidos totais para os concentrados foram obtidos em temperaturas acima de 30°C e pressões superiores a 2,5 bar. Isto deve-se também aos maiores fluxos devido a menores viscosidades do soro e ao

fato da pressão ser a força motriz do processo, esses fatores associados ao processo em batelada ocasionou uma maior concentração do soro consequentemente um maior teor de sólidos no retido já que todos os ensaios operaram a um tempo fixo de 90 min.

Para os permeados (Figura 16a) observa-se que as variáveis pressão e temperatura apresentaram efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ) sobre o teor de sólidos totais. Desta forma, condições extremas de temperatura ( $40^{\circ}\text{C}$ ) e pressão (3 bar) ocasionam maior passagem de sólidos pela membrana. Esse efeito é esperado uma vez que maiores pressões exercem maior força sobre a membrana, fazendo com que uma maior quantidade de solutos seja arrastada para a fração permeada. Quanto à temperatura, como já citado anteriormente em maiores temperaturas tem-se menores viscosidades da solução de alimentação facilitando a passagem de compostos pela membrana. Para Atra et al. (2005), a alta temperatura aumenta a difusividade do soluto e a taxa de transporte de solutos a partir da superfície da membrana para o fluxo de massa.

**Figura 16** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para sólidos totais (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 1.



Para a retenção de sólidos os resultados foram tratados estatisticamente, no qual através do gráfico de pareto (Figura 16b) é possível observar que as variáveis pressão e temperatura apresentaram influencia significativa negativa ( $p < 0,05$ ). Como citado anteriormente, maiores pressões arrastam maior teor de solutos para a fração permeada enquanto que maiores temperaturas reduzem a viscosidade também facilitando a passagem de solutos pela membrana diminuindo assim a retenção de sólidos pela membrana.

A matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) – Planejamento 2 e a resposta dos sólidos totais (g/100 mL) para os concentrados e permeados e o coeficiente

rejeição após UF com membrana plana de 100 kDa é apresentada na Tabela 16. As maiores concentrações de sólidos de 6,03 e 6,08 (g/100 mL) e também as maiores permeações de 4,59 e 4,62 g/100 mL, foram obtidos nos ensaios 3 e 4 ambos a 3 bar. A rejeição média obtida para os sólidos foi de 18,73% com um desvio de 0,9, sendo a maior rejeição obtida de 19,64% no ensaio 2 à 15°C e 1 bar. Os resultados podem ser melhor visualizados pela superfícies de respostas e curvas de contornos (Figuras 17, 18 e 19) dos concentrados permeados e rejeição, respectivamente.

**Tabela 16** - Matriz do segundo planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) – Planejamento 2 e resposta em termos de sólidos totais (g/100 mL) para os concentrados e permeados e coeficiente de rejeição (%) obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Sólidos Totais** (g/100 mL)		Coeficiente de Rejeição (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados	
1	5 (-1)	1,0 (-1)	5,93 <sup>a</sup> (±0,06)	4,38 <sup>b</sup> (±0,12)	21,79
2	15 (1)	1,0 (-1)	5,96 <sup>a</sup> (±0,08)	4,50 <sup>b</sup> (±0,08)	19,64
3	5 (-1)	3,0 (1)	6,03 <sup>a</sup> (±0,04)	4,59 <sup>b</sup> (±0,03)	18,04
4	15 (1)	3,0 (1)	6,08 <sup>a</sup> (±0,11)	4,62 <sup>b</sup> (±0,09)	17,50
5	10 (0)	2,0 (0)	5,98 <sup>a</sup> (±0,06)	4,54 <sup>b</sup> (±0,07)	18,93
6	10 (0)	2,0 (0)	5,99 <sup>a</sup> (±0,04)	4,55 <sup>b</sup> (±0,18)	18,75
7	10 (0)	2,0 (0)	5,97 <sup>a</sup> (±0,14)	4,55 <sup>b</sup> (±0,14)	18,75

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student) para concentrados e permeados. Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

Os resultados apresentados referentes o teor de sólidos totais dos concentrados e dos permeados e a rejeição foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre as respostas. Os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de t e p(2), para sólidos totais (g/100 mL) dos concentrados de soro de leite (Tabela 11B – Apêndice B), demonstram que apenas a variável pressão exerceu influência significativa (p<0,05) positiva dentro da faixa estudada.

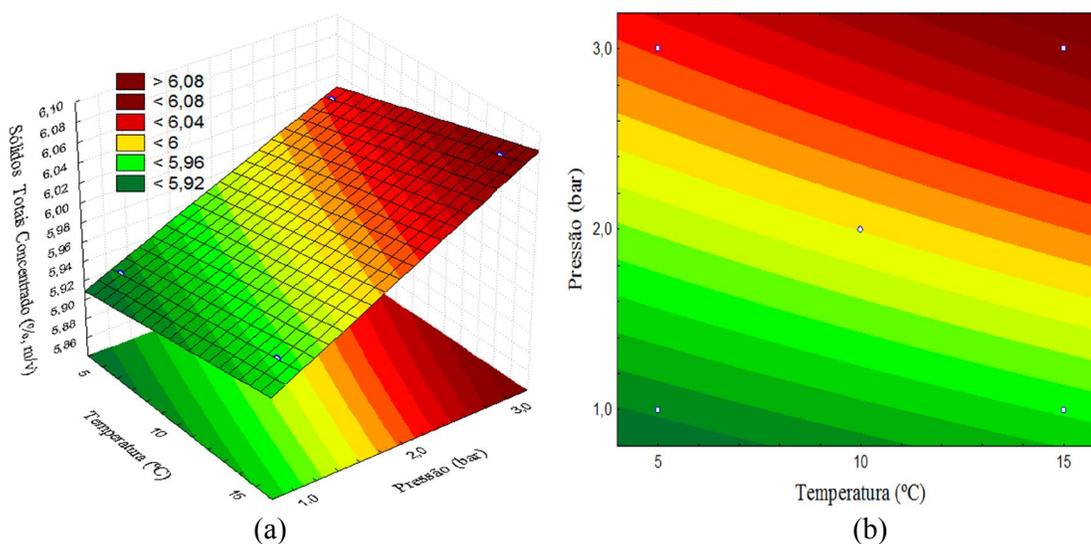
A Equação 10 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o teor de sólidos totais nos concentrados em função da pressão (p<0,05), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela Análise Variância (Tabela 12B – Apêndice B), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,91 e o F calculado 3,85 vezes maior que o F tabelado, o qual permitiu também a construção de superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na

Figura 17, demonstrando que as maiores concentrações de sólidos totais foram obtidos em uma ampla faixa de temperaturas (10 a 15°C) e pressões superiores a 2,5 bar.

$$STc = 6,09 + 0,053X_2 \quad (10)$$

Onde o STc é o teor de sólidos totais do concentrado (g/100 mL) e  $X_2$  é a pressão (bar).

**Figura 17** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para os sólidos totais (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2.



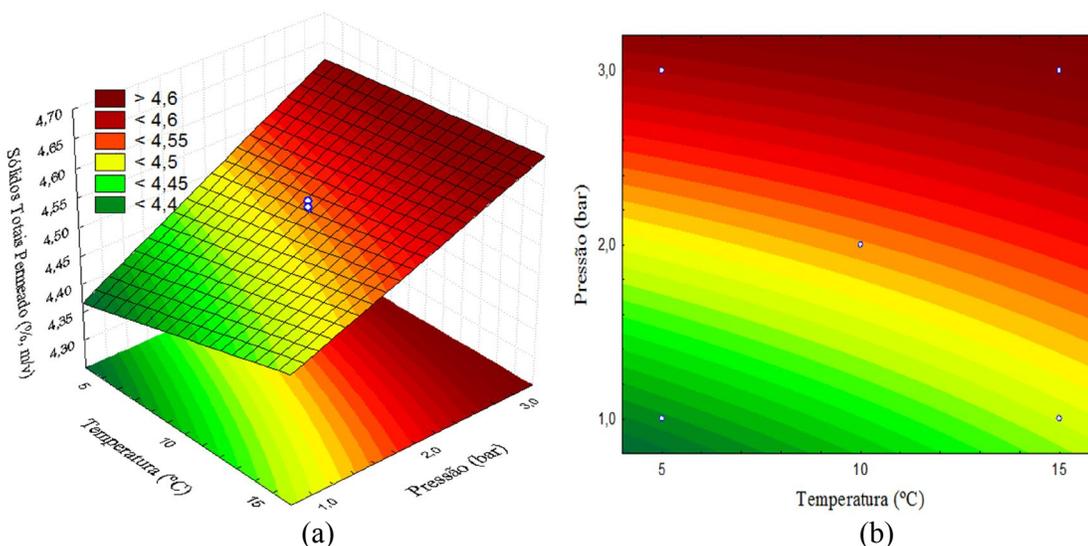
A Tabela 13B (Apêndice B) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de  $p$  e  $t$  (2) para sólidos totais (g/100 mL) nos permeados de soro de leite. As variáveis pressão e temperatura exerceram influência significativa ( $p < 0,05$ ) positiva dentro das faixas estudadas. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância – ANOVA.

A Equação 11 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o teor de sólidos totais nos permeados em função das variáveis analisadas (temperatura e pressão), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela Análise Variância, (Tabela 14B – Apêndice B), onde foi verificado um coeficiente de correlação de 0,95 e o  $F$  calculado 2,84 vezes maior ao  $F$  tabelado, o qual permitiu também a construção de superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 18. Demonstrando que os menores teores de sólidos encontram em pressões e temperatura próximas a 1 bar e 5°C.

$$STp = 4,527 + 0,028X_1 + 0,088X_2 \quad (11)$$

Onde o STp é o teor de sólidos totais dos permeados (g/100 mL),  $X_1$  é temperatura (°C) e  $X_2$  é pressão (bar).

**Figura 18** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para os sólidos totais (% m/v) dos permeados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$ - Planejamento 2.

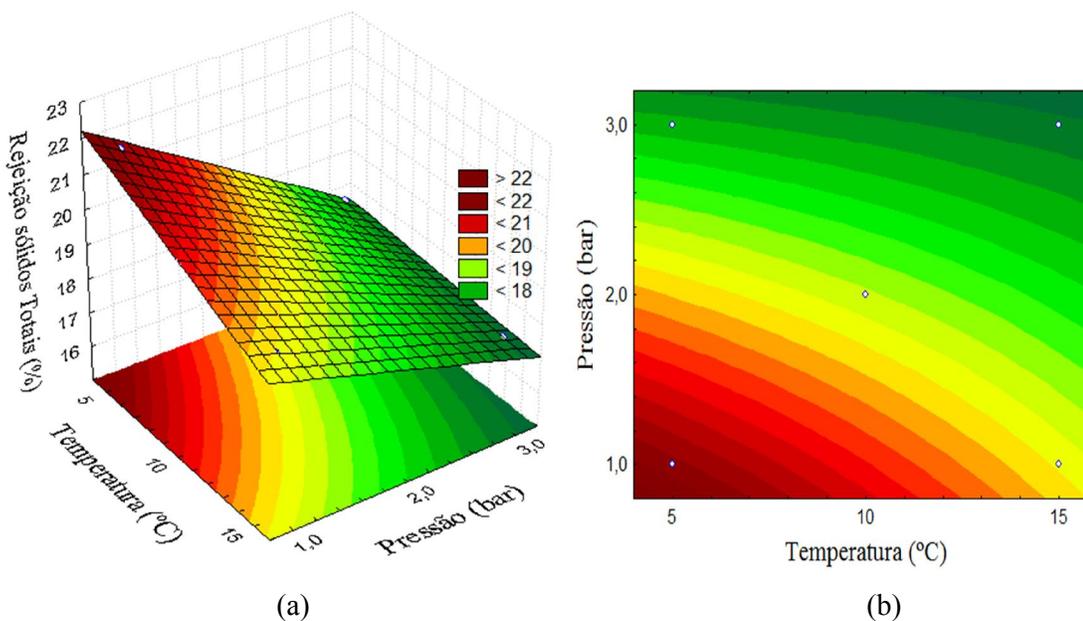


Para a rejeição os resultados foram tratados estatisticamente (Tabela 15B, Apêndice B). A Equação 12 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve a rejeição de sólidos em função da pressão e temperatura as quais exerceram influência significativa positiva, ( $p < 0,05$ ) e interação o qual apresentou efeito significativo negativo ( $p < 0,05$ ) dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela Análise Variância, (Tabela 16B, Apêndice B), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,99 e o F calculado 3,52 vezes superior ao F tabelado, permitindo também a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 19, demonstrando que as maiores rejeições foram obtidas em pressões e temperatura próximas a 1 bar e 5°C. Os resultados podem ser justificados em função de que menores pressões e temperaturas diminuem a passagem de sólidos para a corrente de permeado como já verificado, ocasionando assim uma maior retenção.

$$Rst = 6,09 - 0,67X_1 - 1,47X_2 + 0,40X_1 \cdot X_2 \quad (12)$$

Onde o Rst é a rejeição de sólidos totais (%),  $X_1$  é a temperatura (°C) e  $X_2$  é a pressão (bar).

**Figura 19** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para rejeição de sólidos totais (%), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2.



Serpa (2012) avaliando a influência da temperatura, pressão, e vazão de alimentação na UF com membrana fibra oca de 50 kDa, obteve valores de rejeição médios para sólidos totais de 17 %, valores estes próximos aos obtidos no presente estudo com membrana de 100 kDa. Segundo o autor a retenção de sólidos na corrente concentrada de UF observada permite seu reaproveitamento, pois a corrente concentrada do soro rica em proteínas e gordura pode ser utilizada em substituição parcial da matéria prima láctea, reduzindo o volume de efluentes.

O valor de sólidos totais é o parâmetro adotado para a verificação da concentração total de matéria seca não volátil das amostras de concentrado e permeado de soro de leite sendo que à medida que o soro de leite vai sendo concentrado, com o tempo ocorre um aumento no teor de sólidos do mesmo. Baldasso et al. (2011a), avaliaram o teor de sólidos totais em função do tempo para UF de soro de leite com membrana 10 kDa, temperatura de 50°C, e pressão de 2 bar. Ocorreu um aumento do teor de sólidos em função a do tempo de concentração. Ao final de 200 min de processo, os concentrados apresentaram teores de sólidos totais em torno de 9,0 g/100 mL, enquanto que os permeados os teores ficaram em média 4,5 g/100 mL. Palatnik et al. (2015), investigaram a recuperação de proteínas a partir de soro de leite caprino por MF seguida de UF com membrana de massa molar de corte de 10 kDa, fluxo tangencial, à 11±0,5°C e 4,2 bar de pressão. Os autores obtiveram após 30 min de UF valores para sólidos totais de 4,74 g/100g para a fração permeada enquanto que a

fração concentrada apresentou um teor de 10,29 g/100g. Os valores de sólidos totais para os concentrados em ambos os estudos citados apresentaram-se superiores aos obtidos no presente estudo enquanto que para os permeados os resultados foram semelhantes. A diferença observada deve-se principalmente ao tamanho do poro da membrana, visto que a membrana de 10 kDa possui tamanho de poro bem inferior a de 100 kDa retendo uma maior quantidade de solutos e consequentemente obtendo maior teor de sólidos.

#### 4.2.2.3 Condutividade

A Tabela 17 apresenta a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados)- Planejamento 1 e a resposta da condutividade para os concentrados e permeados, obtidos após o processo de UF com membrana plana de 100 kDa. Nos ensaios a condutividade apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos permeados em relação aos concentrados.

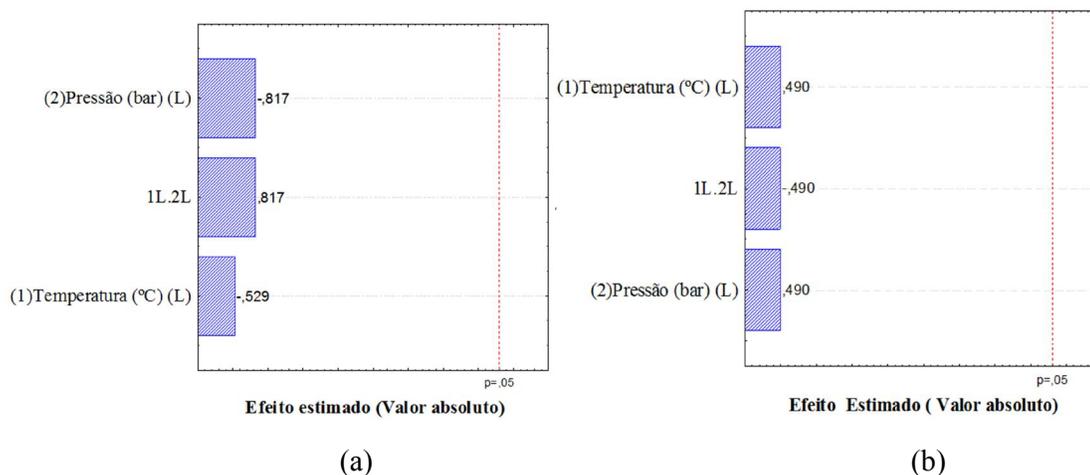
**Tabela 17** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados)- Planejamento 1 e resposta em termos de condutividade (mS/cm) para os concentrados e os permeados obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Condutividade elétrica (mS/cm)**	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados
1	20 (-1)	1,0 (-1)	6,25 <sup>b</sup> (±0,03)	6,39 <sup>a</sup> (±0,02)
2	40 (1)	1,0 (-1)	6,23 <sup>b</sup> (±0,03)	6,41 <sup>a</sup> (±0,03)
3	20 (-1)	3,0 (1)	6,23 <sup>b</sup> (±0,01)	6,41 <sup>a</sup> (±0,01)
4	40 (1)	3,0 (1)	6,23 <sup>b</sup> (±0,03)	6,41 <sup>a</sup> (±0,02)
5	30 (0)	2,0 (0)	6,24 <sup>b</sup> (±0,01)	6,37 <sup>a</sup> (±0,03)
6	30 (0)	2,0 (0)	6,21 <sup>b</sup> (±0,02)	6,41 <sup>a</sup> (±0,01)
7	30 (0)	2,0 (0)	6,24 <sup>b</sup> (±0,02)	6,40 <sup>a</sup> (±0,01)

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

Após a análise estatística dos dados verificou-se que a temperatura e a pressão não exerceram efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) sobre a condutividade nos concentrados e permeados (Figura 20).

**Figura 20** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a condutividade (mS/cm) dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 1.



Na Tabela 18 apresenta-se a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados)-Planejamento 2 e a resposta da condutividade para os concentrados e permeados para UF com membrana plana de 100 kDa.

**Tabela 18** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) - Planejamento 2 e resposta em termos de condutividade (mS/cm) para os concentrados e os permeados obtidos após UF.

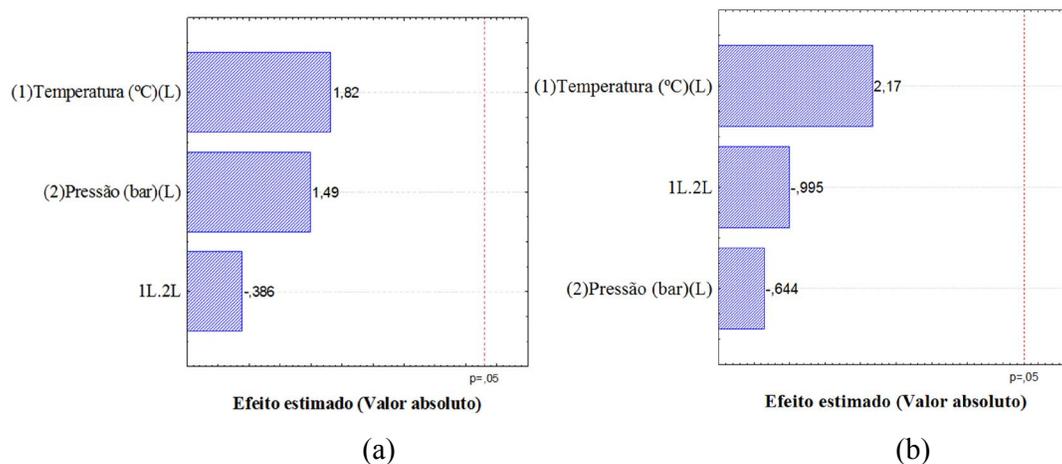
Ensaio	Variáveis independentes*		Condutividade elétrica (mS/cm)**	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados
1	5 (-1)	1,0 (-1)	5,12 <sup>b</sup> (±0,02)	5,22 <sup>a</sup> (±0,03)
2	15 (1)	1,0 (-1)	5,14 <sup>b</sup> (±0,03)	5,25 <sup>a</sup> (±0,05)
3	5 (-1)	3,0 (1)	5,13 <sup>b</sup> (±0,05)	5,23 <sup>a</sup> (±0,03)
4	15 (1)	3,0 (1)	5,15 <sup>b</sup> (±0,04)	5,24 <sup>a</sup> (±0,04)
5	10 (0)	2,0 (0)	5,14 <sup>b</sup> (±0,04)	5,26 <sup>a</sup> (±0,03)
6	10 (0)	2,0 (0)	5,15 <sup>b</sup> (±0,03)	5,25 <sup>a</sup> (±0,05)
7	10 (0)	2,0 (0)	5,13 <sup>b</sup> (±0,04)	5,24 <sup>a</sup> (±0,04)

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

O mesmo comportamento foi verificado em relação a condutividade quando dos concentrados e permeados quando comparados aos do Planejamento 1, no entanto com valores levemente inferiores, de 5,12-5,15 no concentrado e 5,22-5,26 mS/cm no permeado, quando operados em UF nas temperaturas de 5 a 15°C. No entanto nenhuma das variáveis

estudadas exerceram efeito significativo sobre a condutividade, como pode ser visualizado nos gráficos de pareto apresentados na Figura 21.

**Figura 21** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a condutividade (mS/cm) dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2.



A medida da condutividade elétrica é uma medida indireta da concentração de íons na solução, assim soluções inorgânicas conduzem melhor a corrente elétrica que substâncias orgânicas. Dessa forma as maiores condutividades observadas nos permeados deve-se a quantidade de substâncias inorgânicas presentes estarem em maiores quantidades que nos concentrados devido à passagem de sais uma vez que estes são completamente permeáveis pela membrana. Perfil semelhante foi obtido por Crowley et al. (2015), para a ultrafiltração de leite desnatado com membrana de polietersulfona de 1000 kDa a 4°C. De acordo com os autores os valores de condutividade dos concentrados foram menores em relação a condutividade dos permeados, devido ao esgotamento e enriquecimento de minerais nas fase do concentrado e permeado do leite desnatado, respectivamente.

Para Holder et al. (2013), um menor pH é sinônimo de um maior grau de salinidade de uma solução, sendo que em pHs mais baixos as soluções apresentaram maior condutividade. Dessa forma, possivelmente a diferença de condutividade verificada entre os dois planejamentos esta relacionado com os resultados de acidez e pH obtidos (Tabelas 19-20 e 21-22) em cada um, assim, uma vez que foram observados menores valores de pH no planejamento 1, tem-se portanto como consequência maiores valores de condutividade do que no segundo planejamento devido a uma maior quantidade de íons presentes na solução.

Holder et al. (2013), investigou o fracionamento de peptídeos bio-funcionais a partir de hidrolisado de caseína por UF com membranas de 5 kDa. Estes verificaram que durante a

UF ocorreu uma distribuição de sais entre o permeado e o concentrado. A condutividade do concentrado foi reduzida enquanto que a do permeado aumentou linearmente em função do tempo nos primeiros 30 min do tratamento estabilizando logo em seguida.

#### 4.2.2.4 Acidez

A Tabela 19 apresenta a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados)- Planejamento 1 e a resposta em termos de acidez ( $^{\circ}$ D) para os concentrados e permeados obtidos após o processo de UF com membrana plana de 100 kDa.

**Tabela 19** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) - Planejamento 1 e resposta em termos de acidez ( $^{\circ}$ D) para os concentrados e os permeados obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Acidez** ( $^{\circ}$ D)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados
1	20 (-1)	1,0 (-1)	27,10 <sup>a</sup> ( $\pm 0,85$ )	22,83 <sup>b</sup> ( $\pm 0,29$ )
2	40 (1)	1,0 (-1)	31,73 <sup>a</sup> ( $\pm 0,64$ )	28,50 <sup>b</sup> ( $\pm 0,50$ )
3	20 (-1)	3,0 (1)	26,30 <sup>a</sup> ( $\pm 0,20$ )	23,03 <sup>b</sup> ( $\pm 0,06$ )
4	40 (1)	3,0 (1)	30,33 <sup>a</sup> ( $\pm 0,29$ )	27,67 <sup>b</sup> ( $\pm 0,58$ )
5	30 (0)	2,0 (0)	26,43 <sup>a</sup> ( $\pm 0,51$ )	23,17 <sup>b</sup> ( $\pm 0,29$ )
6	30 (0)	2,0 (0)	26,50 <sup>a</sup> ( $\pm 0,50$ )	23,50 <sup>b</sup> ( $\pm 0,50$ )
7	30 (0)	2,0 (0)	26,33 <sup>a</sup> ( $\pm 0,58$ )	23,33 <sup>b</sup> ( $\pm 0,58$ )

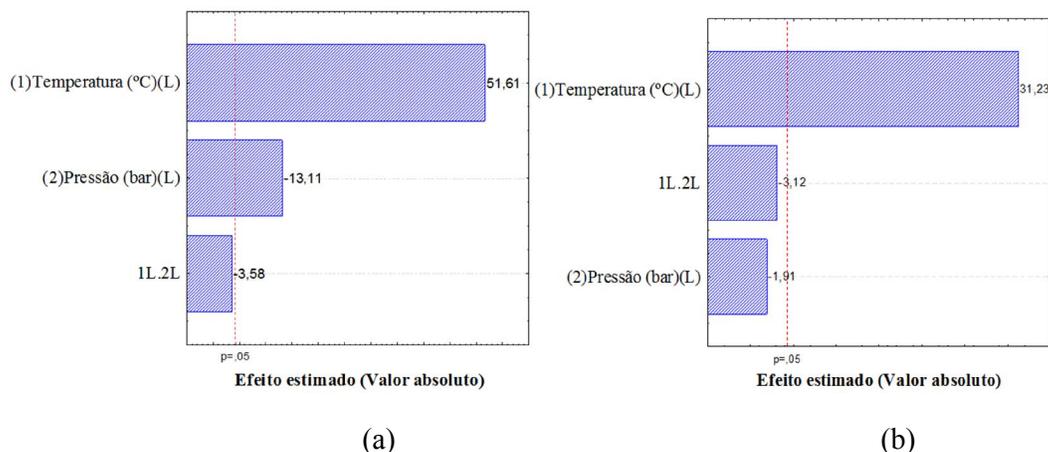
\*X<sub>1</sub>= Temperatura ( $^{\circ}$ C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias ( $\pm$ desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

De acordo com a Tabela 19 observa-se que tanto nos concentrados como nos permeados apresentaram um acréscimo na acidez em relação ao soro *in natura* (12, 20 $^{\circ}$ D), possivelmente devido à ação de bactérias durante o tempo que o soro permaneceu no sistema de UF. Os valores de acidez para os concentrados apresentaram-se superiores ( $p < 0,05$ ) aos encontrados para permeados em todos os ensaios. Ressalta-se para os concentrados os maiores teores de acidez (31,73 e 30,33 $^{\circ}$ D) foram quando operados a 40 $^{\circ}$ C (ensaios 2 e 4).

Os efeitos das variáveis independentes podem ser melhores visualizados na Figura 22(a) e (b), onde são apresentados os gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^2$ . Observa-se que para os concentrados (Figura 22a), a acidez foi influenciada positivamente ( $p < 0,05$ ) pela temperatura ou seja, à medida que se tem um aumento da temperatura, ocorre aumento da acidez. Enquanto que a pressão apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) negativo.

Em relação aos permeados (Figura 22b), apenas a temperatura apresentou efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ).

**Figura 22-** Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para acidez ( $^{\circ}$ Dornic) dos concentrados (a) e dos permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 1.



Baseado nos resultados dos concentrados, os níveis de temperatura foram reduzidos e um novo planejamento - Tabela 20 (Planejamento fatorial  $2^2$ - Planejamento 2) para UF com membrana plana de 100 kDa foi conduzido com temperaturas de 5, 10 e 15 $^{\circ}$ C. As pressões foram mantidas nos mesmos níveis do Planejamento 1 em função das limitações do equipamento.

**Tabela 20** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) – Planejamento 2 e resposta em termos de acidez ( $^{\circ}$ D) para os concentrados e os permeados obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Acidez** ( $^{\circ}$ D)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados
1	5 (-1)	1,0 (-1)	12,33 <sup>a</sup> ( $\pm 0,58$ )	12,17 <sup>a</sup> ( $\pm 0,76$ )
2	15 (1)	1,0 (-1)	13,33 <sup>a</sup> ( $\pm 1,15$ )	12,67 <sup>a</sup> ( $\pm 0,50$ )
3	5 (-1)	3,0 (1)	12,33 <sup>a</sup> ( $\pm 0,29$ )	12,33 <sup>a</sup> ( $\pm 0,58$ )
4	15 (1)	3,0 (1)	13,67 <sup>a</sup> ( $\pm 0,58$ )	13,17 <sup>a</sup> ( $\pm 0,29$ )
5	10 (0)	2,0 (0)	13,00 <sup>a</sup> ( $\pm 1,00$ )	12,33 <sup>a</sup> ( $\pm 0,58$ )
6	10 (0)	2,0 (0)	12,67 <sup>a</sup> ( $\pm 0,51$ )	12,33 <sup>a</sup> ( $\pm 0,58$ )
7	10 (0)	2,0 (0)	12,67 <sup>a</sup> ( $\pm 0,58$ )	12,00 <sup>a</sup> ( $\pm 1,00$ )

\*X<sub>1</sub>= Temperatura ( $^{\circ}$ C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias ( $\pm$ desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

De acordo com a Tabela 20 observa-se que não houve diferença ( $p>0,05$ ) significativa entre a acidez dos permeados e concentrados nos ensaios, sendo os valores de acidez similares aos obtidos para soro *in natura* (12,20°D).

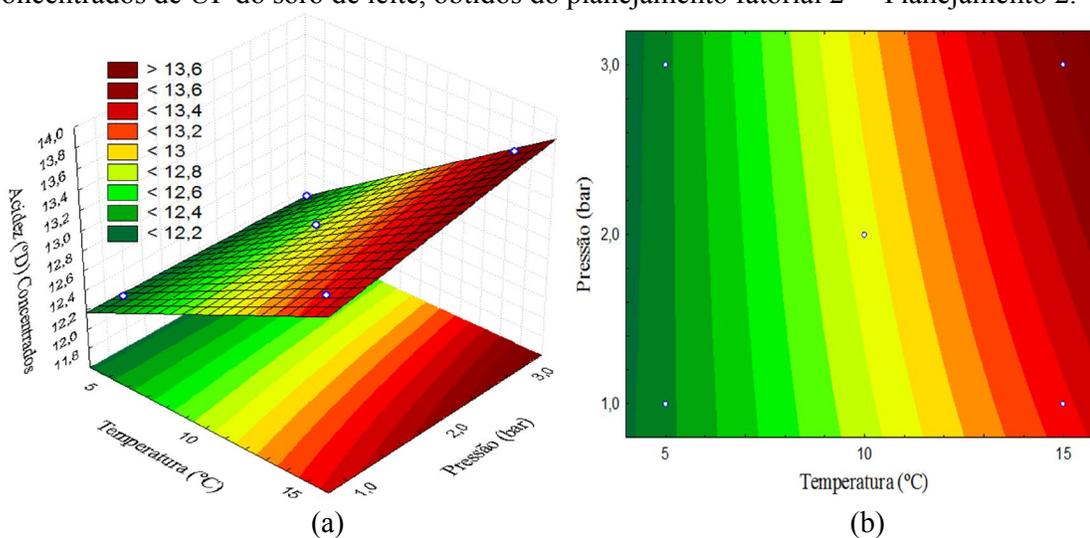
Os resultados da Tabela 20 foram tratados estatisticamente (Tabela 17B - Apêndice B). Sendo que a Equação 13 apresenta o modelo codificado de primeira ordem, que descreve a acidez dos concentrados em função da temperatura, variável que foi significativa ( $p<0,05$ ). O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 18B - Apêndice B), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,95 e o F calculado 6,32 vezes maior que o valor F tabelado, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 23, na qual é verificada que menores valores de acidez dos concentrados encontram-se na faixa de temperatura menor que 10°C independentemente da pressão utilizada.

Para os permeados a temperatura e a pressão não exerceram efeito ( $p>0,05$ ) na acidez (Figura 24).

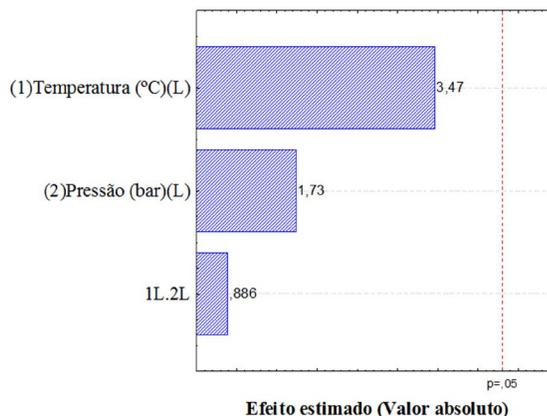
$$ACID_c = 12,856 + 0,583X_1 \quad (13)$$

Onde o  $ACID_c$  é a Acidez (°D) dos concentrados e  $X_1$  é a temperatura (°C).

**Figura 23** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para a acidez (°D) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2.



**Figura 24** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para acidez ( $^{\circ}$ Dornic) dos permeados, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2



A elevação nos teores de acidez verificadas em todos os ensaios do Planejamento 1 (Tabela 19) pode ter ocorrido em virtude da degradação da lactose (Tabela 23) e produção de ácido láctico devido à ação de bactérias lácticas presentes no soro, pois as temperaturas empregadas (20-40 $^{\circ}$ C) são consideradas ótimas para o seu desenvolvimento e ação. De acordo com Jay (1996) e Panesar et al. (2007), a maioria dos microrganismos acidificantes no leite, são caracterizados por se desenvolverem entre temperaturas de 20 a 45 $^{\circ}$ C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30 e 40 $^{\circ}$ C.

Para Narimatsu et al. (2003), o leite ultrafiltrado é um meio no qual favorece o crescimento de cultura láctica, com a concentração do leite e o crescimento de bactérias lácticas ocorre um aumento da produção de ácido láctico ocasionando um aumento significativo do teor de acidez. Chandrapala et al. (2015), investigando as propriedades químicas e físicas do soro de leite ácido nas temperaturas de 15, 25, 40 e 90 $^{\circ}$ C verificaram que teor de ácido láctico e aumentou em temperaturas mais elevadas, não apresentando grande diferença entre as temperaturas de 40 $^{\circ}$ C e 90 $^{\circ}$ C.

#### 4.2.2.5 pH

A Tabela 21 apresenta a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados)- Planejamento 1 e a resposta em termos de pH para os concentrados e permeados obtidos após o processo de UF com membrana plana de 100 kDa. Os valores de pH para os permeados apresentaram-se levemente superiores ( $p < 0,05$ ) aos os concentrados em todos os ensaios. Em ambas as frações (permeados e concentrados) ocorreu uma diminuição do pH em relação ao soro de leite *in-natura*, o qual apresentava pH médio de 6,49.

Os menores valores de pH tanto para os permeados (4,49) como para os concentrados (4,37) foram obtidos no ensaio 2 o qual utilizou temperatura de 40°C.

**Tabela 21** - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) – Planejamento 1 e resposta em termos de pH para os concentrados e os permeados obtidos após UF.

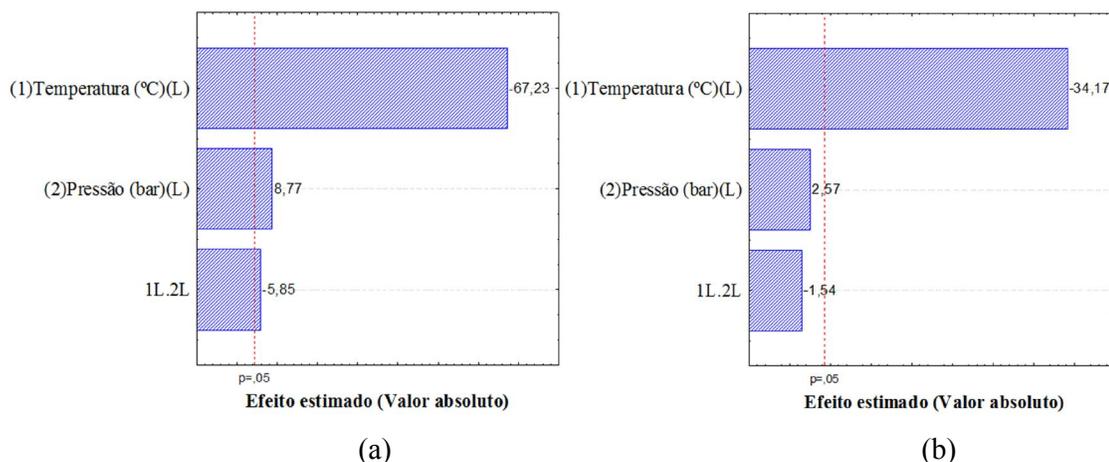
Ensaio	Variáveis independentes*		pH**	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados
1	20 (-1)	1,0 (-1)	5,00 <sup>b</sup> (±0,01)	5,12 <sup>a</sup> (±0,03)
2	40 (1)	1,0 (-1)	4,37 <sup>b</sup> (±0,03)	4,49 <sup>a</sup> (±0,01)
3	20 (-1)	3,0 (1)	5,14 <sup>b</sup> (±0,03)	5,20 <sup>a</sup> (±0,03)
4	40 (1)	3,0 (1)	4,40 <sup>b</sup> (±0,01)	4,51 <sup>a</sup> (±0,01)
5	30 (0)	2,0 (0)	4,66 <sup>b</sup> (±0,01)	5,01 <sup>a</sup> (±0,03)
6	30 (0)	2,0 (0)	4,65 <sup>b</sup> (±0,01)	4,98 <sup>a</sup> (±0,01)
7	30 (0)	2,0 (0)	4,64 <sup>b</sup> (±0,01)	5,0 <sup>a</sup> (±0,02)

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

Os efeitos das variáveis independentes podem ser melhores visualizados na Figura 25 (a) e (b), onde são apresentados os gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> – Planejamento 1. Observa-se que para os concentrados (Figura 25a) as variáveis apresentaram efeitos sob o pH, sendo que a temperatura influenciou negativamente (p<0,05), ou seja, a medida que tem-se um aumento da temperatura ocorre uma diminuição do pH e a pressão foi positiva (p<0,05).

Para os permeados (Figura 25b) apenas a variável temperatura exerceu efeito significativo negativo (p<0,05). Dessa forma, um aumento da mesma ocasiona uma diminuição do pH dentro da faixa estudada. Os menores valores de pH em maiores temperaturas deve-se possivelmente a ação das bactérias lácticas e degradação da lactose, visto que estas possuem um ótimo de crescimento em temperaturas entre 30 e 40 °C.

**Figura 25** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para pH dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 1.



Em função dos resultados apresentados no Planejamento 1 que demonstrou que a temperatura ocasionou a acidificação do concentrado, um novo Planejamento fatorial completo  $2^2$  foi realizado (Planejamento 2) deslocando os níveis de temperatura para valores inferiores, sendo os níveis apresentados na Tabela 22. Observa-se que para as frações permeadas o pH apresentou uma variação entre 6,44 à 6,50, enquanto que as frações concentradas apresentaram valores levemente inferiores ( $p < 0,05$ ) em todos os ensaios variando entre 6,33 à 6,42.

**Tabela 22** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) – Planejamento 2 e resposta em termos de pH para os concentrados e os permeados obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		pH**	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados
1	5 (-1)	1,0 (-1)	6,41 <sup>b</sup> ( $\pm 0,01$ )	6,50 <sup>a</sup> ( $\pm 0,02$ )
2	15 (1)	1,0 (-1)	6,33 <sup>b</sup> ( $\pm 0,01$ )	6,45 <sup>a</sup> ( $\pm 0,03$ )
3	5 (-1)	3,0 (1)	6,42 <sup>b</sup> ( $\pm 0,03$ )	6,50 <sup>a</sup> ( $\pm 0,04$ )
4	15 (1)	3,0 (1)	6,36 <sup>b</sup> ( $\pm 0,03$ )	6,47 <sup>a</sup> ( $\pm 0,01$ )
5	10 (0)	2,0 (0)	6,38 <sup>b</sup> ( $\pm 0,01$ )	6,46 <sup>a</sup> ( $\pm 0,03$ )
6	10 (0)	2,0 (0)	6,39 <sup>b</sup> ( $\pm 0,02$ )	6,46 <sup>a</sup> ( $\pm 0,02$ )
7	10 (0)	2,0 (0)	6,36 <sup>b</sup> ( $\pm 0,02$ )	6,44 <sup>a</sup> ( $\pm 0,03$ )

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias ( $\pm$ desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student). Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

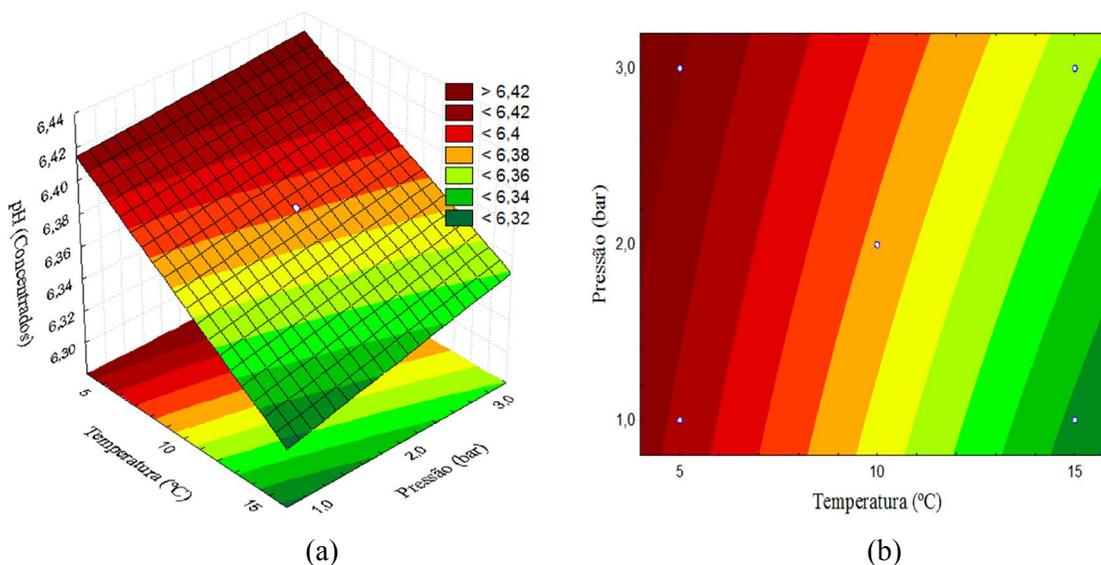
Os resultados referentes ao pH dos permeados e concentrados foram tratados estatisticamente. A Equação 14 apresenta o modelo codificado de primeira ordem, que descreve o pH dos concentrados em função da temperatura, dentro da faixa estudada e os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para o pH dos concentrados são apresentados na Tabela 19B – Apêndice B. O efeito negativo encontrado para a temperatura indica que um deslocamento do nível de temperatura estudado para valores superiores, resultaria em uma diminuição do pH e consequente acidificação das frações concentradas do soro, fato este evidenciado anteriormente no primeiro planejamento o qual utilizou temperaturas mais elevadas. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância – ANOVA.

O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 20B – Apêndice B), onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,92 e o F calculado 4,96 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 26, na qual é possível observar que os maiores valores de pH e consequentemente menores acidificações do soro são encontrados em temperaturas menores de 10 °C e em uma ampla faixa de pressão.

$$pH_c = 6,377 - 0,0368X_1 \quad (14)$$

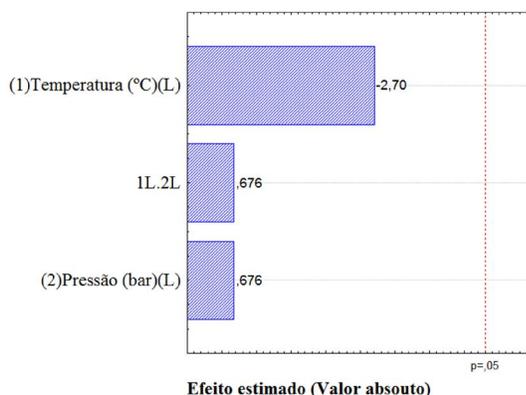
Onde o pH<sub>c</sub> é o pH dos concentrados e X<sub>1</sub> é a temperatura (°C).

**Figura 26** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para o pH dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> – Planejamento 2.



Para os permeados os resultados foram tratados estatisticamente, não sendo verificado influencia significativa ( $p > 0,05$ ) das variáveis estudadas (temperatura e pressão) sob o pH. Os efeitos podem ser visualizados pelo gráfico de pareto apresentado na Figura 27.

**Figura 27** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para o pH dos permeados obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 2.



As alterações nos valores de pH dos concentrados e permeados em reação ao soro *in-natura*, verificadas em todos os ensaios do Planejamento 1 (Tabela 21) possivelmente devem se a associação da temperatura com o modo do processo (em batelada) o qual o soro ficou submetido por um tempo considerável a ação de microrganismos que podem causar a acidificação do soro. Segundo Ordonez (2005), no leite as bactérias lácticas metabolizam a lactose presente e produzem ácido láctico que se acumula ocasionando a redução do pH do e consequente acidificação.

Na literatura são escassos os trabalhos que avaliaram as mudanças ocorridas no pH durante processos de UF de soro de leite. Baldasso et al. (2011a), utilizando soro de leite reconstituído para UF com membrana de 10 kDa e temperatura de 50°C não observaram alterações significativas de pH durante todo o processo de UF. O pH manteve-se entre 6,2 e 6,4 para as amostras de concentrado e permeado. Leidens (2013), avaliando a UF de soro de leite ovino com membrana espiral de 10 kDa também a uma temperatura de 50°C e pressão de 3 bar constatou que o soro não sofreu alterações durante os experimentos uma vez que o pH permaneceu constante tanto no concentrado como no permeado. Cabe ressaltar que a temperatura utilizada de 50°C empregada por estes trabalhos apresenta-se fora da faixa de temperatura que a maioria dos microrganismos acidificantes no leite/soro de leite costumam se desenvolver.

#### 4.2.2.6 Lactose

A Tabela 23 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) - Planejamento 1, a resposta da lactose (g/100 mL) para os concentrados e permeados obtidos e o coeficiente de rejeição após o processo de UF com membrana plana de 100 kDa. É possível observar que em todos os ensaios os teores de lactose apresentaram-se superiores ( $p < 0,05$ ) nos permeados em relação aos concentrados. Para os concentrados os teores variaram entre 2,99 a 3,36 g/100 mL, sendo os menores teores encontrados nos ensaios 2 e 4 na temperatura de 40°C. Para os permeados os valores situaram-se entre 4,18 a 4,89 g/100 mL, sendo verificado maiores taxas de permeações nos ensaios 3 e 4 na pressão de 3 bar.

Para a rejeição, observa-se que a mesma foi inferior a 11% em todos os ensaios. Os valores obtidos indicam que a membrana apresenta uma retenção parcial a lactose o que propicia uma maior dificuldade na purificação das proteínas.

**Tabela 23** - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados)- Planejamento 1 e resposta em termos de lactose (g/100 mL) para os concentrados e os permeados e coeficiente de rejeição (%) obtidos após a UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Lactose** (g/100 mL)		Coeficiente de Rejeição (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados	
1	20 (-1)	1,0 (-1)	3,12 <sup>b</sup> (±0,14)	4,18 <sup>a</sup> (±0,03)	10,30
2	40 (1)	1,0 (-1)	2,99 <sup>b</sup> (±0,38)	4,37 <sup>a</sup> (±0,03)	6,22
3	20 (-1)	3,0 (1)	3,03 <sup>b</sup> (±0,12)	4,60 <sup>a</sup> (±0,03)	1,29
4	40 (1)	3,0 (1)	2,99 <sup>b</sup> (±0,03)	4,59 <sup>a</sup> (±0,04)	1,50
5	30 (0)	2,0 (0)	3,32 <sup>b</sup> (±0,09)	4,23 <sup>a</sup> (±0,05)	9,23
6	30 (0)	2,0 (0)	3,29 <sup>b</sup> (±0,03)	4,22 <sup>a</sup> (±0,05)	9,44
7	30 (0)	2,0 (0)	3,36 <sup>b</sup> (±0,04)	4,21 <sup>a</sup> (±0,02)	9,66

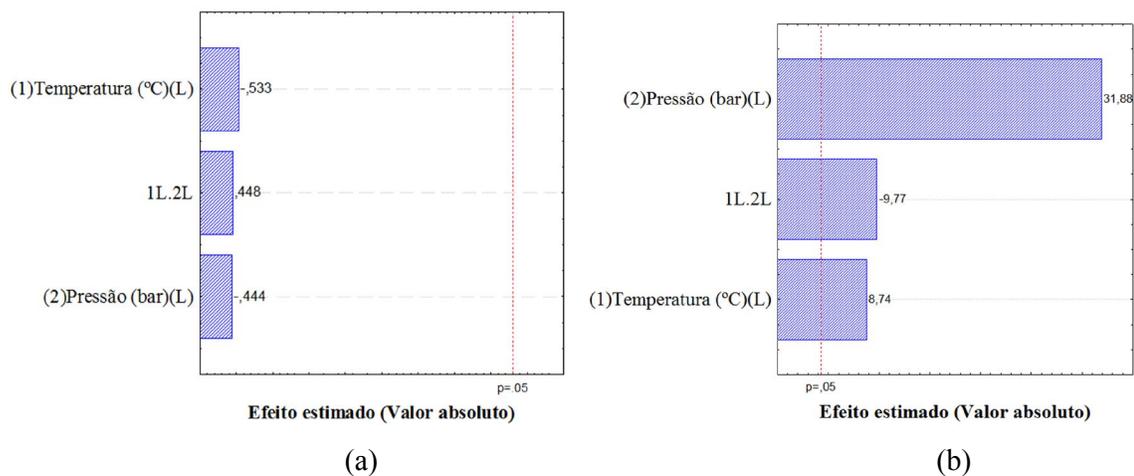
\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student) para os concentrados e permeados. Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

Teoricamente, uma membrana de 100 kDa não poderia reter lactose, uma vez esta é um soluto neutro e tem uma massa molecular menor do que massa molar de corte da membrana. Porém o *fouling* e a formação de camada de gel na superfície da membrana, podem ser fatores que alteram a seletividade da causando a rejeição de alguns componentes com massas molares inferiores ao *cut off* da membrana. Para Rektor e Vatai (2004),

retenção/rejeição da lactose pode ocorrer durante o processo de UF devido a uma camada gel que se forma pela deposição de componentes retidos na superfície da membrana, principalmente, proteínas e sais, que ao longo do processo de UF exercem resistência hidráulica à passagem de água e de solutos com baixa massa molar como a lactose.

Após o tratamento estatístico dos resultados não foi verificada influência significativa ( $p < 0,05$ ) da pressão, e temperatura em relação ao teor de lactose dos concentrados (Figura 28a). Para os permeados é possível observar pelo gráfico de Pareto (Figura 28b) que as variáveis pressão e temperatura, exerceram efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ). Possivelmente, a maior pressão sob a membrana facilitou a passagem de água e de solutos com baixa massa molar como a lactose, da mesma forma maiores temperaturas diminuem a viscosidade do soro facilitando a passagem desse soluto para a fração permeada.

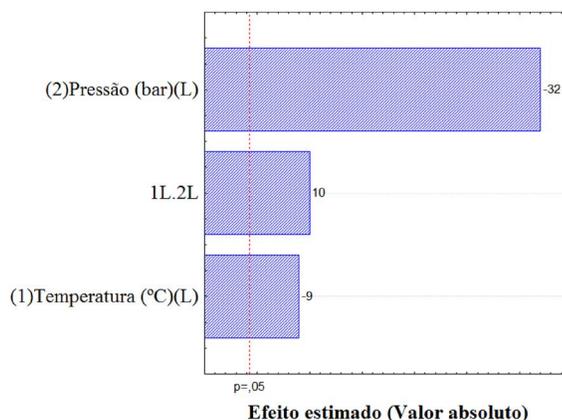
**Figura 28-** Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a lactose (g/100 mL) dos concentrados (a) e permeados (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  – Planejamento 1.



Para a rejeição de lactose os resultados foram tratados estatisticamente, no qual através do gráfico de Pareto (Figura 29) é possível observar que as variáveis pressão e temperatura apresentaram influência significativa negativa ( $p < 0,05$ ), enquanto que a interação pressão e temperatura exerceu influência significativa positiva ( $p < 0,05$ ). Como citado anteriormente, maiores pressões exercem maior força sob a membrana enquanto que maiores temperaturas diminuem a viscosidade, facilitando a passagem de compostos pela membrana diminuindo assim a retenção. Já o efeito positivo das duas variáveis associadas pode ser compreendido em função de que maiores pressões e temperaturas obtiveram-se e maior polarização por concentração e *fouling*. Os componentes do soro principalmente as proteínas e sais se

depositam sobre a superfície da membrana formando uma camada de gel e uma espécie de segunda barreira de filtração dificultando a passagem de solutos pela membrana, aumentando dessa forma a retenção de solutos.

**Figura 29** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para rejeição (%) de lactose obtido do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 1.



A Tabela 24 apresenta a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) - Planejamento 2 e resposta da lactose para os concentrados e permeados e o coeficiente rejeição (%) obtidos após o processo de UF.

**Tabela 24** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados)- Planejamento 2 e resposta em termos de teor lactose (g/100 mL) para os concentrados e permeados e coeficiente de rejeição obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Lactose**(g/100 mL)		Coeficiente de Rejeição (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados	
1	5 (-1)	1,0 (-1)	4,43 <sup>a</sup> (±0,06)	4,44 <sup>a</sup> (±0,03)	4,72
2	15 (1)	1,0 (-1)	4,01 <sup>b</sup> (±0,06)	4,42 <sup>a</sup> (±0,04)	5,15
3	5 (-1)	3,0 (1)	4,45 <sup>a</sup> (±0,07)	4,50 <sup>a</sup> (±0,03)	3,43
4	15 (1)	3,0 (1)	4,12 <sup>b</sup> (±0,07)	4,48 <sup>a</sup> (±0,04)	3,86
5	10 (0)	2,0 (0)	4,40 <sup>a</sup> (±0,12)	4,44 <sup>a</sup> (±0,07)	4,72
6	10 (0)	2,0 (0)	4,42 <sup>a</sup> (±0,02)	4,45 <sup>a</sup> (±0,06)	4,51
7	10 (0)	2,0 (0)	4,38 <sup>a</sup> (±0,10)	4,47 <sup>a</sup> (±0,03)	4,08

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student) para concentrados e permeados. Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

Os menores teores de lactose para os concentrados foram de 4,01 e 4,12 g/100 mL (ensaios 2 e 4) na temperatura de 15°C. Para os permeados a maior taxa de permeação foi de 4,50 g/100 mL (ensaio 3) à 5°C e 3 bar. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Baldasso et al. (2011a), empregando membrana de 10 kDa (50°C e 2 bar) para UF de soro de leite.

Para a rejeição, observa-se que ocorreu baixa retenção desse soluto, sendo que para todos os ensaios os valores foram inferiores a 6% obtendo uma rejeição média de 4,35%. Macedo et al. (2015), na UF de soro de leite ovino com membrana plana de 10 kDa, fluxo cruzado e temperatura de 25°C, também observaram rejeições aparentes de lactose. De acordo com os autores esse resultado é compatível provavelmente com a formação de uma camada de polarização, constituída principalmente por proteínas, cuja espessura aumentou com pressão, prendendo solutos de massa molecular inferior ao tamanho do poro da membrana.

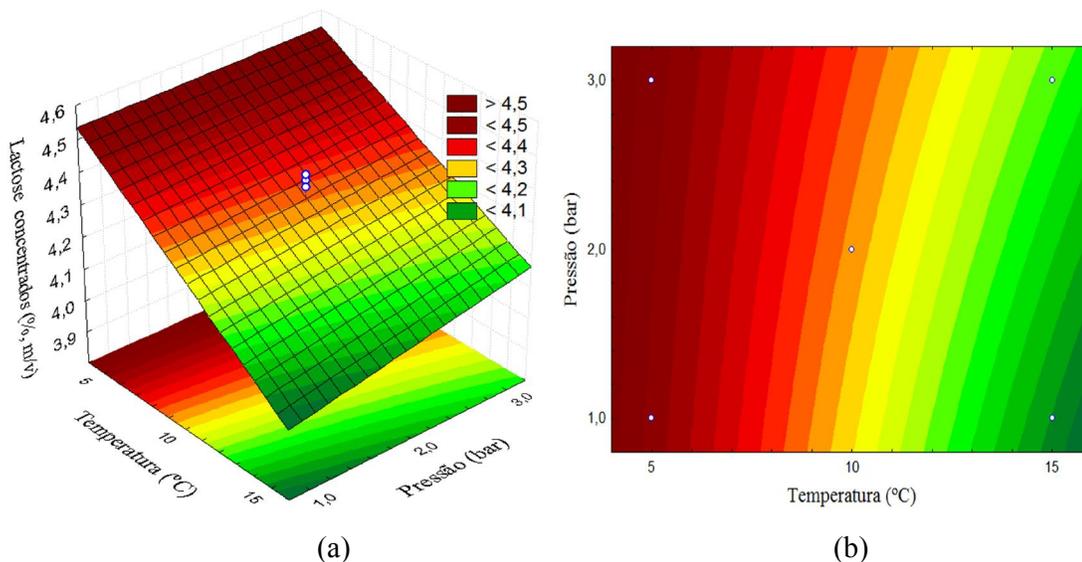
Os resultados referentes a lactose dos permeados e concentrados foram tratados estatisticamente. A Equação 14 apresenta o modelo codificado de primeira ordem para lactose dos concentrados, onde a variável temperatura exerceu influência significativa negativa ( $p < 0,05$ ), indicando que o aumento da temperatura ocasionaria uma diminuição da lactose. A Tabela 21B (Apêndice B) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão erro padrão, valores de  $p$  e  $t(2)$  para a lactose dos concentrados. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância – ANOVA (Tabela 22B – Apêndice B).

O modelo (Equação 14) foi validado pela análise de variância, onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,87 e o  $F$  calculado de 2,40 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram também a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 30 demonstrando que em uma ampla faixa de pressão e em menores temperaturas tem-se maiores concentrações de lactose.

$$\text{LactC} = 4,315 - 0,187X_1 \quad (14)$$

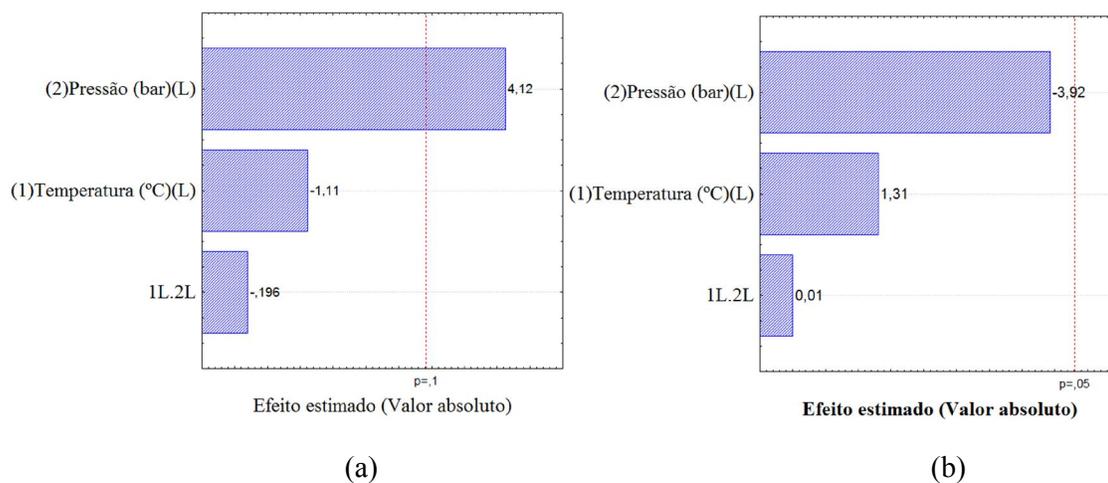
Onde a LactC é a lactose dos concentrados (g/100 mL) e  $X_1$  é a temperatura (°C).

**Figura 30** - Superfície de resposta (a); Curva de contorno (b) para a lactose (% m/v) dos concentrados de UF do soro de leite, obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2.



Para os permeados é possível observar pelo gráfico de Pareto (Figura 31a) um efeito significativo positivo ( $p < 0,10$ ) da pressão sobre a lactose, indicando que à medida aumenta-se a pressão tem-se um incremento na permeação de lactose, onde a mesma exerce maior força sob a superfície da membrana facilitando assim a passagem de água e de solutos com baixa massa molar como a lactose. Já para a rejeição de lactose, após análise estatística dos dados verificou-se que a temperatura e a pressão não exerceram efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) (Figura 31b).

**Figura 31** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para lactose (g/100 mL) dos permeados (a) e rejeição (%) (b), obtidos do planejamento fatorial  $2^2$  - Planejamento 2.



#### 4.2.2.7 Minerais totais

A Tabela 25 apresenta a matriz dos planejamentos fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) - Planejamentos 1 e 2, a resposta para os teores de minerais para os concentrados e permeados e os coeficientes de rejeição obtidos para ambos os planejamentos. Observa-se que ambos os planejamentos apresentaram teores semelhantes de minerais indicando assim que a temperatura não influencia na taxa de permeação e na concentração de minerais totais para a membrana de 100 kDa nesse sistema. Para as frações concentradas os teores variaram entre 0,43 a 0,50 g/100 mL enquanto que para os permeados os teores foram próximos a 0,48 g/100 mL. Palatnik et al. (2015), investigaram a recuperação de proteínas a partir de soro de leite caprino por UF com membrana de 10 kDa, obtiveram teores de cinzas para o concentrado e permeado de UF de respectivamente 0,51 e 0,41g/100g, resultados estes, semelhantes ao obtidos nos Planejamentos 1 e 2.

Não eram esperadas rejeições para os minerais uma vez que a membrana de 100 kDa apresenta tamanho de poro bem superior ao tamanho as partículas. No entanto, obteve-se uma rejeição média em ambos os planejamentos em torno de 22 %. A rejeição aparente observada deve se a formação de uma camada de bolo sob a superfície da membrana impedindo a passagem destes solutos. Mulder (2000) e Brans et al. (2004), enfatizam que em misturas com solutos de elevado peso molecular, quando a concentração do soluto é maior na superfície da membrana do que na alimentação e, principalmente, no permeado, isso pode resultar na formação de segunda barreira de filtração que funciona como uma membrana dinâmica o que acaba favorecendo a retenção de pequenas partículas que deveriam passar pela membrana.

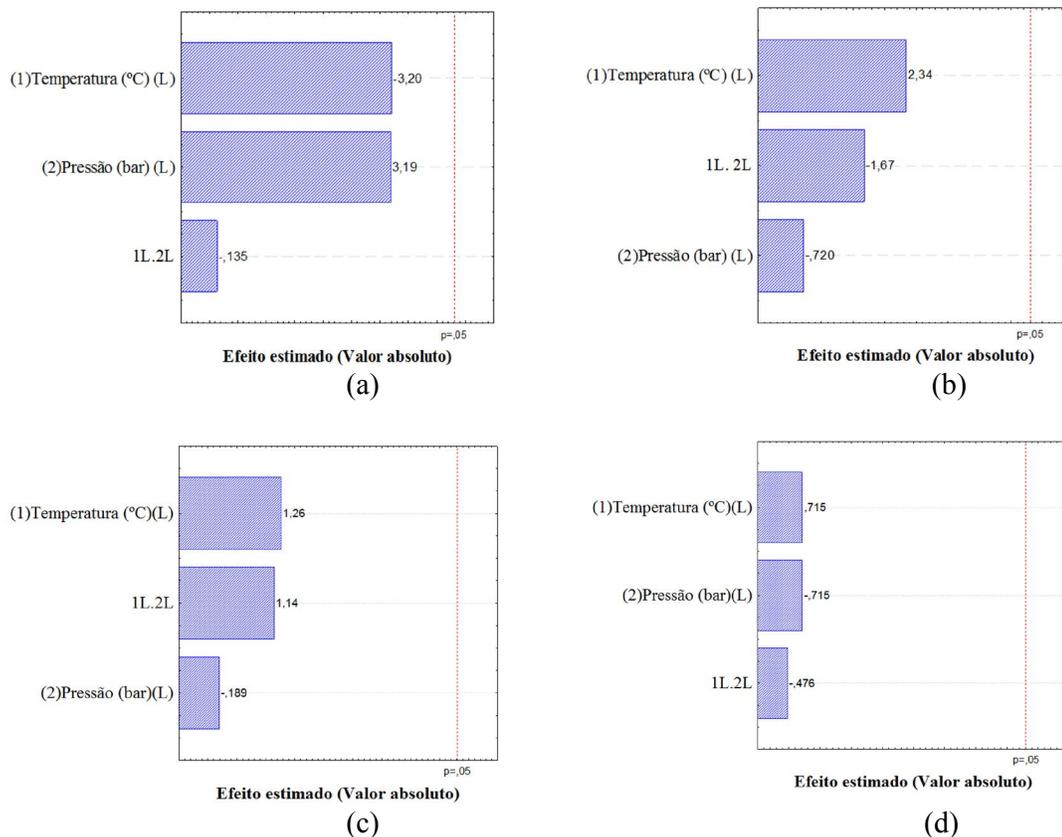
**Tabela 25** - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) – Planejamentos 1 e 2 e resposta em termos de minerais totais (g/100 mL) para concentrados, permeados e coeficiente rejeição (%), obtidos após UF.

Ensaio	Variáveis independentes*		Minerais Totais (g/100 mL)**		Coeficiente de Rejeição (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentrados	Permeados	
<b>Planejamento 1</b>					
1	20 (-1)	1,0 (-1)	0,46 <sup>a</sup> (±0,09)	0,47 <sup>a</sup> (±0,01)	21,67
2	40 (1)	1,0 (-1)	0,43 <sup>a</sup> (±0,07)	0,48 <sup>a</sup> (±0,06)	20,00
3	20 (-1)	3,0 (1)	0,47 <sup>a</sup> (±0,05)	0,47 <sup>a</sup> (±0,03)	21,67
4	40 (1)	3,0 (1)	0,46 <sup>a</sup> (±0,01)	0,48 <sup>a</sup> (±0,01)	20,00
5	30 (0)	2,0 (0)	0,47 <sup>a</sup> (±0,05)	0,49 <sup>a</sup> (±0,02)	18,33
6	30 (0)	2,0 (0)	0,48 <sup>a</sup> (±0,03)	0,49 <sup>a</sup> (±0,02)	18,33
7	30 (0)	2,0 (0)	0,47 <sup>a</sup> (±0,05)	0,47 <sup>a</sup> (±0,01)	21,67
<b>Planejamento 2</b>					
1	5 (-1)	1,0 (-1)	0,48 <sup>a</sup> (±0,04)	0,48 <sup>a</sup> (±0,01)	20,00
2	15 (1)	1,0 (-1)	0,48 <sup>a</sup> (±0,01)	0,49 <sup>a</sup> (±0,01)	18,33
3	5 (-1)	3,0 (1)	0,46 <sup>a</sup> (±0,04)	0,47 <sup>a</sup> (±0,03)	21,67
4	15 (1)	3,0 (1)	0,50 <sup>a</sup> (±0,01)	0,48 <sup>a</sup> (±0,01)	20,00
5	10 (0)	2,0 (0)	0,46 <sup>a</sup> (±0,04)	0,47 <sup>a</sup> (±0,01)	21,67
6	10 (0)	2,0 (0)	0,49 <sup>a</sup> (±0,01)	0,46 <sup>a</sup> (±0,03)	23,33
7	10 (0)	2,0 (0)	0,45 <sup>a</sup> (±0,06)	0,46 <sup>a</sup> (±0,01)	23,33

\*X<sub>1</sub>= Temperatura (°C); X<sub>2</sub>= Pressão (bar); \*\*médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% (Teste de t student) para concentrados e permeados. Variáveis independentes fixas: volume de alimentação (200 mL), tempo de UF 90 min.

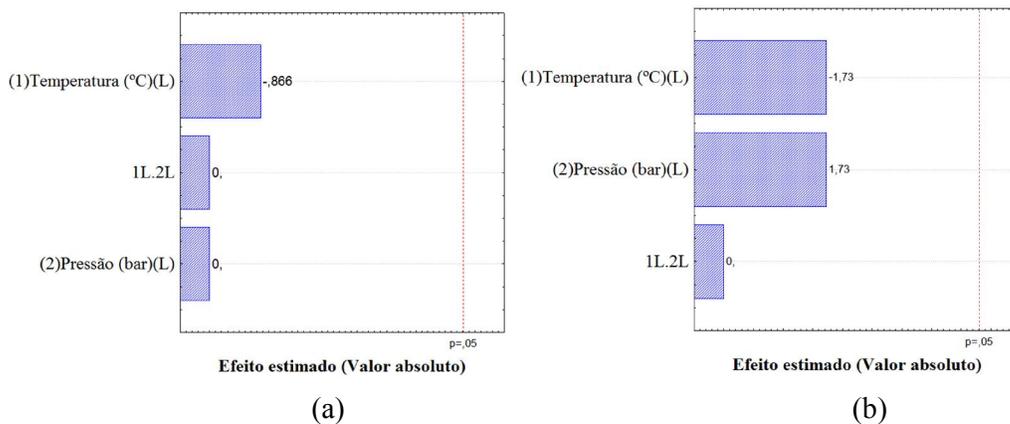
Após a análise estatística dos dados verificou-se que a temperatura e a pressão não exerceram efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) sobre o teor de minerais totais (g/100 mL) dos concentrados e permeados (Figura 32a -d) e que também não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os permeados e concentrados, já que a membrana empregada não é seletiva para minerais.

**Figura 32** - Gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para o teor de minerais totais (g/100 mL) dos concentrados (a-c) e permeados (b-d) obtidos após UF dos planejamentos fatoriais  $2^2$  - Planejamentos 1 e 2, respectivamente.



Para o coeficiente de rejeição, os dados foram tratados estatisticamente não sendo verificado influencia significativa ( $p > 0,05$ ) para ambos os planejamentos. Os efeitos podem ser visualizados de forma mais clara pela Figura 33a e 33b.

**Figura 33** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para rejeição de minerais totais (%) obtidos dos planejamentos fatoriais (a) Planejamento 1 e (b) Planejamento 2.

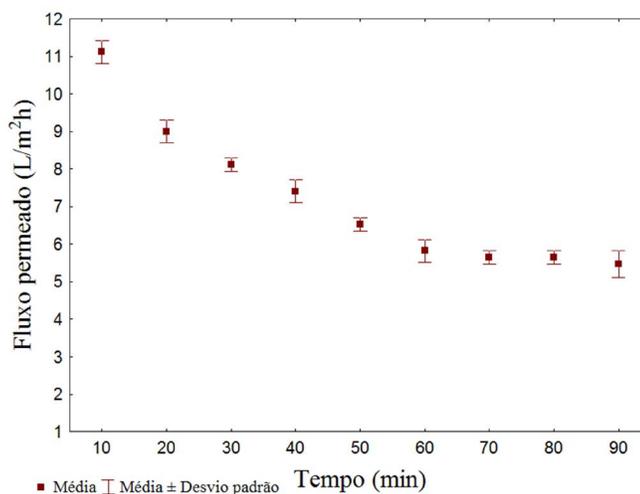


### 4.2.3 Fluxo de permeado obtido da UF de soro de leite com membrana de 50 kDa

Para a membrana de 50 kDa, as condições de 10°C e 2 bar foram testadas. Essas condições foram escolhidas com base nos resultados obtidos para o fluxo permeado de soro para a membrana de 100 kDa, no qual foi observado um fluxo limite para o processo a pressão de 2 bar, sendo o fluxo limite é aquele atingido quando um aumento de pressão não acarreta mais em um aumento de forma significativa no aumento do fluxo. Também a temperatura de 10°C parece ser mais indicada uma vez que a temperatura de 15°C foi verificada ainda uma tendência para pequenas acidificações do soro e temperaturas de 5°C resultaram em velocidades de fluxo inferiores.

A Figura 34 apresenta o fluxo permeado de soro de leite para a membrana de 50 kDa em função do tempo de filtração. O perfil de fluxo de permeado obtido mostra uma queda característica nos primeiros 10 min seguida por uma diminuição gradual de fluxo e por uma tendência para o estado estacionário.

**Figura 34** - Fluxo permeado de soro de leite ( $L/m^2h$ ) em função do tempo, para membrana de 50 kDa à temperatura de 10°C e pressão de 2 bar.



Alguns fenômenos atuam simultaneamente reduzindo o fluxo de permeado sendo possível identificar três fases distintas de declínio do fluxo. Nos primeiros 20 min de operação o fluxo permeado apresenta uma queda rápida e bastante acentuada devido principalmente a polarização de concentração que ocorre pelo aumento da concentração de sólidos próximo à superfície da membrana. Com o passar do tempo, ainda é observado a diminuição do fluxo (20 a 60 min), porém em menores dimensões. Esta queda contínua do fluxo é causada pela deposição e retenção de partículas, sob ou no interior dos poros da membrana, fenômeno este

conhecido como *fouling*. Após 60 min é observada uma diminuição mais lenta tendendo a ser estacionário, o qual pode ser devido a uma maior deposição de partículas ou a consolidação da camada de *fouling*.

Este comportamento está de acordo com Nigam et al. (2008), a diminuição inicial do fluxo é decorrente da polarização por concentração, geralmente inevitável em processos de separação com membranas sendo que a queda contínua do fluxo deve se ao depósito de partículas sob a superfície da membrana conhecido como *fouling*. Macedo et al. (2015), enfatizam que na UF no soro de leite bovino as proteínas (principalmente  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina) e minerais, especialmente, cálcio e fosfato, são os principais contribuintes para a *fouling* das membranas. Além disso, outros componentes reconhecidos como contaminantes a longo prazo que são os resíduos de processamento, tais como o coalho, lipídeos residuais, enzimas e microorganismos são propensos a adsorver sobre a superfície da membrana, ou promover a gelificação na camada polarizada ou ainda induzir a poro de bloqueio, tornando o *fouling* ainda mais complexo.

Após 90 min. de operação o fluxo de permeado teve uma redução de 50,80%, passando de 11,12 (L/m<sup>2</sup>h) no início do processo para 5,47 (L/m<sup>2</sup>h), evidenciando mais uma vez os fenômenos de polarização por concentração e *fouling*. Já com relação ao fluxo médio, a membrana de 50 kDa apresentou fluxo de 7,19 L/m<sup>2</sup>h, valor este 59,42% menor que o obtido para a membrana de 100 kDa nas mesmas condições (10°C e 2 bar), esta redução era esperada uma vez que a membrana apresenta tamanho de poro bem inferior, além disso as membranas apresentam diferenças em sua composição o que pode alterar o modo de interação do soro com o material da membrana.

#### **4.2.4 Caracterização do concentrado e permeado obtidos da UF de soro de leite com membrana de 50 kDa**

A Tabela 26 apresenta a caracterização físico-química do soro de leite *in natura* e das frações de concentrado e permeados, bem como o coeficiente de rejeição obtidos com membrana de 50 kDa a 10°C e 2 bar. Os valores de proteína obtidos para a membrana de 50 kDa mostraram se superiores para a fração concentrada e inferiores na fração permeada se comparada com a membrana de 100 kDa nas mesmas condições de UF. Em termos de percentual de concentração em relação ao soro *in natura* a membrana de 50 kDa apresentou concentração de aproximadamente 44 %, valor este cerca de 3 vezes maior que a obtida para a

membrana de 100 kDa o qual apresentou percentual de concentração de 16 %. O mesmo comportamento foi verificado para o teor de sólidos.

**Tabela 26** - Constituintes do soro de leite *in natura*, frações de concentrado e permeado e coeficiente de rejeição (%) obtidos por UF em membrana de 50 kDa a 10°C e 2 bar.

Constituintes	Soro <i>in natura</i>	Concentrado	Permeado	Rejeição (%)
Proteína (g/100 mL)	0,82 <sup>b</sup> ±0,03	1,46 <sup>a</sup> ±0,03	0,16 <sup>c</sup> ±0,02	80,48
Sólidos (g/100 mL)	5,81 <sup>b</sup> ± 0,03	6,78 <sup>a</sup> ± 0,02	4,15 <sup>c</sup> ± 0,09	28,57
Lactose (g/100 mL)	4,96 <sup>a</sup> ± 0,01	4,41 <sup>b</sup> ±0,08	4,16 <sup>c</sup> ± 0,0	16,12
Minerais (g/100 mL)	0,57 <sup>a</sup> ± 0,04	0,48 <sup>b</sup> ±0,03	0,49 <sup>b</sup> ±0,02	14,04
Condutividade (mS/cm)	5,68 <sup>a</sup> ± 0,04	5,61 <sup>a</sup> ± 0,06	5,77 <sup>a</sup> ± 0,09	-
Acidez (°Dornic)	12,67 <sup>a</sup> ± 0,57	13,33 <sup>a</sup> ± 0,57	13,00 <sup>a</sup> ± 0,50	-
pH	6,51 <sup>c</sup> ± 0,01	6,55 <sup>b</sup> ± 0,01	6,58 <sup>a</sup> ± 0,02	-

Médias (±desvio padrão) seguidas de letras iguais nas linhas não diferem à nível de 5% para soro *in natura* concentrado e permeado (Teste de Tukey).

Para os minerais totais, condutividade e acidez, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o soro de leite *in natura* e frações de concentrado e permeado, já para o pH as frações de permeado e concentrado apresentaram um leve aumento, diferindo estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Crowley et al. (2015), na UF de leite desnatado com membrana de polietersulfona de 1000 kDa e temperatura de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , também observaram após processamento que o pH das frações de concentrado e permeado foram ligeiramente mais altas do que a da alimentação, passando de 6,65 (alimentação) para 6,70 nas frações de concentrado e permeado.

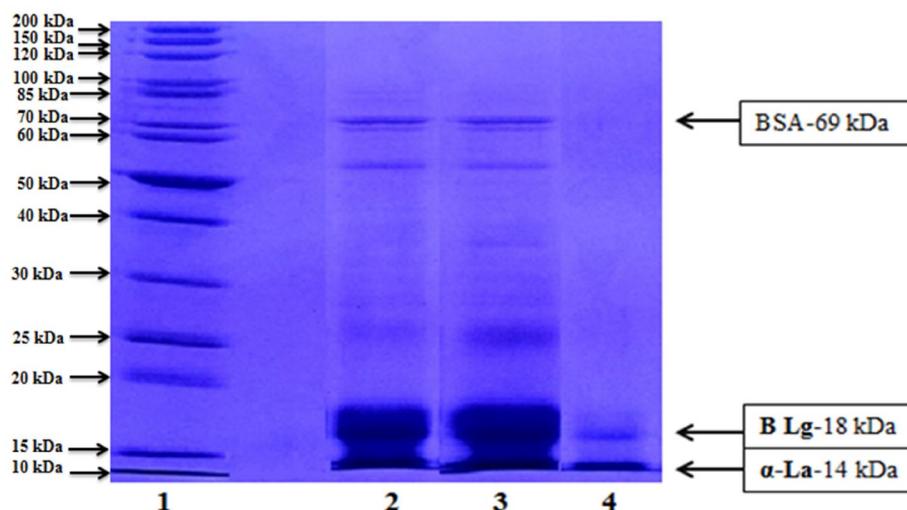
Ao comparar os resultados de proteína com os obtidos por Serpa (2012), utilizando membrana de 50 kDa, em fluxo tangencial e pressões e temperaturas variando 1,0 a 3,7 kgf.cm<sup>2</sup> e 25 a 52°C respectivamente, os valores para o concentrado foram inferiores (0,80 à 1,28 %). No entanto, Palatnik et al. (2015), ao utilizar membrana de 10 kDa e fluxo tangencial para ultrafiltrar soro de leite caprino, à 11°C, obteve após 30 min de processo teores de sólidos totais de 4,74 e 10,29 g/100g para a fração permeada e concentrada, respectivamente, sendo que no concentrado o valor é superior ao encontrado no presente estudo (6,8 g/100g), diferença esta atribuída ao tamanho de poro da membrana.

A membrana de 50 kDa apresentou uma rejeição para proteínas de 80,48 % valor este superior este a obtida para a membrana de 100 kDa (71,43 %) nas mesmas condições de processo, sendo este comportamento também verificado para sólidos e lactose. A maiores retenções para a membrana de 50 kDa são atribuídas principalmente ao menor tamanho de poro, para a lactose em específico a retenção observada dá se em função de mudanças na

seletividade da membrana ocasionado devido a deposição de componentes do soro que se depositam sobre a membrana, criando uma resistência adicional e impedindo a permeação das moléculas de lactose.

Para verificar os principais constituintes que representam as proteínas dos concentrados e permeados obtidos com a membrana de 50 kDa, foi realizada uma análise da eletroforese, sendo que a Figura 35 mostra a imagem do gel de eletroforese.

**Figura 35-** Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE para as amostras de concentrado e permeado da UF com membrana de 50 kDa. Da esquerda para a direita: Coluna 1: marcador de massa molar; Coluna 2: Soro *in natura*; Coluna 3: fração concentrada após UF; Coluna 4: Fração permeada após a UF.



Observa-se no gel de eletroforese que a amostra de permeado apresenta um sinal fraco para ambas as proteínas,  $\beta$ -lactoglobulina (18,3 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,2 kDa), indicando que as duas proteínas permearam pela membrana, o que era esperado uma vez que ambas possuem peso molecular inferior a 50 kDa. Para a fração concentrada e para a alimentação nota-se que além das proteínas  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, também é verificada banda correspondente a albumina de soro bovina (BSA) (69 kDa).

Além disso, verifica-se a presença de outras bandas características de proteínas minoritárias no soro, sub-frações com pesos moleculares variados, ou mesmo variações conformacionais das proteínas. Estas observações estão em conformidade com Haraguchi et al., (2006) os quais afirmam que as frações, ou peptídeos do soro, são constituídas de  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, BSA, imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptídeos (GMP), além de sub-frações ou peptídeos secundários que podem variar em tamanho, peso molecular. Hong et al., (2002)

também encontraram sinais intermediários entre as bandas do BSA e da  $\beta$ -Lg e consideraram que eles correspondem a conformações que as proteínas adquirem no soro. Souza (2013) em estudo sobre a concentração das proteínas do soro de leite bovino por UF com membrana cerâmica de massa molar de corte de 20 kDa, verificou a presença de 14 cadeias polipeptídicas tanto na alimentação quanto no soro concentrado por membrana. Já no permeado da UF foram verificadas duas cadeias polipeptídicas, referentes às proteínas majoritárias no soro de leite  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La.

Em síntese, a viabilidade do processo de concentração de proteína de soro de leite por membranas depende, em grande parte, das condições envolvidas, como as propriedades da membrana, tipo de escoamento, afinidade membrana-soluto, temperatura da solução, pressão entre outros.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, pôde-se concluir que:

- Para as mesmas condições operacionais (temperatura e pressão), os fluxos para o soro de leite foram inferiores aos observados para a água devido à presença de sólidos no soro. Além disso, o fluxo de permeado de soro diminuiu com o tempo de operação devido à polarização por concentração e *fouling*.

- A membrana de 50 kDa apresentou fluxo médio de 7,19 L/m<sup>2</sup>h, valor este 59,42% menor que o obtido para a membrana de 100 kDa nas mesmas condições (10°C e 2 bar). Em relação ao soro de leite *in natura* a membrana de 50 kDa apresentou percentual de concentração de aproximadamente 44%, valor este cerca de 3 vezes maior que a obtida para a membrana de 100 kDa nas mesmas condições de processo.

- Temperaturas menores de 15°C são recomendadas para manter a estabilidade quanto a acidez e lactose das frações do soro de leite, porém ocorre um aumento da resistência da membrana e conseqüentemente acréscimo no tempo de processamento. A aplicação da UF do soro de leite a temperaturas de refrigeração torna-se uma alternativa interessante, visto que temperaturas de UF mais elevadas podem levar a degradação de compostos presentes no soro e a sua acidificação podendo o tornar inviável para sua aplicação em produtos alimentícios.

Tendo em vista que o presente estudo foi realizado em sistema de bancada com escoamento convencional e membrana plana de 100 e 50 kDa, a viabilidade do processo dependerá de um *scale up*, empregando preferencialmente um escoamento tangencial e membrana cerâmica, o que reduziria tempos de operação, etapas de limpeza e fenômenos de polarização por concentração e *fouling*.

A recuperação de constituintes do soro de leite por UF é de grande interesse para a indústria, sendo este uma alternativa de agregação de valor ao subproduto da indústria láctea. Os concentrados obtidos por ultrafiltração em escala de bancada apresentaram uma retenção média de proteínas de 55 à 80 % para membrana de 100 e 50 kDa, respectivamente, indicando a possibilidade de utilização em indústrias alimentícias, tais como: em misturas de pães, bolachas, bebidas lácteas, na produção de concentrados proteicos, entre outros fins. Já o permeado rico em lactose pode ser utilizado para produção de lactose, galactose, glucose, álcool, ácido lático, meios de cultura e também na indústria farmacêutica ou na recuperação de proteínas e lactose empregando membranas de UF com menores MMC, ou NF e OI.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Através da experiência adquirida no presente estudo, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Repetir o fracionamento, reduzindo o tamanho das membranas utilizadas (10 a 20 kDa) a fim de concentrar principalmente a  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina.
- Ampliação de escala (planta piloto), definindo fator de concentração e operando em conjunto com diafiltração para melhorar a purificação das proteínas com a utilização de membranas tubular ou cerâmica.
- Realizar a concentração das frações isoladas (fracionamento/purificação) mediante secagem por atomização (*Spray dryer*), otimizando as condições operacionais da atomização (pressão, vazão e temperatura).
- Utilizar os processos de separação com membranas associados entre si ou com outras técnicas de separação para aproveitar todos os componentes do soro.
- Avaliar as propriedades funcionais dos concentrados proteicos (solubilidade proteica; índice de atividade emulsificante; expansão e estabilidade espumante).

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRASOUL, A.; DOAN; H.; LOHI, A. **Fouling in membrane filtration and remediation methods**. In: NAKAJIMA, H. Mass transfer – Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling. InTech, cap. 4, 2013.
- ALMÉCIJA, M.C.; GUADIX, A.; MARTINEZ-FEREZ, A.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; GUADIX, E.M. A flux enhancing pretreatment for the ultrafiltration of acid whey. **Desalination**, v. 245, p.737-742, 2009.
- ALMÉCIJA, M.C.; IBÁÑES, R.; GUADIX, A.; GUADIX E.M. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. **Journal of Membrane Science**, v.288, p.28-35, 2007.
- ALMÉCIJA, M.C.; IBÁÑES, R.; GUADIX, A.; GUADIX E.M. Influence of pH in the recovery of lactoferrin from whey with ceramic membranes. **Desalination**, v. 200, p.475–476, 2006.
- ALMEIDA, C.C.; JÚNIOR, C.A.C.; SILVA, A. C. O; ALVARES, T.S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p.1840-1854, 2013.
- ALVES, M.P.; MOREIRA, R. O.; JÚNIOR, P.H.R.; MARTINS, M.C.F.; ÍTALO TULER PERRONE, I. T.; CARVALHO, A.F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Ed. Manole, p.142, 2003.
- ANTUNES, V.C .Use of microfiltration to improve the quality and extend the shelf life of pasteurized milk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.17. n.1, p.75-86, 2014.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18.ed. Maryland: AOAC, 2005.
- ARANHA, F. Q.; BARROS, Z. F.; MOURA, L. S. A.; GONÇALVEZ, M.C.R.; BARROS, J.C.; METRI, J.C.; SOUZA, M.S. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas do idoso. **Revista nutrição**, v.13, n.2, p.89-97, 2000.
- ARGUELLO, M.; ÁLVAREZ, S.; RIERA, F.A.; ÁLVAREZ, R. Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes fouled by whey protein. **Journal agriculture food chemical**, V.50 P. 1951-1958, 2002.
- ARUNKUMAR, A.; ETZEL, M.R. Negatively charged tangential flow ultrafiltration membranes for whey protein concentration. **Journal of Membrane Science**, v.475, p.340–348, 2015.

- ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 325-332, 2005.
- BÁGUENA, M.J.C.; BLANCO, S.A.; VELA, M.C.V. Cleaning of ultrafiltration membranes fouled with BSA by means of saline solutions. **Separation and Purification Technology**, v.125, p. 1-10, 2014.
- BÁGUENA, M.J.C.; BLANCO, S.A.; VELA, M.C.V. Fouling mechanisms of ultrafiltration membranes fouled with whey model solutions. **Desalination**, v. 360, p. 87-96, 2015.
- BALD, J. A.; VINCENZI, A.; GENNARI, A.; LEHN, D.N.; SOUZA, G F.V. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no vale do taquari, rs. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 4, n. 1, p. 90-99, 2014.
- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 163f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011a.
- BALDASSO, C.; KANAN, J.H.C.; TESSARO, I.C. An investigation of the fractionation of whey proteins by two microfiltration membranes with nominal pore size of 0,1 $\mu$ m. **International Journal of Dairy Technology**, V.64, P.343-349, 2011b.
- BARBOSA, A.S.; FLORENTINO, E.R.; FLORÊNCIO, I.M.; ARAÚJO, A.S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: Estudo Cinético de produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.5, n.1, p.07- 25, 2010.
- BARUKCIC, I.; BOZANIC, R.; KULOZIK, U. Effect of pore size and process temperature on flux, microbial reduction and fouling mechanisms during sweet whey cross-flow microfiltration by ceramic membranes. **International Dairy Journal**, v.39, n.1, p.08-15 2014.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v.73, p.149-161, 2015.
- BRANS, G. **Design of membrane systems for fractionation of particles suspensions**. PhD Thesis, Wageningen University, Netherlands, 2006.
- BRANS, G.; SCHROEN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v 243, p. 263–272, 2004.

- BRIÃO, V.B., TAVARES, C.R.G. Ultrafiltração de água de enxágue modelo da indústria de laticínios para a recuperação de nutrientes: efeito da pressão e da velocidade tangencial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.4, p. 352-362, 2012a.
- BRIÃO, V.B.; TAVARES, C.R.G. Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 393- 407, 2012b.
- BUTYLINA, S., LUQUE, S. Y NYSTRÖM, M. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v.280, p. 418-426, 2006.
- CAMPOS, T.C.A.S; D'ALMEIDA, W.K.; ALEGROC, L.C.A; ROIG, S.M.; SUGUIMOTOE, H.H. Use of  $\beta$ -galactosidase on Hydrolysis of Milk Lactose in Low Temperature. **UNOPAR Científica Ciênc. Biol. Saúde**, v.11, n.4, p. 51-54, 2009.
- CARVALHAES, L. A. **Queijos no mundo: origem e tecnologia**. Juiz de Fora: ILCT, v. 1, 2002.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Review- Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p.385-396, 2013.
- CARVALHO, J.M. **Recuperação de Ácido Láctico por Filtração Tangencial**. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Técnica de Lisboa, 2008.
- CATARINO, I.; MARTINS, A.P.L.; DUARTE, E.; PRUDENCIO, E.S.; PINHO, M.N. Rennet coagulation of sheep Milk processed by ultrafiltration at low concentration factors. **Journal of Food Engineering**, v.114, p.249-254, 2013.
- CHANDRAPALA, J.; DUKE, M.C.; CINZENT, S,R.; ZISU, B.; WEEKS, M.; PALMER,M.; VASILJEVIC, T. Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *Journal of Dairy Science*, v.98, n.7, p.4352-4363, 2015.
- CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. **Chemical Engineer ingand Processing**, v.46, p.398-404, 2007.
- CORREIA, L. F. M.; MAUBOUIS, J. L.; CARVALHO, A. F. Aplicações de membranas na indústria de laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 15, p. 74-78, 2011.
- CROWLEY, S.V.; CALDEO, V.; McCARTHY, N.A.; FENELON, M.A.; KELLY, A.L.; O'MAHONY,J.A. Processing and protein-fractionation characteristics of different polymeric membranes during filtration of skim milk at refrigeration temperatures. **International Dairy Journal**, v.48, p.23-30, 2015.
- DE WIT, J.N. **Lectures's handbook of whey and whey products**. Brussels: European Whey Products Associanton, 2001.

- DIBLÍKOVÁ, L.; CURDA, L.; KINCL, J. The effect of dry matter and salt addition on cheese whey demineralization. **International Dairy Journal**, v.31, p.29-33, 2013.
- DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v.112, p.929-935, 2009.
- EDWARDS, P.J. B.; JAMESON, G.B. **Structure and stability of whey proteins**. In: THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. Milk proteins: from expression to food. New York: Elsevier, 2009.
- FAEDO, R.; BRIÃO, V.B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI, A. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática, **Revista CIATEC**, v.3, n.1, p.44-54, 2013.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Práticas** - 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- GALANAKIS, C.M.; CHASIOTIS, S.; BOTSARIS, G.; GEKAS, V. Separation and recovery of proteins and sugars from Halloumi cheese whey. **Food Research International**, v.65, p.477-483, 2014.
- GAÚCHE, C.; BARRETO, P.L.M.; BORDIGNON, M.T.L. Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase: Implications for functionality in processed dairy foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n.2, p. 214-219, 2010.
- GIACOBBO, A. **Biorreator à Membrana Aplicado ao tratamento de Efluentes**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), Porto Alegre, 2010.
- GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNANDEZ, H, L., MIRANDA, M, V., CAMPERI Y., CASCONI, O. Que hacer com elsuero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, 1997.
- GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375- 384 2010.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. E- papers, Rio de Janeiro, 2006.
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Nutrição**, v.19, n.4, p.479-488, 2006.
- HOLDER, L.; WEIK, J.; HINRICHS, J. A study of fouling during long-term fractionation of functional peptides by means of cross-flow ultrafiltration and cross-flow electro membrane filtration. **Journal of Membrane Science**, v.446, p. 440-448, 2013.

- HONG, Y. H.; CREAMER, L. K. Changed protein structures of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin as a consequence of heat treatment. **International Dairy Journal**, v. 12, p.345-359, 2002.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 2005.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5 ed. New York: Chapman e Hall, 1996.
- KELLNER, R.L. **Biorreator à membrana de leite móvel em bateladas sequenciais para a remoção de nutrientes e matéria orgânica de efluentes sanitários**. 2014. 146f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2014.
- KHEM, S. SMALL, D.M.; MAY, B.K. The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. **Food Chemistry**, v.190, p.717-723, 2015.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: Teorias e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LE, T.T.; CABALTICA, A.D.; BUI, V.M. Membrane separations in dairy processing. **Journal of Food Research and Technology**, v. 2, n. 1, p. 01-14, 2014.
- LEIDENS, N. **Concentração das proteínas do soro de leite de ovelha por ultrafiltração e determinação das propriedades funcionais dos concentrados proteicos**. 2013. 134f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- LEIFELD, V. **Tratamentos clássicos de precipitação de proteínas aplicados a soro de leite visando decréscimo do potencial contaminante do efluente**. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em química), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.
- LEITE, M.T.; BARROZO, M.A.S.; RIBEIRO, E.J. Canonical analysis technique as an approach to determine optimal conditions for lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2012, p.01-09, 2012.
- LIU, D.Z.; SEMANAS, M.G.; DUSTAN, D.E.; JO, G.M. Alterations to the composition of casein micelles and retentate serum during ultrafiltration of skim milk at 10 and 40 °C. **International Dairy Journal**, v.35, n.1, p.63-69, 2014.
- LUCENA, M.E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C.; RIERA, F. A.; ALVAREZ, R.  $\alpha$ -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. **Separation and Purification Technology**, v.52, p.446-453, 2007.

- MACEDO, A.; DUARTE, E.; FRAGOSO, R. Assessment of the performance of three ultrafiltration membranes for fractionation of ovine second cheese whey. **International Dairy Journal**, v.48, p.31-37 2015.
- MACEDO, A.; DUARTE, E.; PINHO, M. The role concentrations polarization in ultrafiltration of ovine cheese whey. **Journal of Membrane Science**, v.381, p34-40, 2011.
- MAESTRI, R. S. **Biorreator à membrana como alternativa para o tratamento de esgotos sanitários e reuso da água**. 2007. 101 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Ambiental) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, 2007.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy products**. Woodhead Publishing, England, 2003.
- MELLO, B. C. B.S.; PETRUS, J. C. C; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.166-172, 2010.
- METSÄMUURONEN, S.; NYSTRÖM, M. Enrichment of  $\alpha$ -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v.337, p. 248-56. 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; McBEAN, L.D. **Handbook of dairy products and nutrition**, 2 ed, CRC Press LLC, Illinois, 2000.
- MULDER, M. **Basic principles of Membrane Technology**. 2.ed. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000.
- NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J. R. F.; SPADOTI, L. M.; PIZAIA, P. D.; ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.177-182, 2003.
- NASCIMENTO, W.W.G.; BELL, M.J.V.; ANJOS, V.C.; FURTADO, M.A.F. Use of electric conductivity measurements for the detection of addition of water, sodium chloride and caustic soda in milk. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.65, n.375, p.11-17, 2010.
- NIGAM, M.O.; BANSAL, B.; CHEN, X.D. *Fouling* and cleaning of whey protein concentrate fouled ultrafiltration membranes. **Desalination**, v.218, p.313-322, 2008.
- OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, n.385, p. 64-71, 2012.
- ORDONEZ PEREDA, J. A. Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal. vol. 2. Porto Alegre: ARTMED, 2005.

- PA'EE, K.F.; GIBSON, T.; MARAKILOVA, B.; JAUREGI, P. Production of acid whey hydrolysates applying an integrative process: Effect of calcium on process performance. **Process Biochemistry**, v.50, n.2, p.302-310, 2015.
- PAGNO, C.H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I.C.; FLORES, S.H.; JONG, E.V. Obtenção de concentrados proteicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais e tecnológicas. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p.231-239, 2009.
- PALATNIK, D. R.; PORCEL, M. V. O.; GONZÁLEZ, U.; ZARITZKY, N.; CAMPDERRÓS, M.E. Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, p.331-338, 2015.
- PAN, K.; SONG, Q.; WNG, L.; CAO, B. A study of demineralization of whey by nanofiltration membrane. **Desalination**, v.267, p.217-221, 2011.
- PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v.105, n.01, p.1-14, 2007.
- PELEGRINI, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal Food Technology**, v.62, n.6, p.1004-1011, 2008.
- PESCUMA, M.; HÉBER, E.M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G.F. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.73-81, 2010.
- PETRUS, J. C. C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para clarificação de suco de frutas**. 1998. 139f. Tese (Doutorado em Engenharia), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- POPPI, F.A.; COSTA, M.R.; DE RENSIS, C, M, V, B.; SIVIERI, K. Soro de leite e suas proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Ciências Biológicas da Saúde**, v.12, n.2, p.31-37, 2010.
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p.48-68, 2012.
- RACOSKI, J.C.; FAION, A.M.; STEFFENS, C.; VALGUDA, E.; STEFFENS, J. Estudo do comportamento de membranas para obtenção de leite de ovelha ultrafiltrado em escala laboratorial e piloto. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v.6, n.1, p.135-142, 2014.
- RAZI, B.; AROUJALIAN, A.; FATHIZADEN, M. Modeling of fouling layer deposition in cross-flow microfiltration during tomato juice clarification. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, p. 841-848, 2012.
- REKTOR, A., VATAI, G., Membrane filtration of Mozzarella whey. **Desalination**, v.162, p. 279-286, 2004.

- ROMÁN, A.; WANG, J.; CSANÁD, J.; HODÚR, C.; VATAI, G. Experimental Investigation of the Sweet Whey Concentration by Nanofiltration. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p. 702-9, 2011.
- ROSA, L. S; QUEIROZ, M.I; AUGUSTO, M. M. M. Efeito da pré-fermentação e ultrafiltração nas características físico-químicas do queijo tipo prato. **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.1, p.119-128, 2010.
- SANTOS, J.S.; MACIEL, L.G.; SEIXAS, V.N.C. Processo de separação por membrana (PSM): aplicação da tecnologia na indústria láctea. **Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v.1, n. 01, p. 208-225, 2014.
- SANTOS, M.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, v.879, p.475-479, 2011.
- SAXENA, A.; TRIPATHI, B.P.; KUMAR, M.; SHAHI, V.K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.145, p.1-22, 2009.
- SERPA, L. **Uso de membranas no tratamento do soro lácteo e seu aproveitamento para produção de poli-hidroxicarboxilatos (phas)**. 2012. 158f. Tese (Doutorado em Engenharia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2. 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo, p.1-10, 2009.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p.397-409, 2004.
- SGARBIERI, V.C., Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 43-56, 2005.
- SHAMES, Irving Herman. **Mecânica de fluidos**. 3. ed. Bogotá: McGraw-Hill, 1995.
- SHENVI, S.S.; ISLOOR, A.; ISMAIL, A.F. A review on RO membrane technology: Developments and challenges. **Desalination**, v.368, p. 10-26, 2015.
- SHI, X; TAL, G.; HANKINS, N.P.; GITIS, V. Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v.1, p.121-138, 2014.
- SILVA, A.N.; PEREZ, R.; MINIM, V.P.R.; MARTINS, D.D.S.A.; MINIM, L.A. Integrated production of whey protein concentrate and lactose derivatives: What is the best combination. **Food Research International**, v.73, p.62-74, 2015.

- SILVA, H. C. **Concentração do leite por nanofiltração, produção do queijo tipo coalho e caracterização tecnológica**. 2013. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2013.
- SLUKOVÁ, M.; HINKOVÁ, A.; HENKE, S.; SMRZ, F.; LUKACÍKOVÁ, M.; POUR, V.; BUBNÍK, Z. Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation. **Journal of Food Engineering**, v.172, p.38-47, 2016.
- SMITHERS, G. Review Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v 18, p.695-704, 2008.
- SMITHERS, G.W. Whey-ing up the options -Yesterday, today and tomorrow. **International Dairy Journal**, v.48, p. 2-14, 2015.
- SOUZA, R. S. C. de. **Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano de proteínas do soro de leite concentradas por membranas e hidrolisadas por diferentes enzimas comerciais**. 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.
- SOUZA, R.R.; BERGAMSCO, R.; COSTA, S.C.; FENG, X.; FARIA, S.H.B.; GIMENES, M.L. Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, n.11, p.1137-1143, 2010.
- SPACHOS, T.; STAMATIS, A. Thermal analysis and optimization of an anaerobic treatment system of whey. **Renewable Energy**, v.36, p.2097-2101, 2011.
- STEINHAEUER, T.; HANÉLY, S.; BOGEDORFER, K.; KULOZIK, U. Temperature dependent membrane fouling during filtration of whey and whey proteins. **Journal of Membrane Science**, v.492, p.364-370, 2015b.
- STEINHAEUER, T.; SCHWING, J.; KRAUB, S.; KULOZIK, U. Enhancement of ultrafiltration-performance and improvement of hygienic quality during the production of whey concentrates. **International Journal Dairy**, v.45, p.08-14, 2015a
- STRATHMANN, A. Membrane Separation Processes: Current Relevance and Future Opportunities. **AIChE Journal**, v. 47, n.5, p. 1077-1087, 2001.
- SVANBORG, S.; JOHANSEN, A.G.; ABRAHAMSEN, R. K.; SKEIE, S. B. Initial pasteurisation effects on the protein fractionation of skimmed milk by microfiltration. **International Dairy Journal**, v.37, n.1, p. 26-30, 2014.
- WIBISONO, Y.; CORNELISSEN, E.R.; KEMPERMAN, A.J.B.; DER MEER, W.G.J.V.; NIJMEIJER, K. Two-phase flow in membrane processes: A technology with a future. **Journal of Membrane Science**, v.453, p.566-602, 2014.

YEE, K. W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 290, p.125–130, 2007.

ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALAS-MELADO, M. L. M. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p. 100-105, 2010.

ZUÑIGA, A. D. G, COIMBRA, J. S. R., GOMES, J. C., MINIM, L. A., ROJAS, E. E. G., GADE, A. D. Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.59, p.53-66, 2004.

ZUÑIGA, A.D. G; COIMBRA, J. S. R.; GOMES, J. C.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, n.325, v.57, p.35-46, 2002.

## APÊNDICE A - MÉTODOS ANALÍTICOS

### A.1. ANÁLISE DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

#### **Preparo das amostras**

As amostras foram preparadas segundo procedimentos descritos Laemmli (1970), foi adicionado 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) em 100 µL das amostras a serem aplicadas no gel, contidas em tubos de centrífuga do tipo *ependorfs*. Esta solução foi armazenada em freezer durante aproximadamente 8 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g, 4 °C por 30 min, retirado o sobrenadante, tomando cuidado para que o *pellet* não fosse desfeito. Foi adicionado 100 µL de uma solução aquosa gelada de acetona 90 %, a fim de lavar o *pellet* sem desfazê-lo, sendo este centrifugado como na etapa anterior. Novamente, o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 µL de acetona 90 % gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuscitado com 50 µL do tampão da amostra (β-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 10 min.

#### **Preparo do gel de resolução 15 %**

Em um béquer foram adicionados 4,925 mL de acrilamida / bis-acrilamida (30:0,8; m/m), 5 mL da solução tampão Tris-HCl 0,75 M pH 8,8, 75 µL da solução de persulfato de amônio 10 % e 5 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED). Todos estes componentes foram misturados e transferidos para a célula de eletroforese, deixando aproximadamente 2,5 cm da célula livre, o restante da célula foi completada com água destilada para formar uma linha reta sobre o gel, e deixado-o polimerizar por 40 min em temperatura ambiente, após a polimerização do gel a água foi retirada (LAEMMLI, 1970).

#### **Preparo do gel de empilhamento 12 %**

Em um béquer foi adicionado 0,5 mL de acrilamida/bis acrilamida (30:0,8 m/m), 2,5 mL da solução tampão Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, 1,925 mL de água destilada, 75 µL da solução de persulfato de amônio e 7,5 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED). Todos estes componentes foram misturados e transferidos para a célula de eletroforese, sobre o gel de resolução que já estava polimerizado. Antes de aplicar o gel de empilhamento, o pente foi colocado para a formação dos poços para a aplicação das amostras. Depois da completa

polimerização do gel de empilhamento (cerca de 30 min), o pente foi retirado (LAEMMLI, 1970).

### **Aplicação das amostras**

Após a polimerização do gel as amostras foram adicionadas. No primeiro poço foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  do padrão de massa molar (Fermentas Life Sciences), e nos outros poços foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  das amostras a serem analisadas.

A célula de eletroforese foi acomodada na cuba de eletroforese vertical e preenchida com tampão de corrida (contendo: 14 g de glicina, 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 3 g de Tris base e 1000 mL de água destilada) de modo a cobrir os poços do gel de empilhamento. A cuba foi fechada e ligada a uma fonte de alimentação de energia com corrente constante de 30 A e uma voltagem de 250 V, num tempo de aproximadamente 1 h para as amostras percorrerem o gel.

Após a corrida, o gel de empilhamento foi removido, e o gel de resolução foi corado com solução corante azul brilhante (Blue R-250) durante aproximadamente 24 horas, até perfeita visualização das bandas. No dia seguinte, descorar o gel lavando com água destilada a 100°C (micro-ondas) várias vezes. Guardar o gel em pote com água destilada.

## A.2. ANÁLISE DE LACTOSE - MÉTODO DO ÁCIDO DINITROSSALICÍLICO - DNS

### **Procedimento da análise**

- Preparar uma solução de DNS: 0,25 gramas de Ácido 3,5-dinitrosalicílico e 75,0 gramas de Tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 50 mL de NaOH2M. e 250 mL de água.
- Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de padrão, amostra ou controle a 2 mL de solução DNS.
- Aquecer a mistura em banho-maria a 100°C por 10 min.
- Esperar esfriar e ler a absorbância à temperatura ambiente e a 570 nm.
- Aplicar o valor da leitura na respectiva equação da curva-padrão previamente elaborada para o aparelho.

Obs: Sensibilidade do método de 0,3 a 30 mM de lactose.

### **Metodologia para obtenção da curva-padrão para açúcares redutores**

- Preparar uma solução de lactose 5 g/L.
- Diluir para concentrações desejadas (Ex: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 g/L).

- Colocar em tubo de ensaio: 200  $\mu$ L da solução contendo o açúcar + 2 mL do reagente DNS.
- Preparar uma solução sem lactose, contendo H<sub>2</sub>O e DNS para zerar o aparelho.
- Deixar os tubos em banho-maria a 100°C por 10 minutos.
- Esperar esfriar até atingir a temperatura ambiente.
- Ler a absorbância em espectrofotômetro a 570 nm.

Obs: A curva-padrão somente se aplica para leituras no aparelho em que foi estabelecida.

## APÊNDICE B - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS PLANEJAMENTOS 1 e 2

**Tabela 1B** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial  $2^2$  para o fluxo médio de soro de leite (L/ m<sup>2</sup>h) - (planejamento 1).

	Coef. de regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média*	21,24	0,068	312,87	0,00001
(1)Temperatura*	1,05	0,089	11,783	0,0071
(2)Pressão*	3,65	0,089	40,587	0,0006
1L x 2L	-0,323	0,089	-3,6005	0,0692

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 2B** - Análise de variância para o fluxo médio de soro de leite (L/m<sup>2</sup>h) do planejamento fatorial  $2^2$  - (planejamento 1).

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	57,667	2	28,833	17,43
Resíduo*	6,618	4	1,6545	
Falta de ajuste	6,554	2		
Erro puro	0,0646	2		
Total	64,286	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro;  $F_{tab,95\%}=6,94$ ; Coeficiente de correlação: R=0,95.

**Tabela 3B** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial  $2^2$  para o fluxo médio de soro de leite (L/ m<sup>2</sup>h) - (planejamento 2).

	Coef. de regressão	Erro padrão	t (2)	p
Média	17,02	0,011	1501,15	0,0000
(1)Temperatura*	0,64	0,015	42,67	0,0005
(2)Pressão*	1,64	0,015	109,33	0,00008
1L x 2L	-0,040	0,015	-2,67	0,116

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 4B** - Análise de variância para o fluxo médio de soro de leite (L/m<sup>2</sup>h) obtido planejamento fatorial  $2^2$  - (planejamento 2).

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	12,39	2	6,198	9,377
Resíduo*	2,64	4	0,661	
Falta de ajuste	2,64	2		
Erro puro	0,0018	2		
Total	15,040	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro;  $F_{tab,95\%}=6,94$ ; Coeficiente de correlação: R=0,91.

**Tabela 5B** - Resultados do coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para o teor de proteína (g/100 mL) dos concentrados de soro de leite - (planejamento 1).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	1,083	0,007	143,31	0,000049
(1)Temperatura	-0,010	0,010	-1,083	0,3918
(2)Pressão*	0,043	0,010	4,333	0,0493
1L x 2L	-0,0008	0,010	-0,083	0,9417

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 6B** - Análise de variância para o teor de proteína % (m/v) nos concentrados de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 1).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	0,0075	1	0,0075	24,94
Resíduo*	0,0015	5	0,0003	
Falta de ajuste	0,0007	3		
Erro puro	0,0008	2		
Total	0,0090	6		

Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=6,61; Coeficiente de correlação: R=0,91.

**Tabela 7B** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para o teor de proteína (g/100 mL) dos concentrados de soro de leite - (planejamento 2).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	1,138	0,0050	226,79	0,000019
(1)Temperatura	-0,001	0,0066	-0,225	0,8423
(2)Pressão*	0,165	0,0066	24,926	0,0016
1L x 2L	-0,006	0,0066	0,903	0,9417

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 8B** - Análise de variância para o teor de proteína % (m/v) nos concentrados de soro de leite, do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 2).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	0,1096	1	0,109561	28,581
Resíduo*	0,0192	5	0,003833	
Falta de ajuste	0,01881	3		
Erro puro	0,00035	2		
Total	0,12872	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=6,61; Coeficiente de correlação: R=0,92

**Tabela 9B-** Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para sólidos totais (g/100 mL) dos concentrados de soro de leite - (planejamento 1).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	6,092	0,006	1.055,19	0,000001
(1) Temperatura(°C)*	0,094	0,008	12,33	0,0065
(2) Pressão(bar)*	0,481	0,008	62,96	0,0003
1L x 2L*	0,123	0,008	16,04	0,0039

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 10B -** Análise de variância para o teor de sólidos totais %(m/v) nos concentrados de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 1).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	1,020	3	0,340099	695,093
Resíduo*	0,001	3	0,000489	
Falta de ajuste	0,001	1		
Erro puro	0,00046	2		
Total	1,022	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=9,27; Coeficiente de correlação: R=0,99

**Tabela 11B-** Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para sólidos totais (g/100 mL) dos concentrados de soro de leite - (planejamento 2).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	5,9907	0,0037	1584,99	0,0000001
(1) Temperatura (°C)	0,0187	0,005	3,75	0,064
(2) Pressão (bar)*	0,0537	0,005	10,75	0,008
1L x 2L	0,0037	0,005	0,75	0,531

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 12B -** Análise de variância para o teor de sólidos totais % (m/v) nos concentrados de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 2).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	0,0116	1	0,011556	25,50
Resíduo*	0,0023	5	0,000453	
Falta de ajuste	0,0020	3		
Erro puro	0,0002	2		
Total	0,0138	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=6,61; Coeficiente de correlação: R=0,91.

**Tabela 13B** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para sólidos totais (g/100 mL) dos permeados de soro de leite - (planejamento 2).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	4,5278	0,0037	1197,95	0,00001
(1) Temperatura (°C)*	0,0287	0,005	5,75	0,028
(2) Pressão (bar)*	0,0887	0,005	17,75	0,003
1L x 2L	-0,1375	0,005	-2,75	0,110

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 14B** - Análise de variância para o teor de sólidos totais % ( m/v) nos permeados de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 2).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	0,0348	2	0,017406	19,72
Resíduo*	0,0035	4	0,000883	
Falta de ajuste	0,0033	2		
Erro puro	0,0002	2		
Total	0,0383	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=6,94; Coeficiente de correlação: R=0,95.

**Tabela 15B** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para rejeição de sólidos totais (%) de soro de leite - (planejamento 2).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	19,056	0,038	489,02	0,000004
(1) Temperatura (°C)*	-0,669	0,051	-12,99	0,0058
(2) Pressão (bar)*	-1,473	0,051	-28,57	0,0012
1L x 2L*	0,401	0,051	7,79	0,0160

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 16B** - Análise de variância para rejeição de sólidos totais (%) de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 2).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	11,1209	3	3,706952	32,66
Resíduo*	0,3405	3	0,113505	
Falta de ajuste	0,31926	1		
Erro puro	0,02126	2		
Total	11,46137	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=9,27; Coeficiente de correlação: R=0,99.

**Tabela 17B** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para a acidez (°D) dos concentrados de soro de leite - (planejamento 2).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	12,856	0,0728	176,397	0,000032
(1)Temperatura*	0,583	0,0964	6,049	0,0262
(2)Pressão	0,083	0,0964	0,8634	0,4789
1L x 2L	0,083	0,0964	0,8634	0,4789

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 18B** - Análise de variância para acidez (°D) nos concentrados de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 2).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	1,3607	1	1,360722	41,776
Resíduo*	0,1629	5	0,032579	
Falta de ajuste	0,0885	3		
Erro puro	0,0743	2		
Total	1,5236	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=6,61; Coeficiente de correlação: R=0,95.

**Tabela 19B**- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para o pH dos concentrados de soro de leite - (planejamento 2).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	6,377	0,0049	1286,53	0,000001
(1)Temperatura*	-0,036	0,0065	-5,604	0,030
(2)Pressão	0,0097	0,0065	1,487	0,275
1L x 2L	0,0032	0,0065	0,496	0,669

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 20B**- Análise de variância para o pH dos concentrados de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 2).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	0,0054	1	0,0054	32,813
Resíduo*	0,0008	5	0,0002	
Falta de ajuste	0,00047	3		
Erro puro	0,00034	2		
Total	0,00622	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=6,61; Coeficiente de correlação: R=0,92.

**Tabela 21B** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para a lactose (g/100 mL) dos concentrados de soro de leite - (planejamento 2).

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	4,315	0,0075	570,91	0,000003
(1)Temperatura*	-0,187	0,0100	-18,75	0,0028
(2)Pressão	0,032	0,0100	3,25	0,0830
1L x 2L	0,022	0,0100	2,25	0,1533

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 22B** - Análise de variância para a lactose dos concentrados de soro de leite do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> - (planejamento 2).

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	0,1406	1	0,140625	15, 8553
Resíduo*	0,0443	5	0,008869	
Falta de ajuste	0,043546	3		
Erro puro	0,000800	2		
Total	0,184971	6		

\*Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; F<sub>tab,95%</sub>=6,61; Coeficiente de correlação: R=0,87.