

**ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO –
INFLUÊNCIA DO pH e TRATAMENTO TÉRMICO NO
FLUXO DE PERMEADO E NAS PROPRIEDADES
EMULSIFICANTES DO CONCENTRADO PROTÉICO DE
SORO**

Luciano Fachin

Orientadora: Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO –
INFLUÊNCIA DO pH e TRATAMENTO TÉRMICO NO
FLUXO DE PERMEADO E NAS PROPRIEDADES
EMULSIFICANTES DO CONCENTRADO PROTÉICO DE
SORO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Luciano Fachin, aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de agosto de 1999.

Campinas, 25 de agosto de 1999

Luciano Fachin
Engenheiro de Alimentos

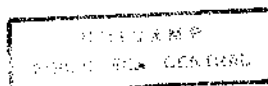
Walkiria H. Viotto
Profa. Dra. Walkiria H. Viotto
Presidente da Banca

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
Orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Tecnologia de Alimentos.**

Campinas – SP

1999



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F118u

Fachin, Luciano

Ultrafiltração do soro de queijo-influência do ph e tratamento térmico no fluxo de permeado e nas propriedades emulsificantes do concentrado protéico de soro / Luciano Fachin. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Walkíria Hanada Viotto
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I.Ultrafiltração. 2.Soro. 3.Emulsão. I.Viotto, Walkíria Hanada. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	F118u		
V.	Es.		
TCMOB	87/38455		
PROC.	229/99		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	25/09/99		
N.º CPD			

CM-00134341-4

BANCA EXAMINADORA

Walkiria H. Viotto

**PROFa. DRa. WALKÍRIA HANADA VIOTTO
(ORIENTADORA)**

Salvador Massagué Roig

**PROF. DR. SALVADOR MASSAGUER ROIG
(MEMBRO)**

L. A. Viotto

**PROF. DR. LUIZ ANTONIO VIOTTO
(MEMBRO)**

**PROF. DRa. LEILA PERES
(MEMBRO)**

Campinas - 1999

Aos meus pais, Hélio e Elena,
À minha irmã Andrelisa,
pelo amor, carinho, apoio, incentivo
e compreensão.
Também à Billy, pelos latidos ao telefone.

AGRADECIMENTOS

À professora Walkíria Hanada Viotto, pela confiança, compreensão, orientação, desenvolvimento de um espírito crítico e de um método de trabalho. Principalmente pela amizade.

À professora Leila Peres e os professores Salvador Massaguer Roig e Luiz Antonio Viotto, pela avaliação, instrução e sugestões necessárias ao desenvolvimento do trabalho.

Às técnicas Julianna e Beth, pela amizade e pelos valiosos ensinamentos durante a execução dos trabalhos experimentais da tese.

Às técnicas e técnicos dos laboratórios de Frutas, Cereais, Carnes, Higiene, Geral e Instrumentação, pela orientação no uso de alguns equipamentos necessários ao desenvolvimento do trabalho. Em especial à Ana Maria, ao Nelson, ao Valdeci e à Alice.

Aos vários amigos que sempre incentivaram e ajudaram das mais variadas formas a resolução dos mais variados problemas. Em especial ao Luciano, Sylaine, Pricila, Alessandra, Nonato, Suzana, Lu, Juliana, Karin e Daniela.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	3
RESUMO GERAL	5
 CAPÍTULO I - ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO - INFLUÊNCIA DO PH E TRATAMENTO TÉRMICO NO FLUXO DE PERMEADO	
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
O EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO.....	10
O EFEITO DO NÍVEL DE PH E A INFLUÊNCIA DOS SAIS DE CÁLCIO.....	11
CLARIFICAÇÃO DO SORO.....	13
PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO SORO.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS	14
PRODUÇÃO DO CPS.....	14
UNIDADE DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	15
MÉTODOS.....	16
<i>Determinação da composição dos CPS</i>	16
<i>Determinação do índice de solubilidade à pH 4,6</i>	16
<i>Determinação do fluxo de permeado</i>	17
<i>Determinação do coeficiente de retenção protéica</i>	17
<i>Planejamento experimental</i>	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
O EFEITO DO PH E DO TRATAMENTO TÉRMICO.....	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA E SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	22
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
 CAPÍTULO II - ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO - INFLUÊNCIA DO PH E TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DO CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO	
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
O EFEITO DO TIPO DE EQUIPAMENTO.....	36

CONFORMAÇÃO PROTÉICA NA INTERFACE.....	36
<i>Adsorção na interface</i>	37
<i>Desdobramento na interface</i>	38
<i>Estrutura dos filmes na interface</i>	39
FATORES QUE AFETAM AS EMULSÕES.....	40
<i>Hidrofobicidade</i>	40
<i>Flexibilidade Molecular</i>	40
<i>Forças eletrostáticas</i>	41
<i>Efeito estérico</i>	41
<i>Nível de pH</i>	42
<i>Temperatura</i>	42
<i>Força iônica</i>	43
<i>Concentração de proteína</i>	43
SISTEMAS DE PROTEÍNAS: COMPETIÇÃO NA INTERFACE.....	44
TERMODESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO.....	44
<i>Efeito do nível de pH</i>	46
<i>Efeito da concentração de cálcio</i>	47
<i>Grupos SH</i>	48
<i>Agregação das proteínas do soro</i>	48
<i>Exposição da superfície hidrofóbica pela ação do calor</i>	50
TIPOS DE DESESTABILIZAÇÃO.....	52
<i>Cremação ou Drenagem</i>	52
<i>Floculação</i>	52
<i>Coalescência</i>	53
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES.....	53
MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
PRODUÇÃO DO CPS	55
UNIDADE DE ULTRAFILTRAÇÃO	56
MÉTODOS	57
<i>Determinação da composição dos CPS</i>	57
<i>Formação da emulsão</i>	57
<i>Determinação do índice de solubilidade à pH 4,6</i>	57
<i>Determinação do índice de atividade da emulsão</i>	58
<i>Determinação do índice de estabilidade da emulsão</i>	58
<i>Planejamento experimental</i>	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
COMPOSIÇÃO DOS CPS	60
EFEITOS DO PH E DO TRATAMENTO TÉRMICO	61
ANÁLISE ESTATÍSTICA E SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	62
<i>Solubilidade à pH 4,6</i>	62
<i>Estabilidade da emulsão</i>	66
<i>Índice de atividade da emulsão</i>	66
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
APÊNDICE I – TABELAS DE CÁLCULO PARA A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	79
APÊNDICE II – TABELAS PARA CÁLCULO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES, DO FLUXO DE PERMEADO E DO COEFICIENTE DE RETENÇÃO.....	89
APÊNDICE III- TABELAS PARA CÁLCULO DOS FLUXOS DE PERMEADO.....	94

INTRODUÇÃO GERAL

O alto teor de água no soro, cerca de 93-94%, torna indispensável o uso de processos de concentração para a viabilização do seu uso comercial. Processos convencionais de concentração utilizam tratamento térmico, causando desnaturação protéica e diminuindo a funcionalidade das proteínas do soro. Além disso, o gasto energético envolvido na concentração do soro pelos métodos convencionais torna o processo inviável do ponto de vista econômico. O baixo custo energético e a não necessidade de tratamentos térmicos na concentração tornam a ultrafiltração (UF) o único processo comercialmente viável para a produção dos concentrados protéico de soro (CPS) com boas características funcionais.

O mercado mundial possui várias indústrias que produzem concentrados protéicos de soro para uso como ingredientes. Esse mercado representa uma lucrativa oportunidade para as indústrias que processam o leite. Os concentrados de soro são geralmente produzidos através de processos de ultrafiltração, seguidos do uso de spray drier. A produção dos concentrados de soro só foi possível após a introdução dos processos de membranas, os quais diminuem muito os gastos com energia para evaporação da grande quantidade de água existente no soro. A viabilidade econômica da produção dos concentrados fica então limitada ao fluxo de permeado e ao rendimento protéico no processo de ultrafiltração. Vários estudos tem sido feitos ressaltando-se a importância dos pré-tratamentos no soro de leite, com o objetivo de melhorar as taxas de permeação das membranas de UF. Clarificação, microfiltração, tratamento térmico, ajuste de pH, desmineralização de cálcio, adição de agentes sequestrantes de cálcio, pré-concentração do soro, tratamentos com enzimas proteolíticas ou uso de carboxi-metil-celulose tem sido os tratamentos propostos para melhorar o desempenho do processo de UF.

O estudo de pré-tratamentos que melhorem a taxa de permeação das membranas é importante para a viabilização econômica da produção dos concentrados protéicos de soro. Além da otimização da taxa de permeação no processo de ultrafiltração, os pré-tratamentos também podem ser utilizados com vistas ao melhoramento das propriedades funcionais das proteínas do soro. As boas qualidades funcionais do concentrado determinarão, conjuntamente com o seu custo final, a sua sobrevivência no mercado, visto a forte

concorrência com ingredientes tradicionais como a clara de ovo desidratada, o leite em pó desnatado e a soja.

As diferentes aplicações em alimentos exigem diferentes tipos de características funcionais das proteínas. Os CPS possuem boa aceitação como ingrediente funcional por não interferir no gosto dos alimentos em que estão sendo usados. Assim, ingredientes para aplicações em iogurtes requerem proteínas com maiores capacidades de absorção de água e gelificação, tendo-se em vista a redução da sinerese. Ingredientes para o uso em produtos cárneos, como as salsichas, necessitam de proteínas com boas propriedades emulsificantes. Portanto, visando o aproveitamento do soro como ingrediente, torna-se necessário o estudo da produção de concentrados com características funcionais específicas para cada aplicação. O estudo de processos que maximizem certas propriedades funcionais, conjuntamente com a taxa de permeação, se torna de grande interesse para a indústria de ingredientes.

RESUMO GERAL

O objetivo do trabalho foi estudar a influência de pré-tratamentos do soro no desempenho da membrana e nas propriedades emulsificantes do CPS. Os pré-tratamentos do soro foram o ajuste de pH entre 6 e 7, antes do tratamento térmico que variou de 70 até 80°C/2 minutos. O desempenho da membrana foi determinado pelo fluxo de permeado e pelo coeficiente de retenção protéica, e as propriedades emulsificantes pelo índice de atividade da emulsão (EAI) e pelo índice de estabilidade (SR). A ultrafiltração foi realizada em uma membrana cerâmica Carbosep, com peso molecular de corte de 20.000 Daltons e área de permeação de 74,6 cm². O aumento do tratamento térmico diminuiu levemente o fluxo de permeado. O efeito do pH apresentou um comportamento quadrático sobre o fluxo de permeado, sendo que a região de pH entre 5,90 e 6,55, aliada à um tratamento térmico mínimo de 68°C/2 minutos, apresentou os maiores fluxos. O fluxo máximo foi obtido à pH 6,22 e 68°C/2 minutos. A queda no fluxo foi correlacionada com a solubilidade das proteínas do soro e com o teor de cinzas dos CPS. No pH 7, o teor de cinzas foi extremamente alto, mostrando uma maior deposição de sais de cálcio nos tratamentos de maior pH e maior tratamento térmico. Nesse pH, os valores do fluxo foram muito baixos. À medida que o pH diminuiu, o fluxo foi determinado pela solubilidade das proteínas. O coeficiente de retenção protéica variou entre 94 e 96% e foi uma característica da membrana e não dos pré-tratamentos utilizados. O aumento dos níveis de pH e de tratamento térmico resultaram em uma diminuição da solubilidade do CPS. O aumento do pH melhorou sensivelmente as propriedades emulsificantes. O aumento da intensidade do tratamento térmico diminuiu o índice de estabilidade (SR), principalmente à pH 7, provavelmente devido à uma maior interação entre grupos hidrofóbicos expostos. A melhor combinação para as propriedades emulsificantes foi com pH 7 e 70°C/2 minutos.

CAPÍTULO I

ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO - INFLUÊNCIA DO pH e TRATAMENTO TÉRMICO NO FLUXO DE PERMEADO

ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO - INFLUÊNCIA DO pH e TRATAMENTO TÉRMICO NO FLUXO DE PERMEADO

Luciano Fachin, Walkíria Hanada Viotto*

RESUMO

O "fouling" das membranas durante a ultrafiltração (UF) do soro constitui-se em um grande problema para a indústria de laticínios, pela alta redução no fluxo de permeado. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do pH (6-7) e do tratamento térmico (70-80°C/2 minutos) do soro no desempenho da membrana, através da metodologia de superfície de resposta (RSM). O soro, obtido da produção de queijo Minas Frescal, foi pré-tratado e ultrafiltrado em uma membrana cerâmica tubular Carbosep, de peso molecular de corte de 20.000 Daltons e área superficial de 74,6 cm². A temperatura de UF foi de 55°C e a pressão transmembrana de 45 psi. O processo foi interrompido quando o fator de concentração de 8 foi alcançado. O aumento da intensidade do tratamento térmico diminuiu levemente o fluxo de permeado. O efeito do pH apresentou um comportamento quadrático sobre o fluxo de permeado, sendo que a região de pH entre 5,90 e 6,55, aliada a um tratamento térmico mínimo (68°C/2 minutos), apresentou os maiores fluxos. O fluxo máximo foi obtido à pH 6,22 e 68°C/2 minutos. A queda no fluxo foi correlacionada com a solubilidade das proteínas do soro e com o teor de cinzas dos CPS. No pH 7, o teor de cinzas foi extremamente alto, mostrando uma maior deposição de sais de cálcio nos tratamentos de maior pH e maior tratamento térmico. Nesse pH, os valores do fluxo foram muito baixos. À medida que o pH diminuiu, o fluxo foi determinado pela solubilidade das proteínas.

Palavras-chave: ultrafiltração, fluxo de permeado, pH, tratamento térmico, sais de cálcio, proteínas.

* Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp - Barão Geraldo - Campinas - SP - CEP: 13.083-970

ABSTRACT

Ultrafiltration (UF) technology has been used to produce the whey protein concentrate (WPC). Membrane fouling is a big problem for dairy industry due to the reduction of permeate flux during UF process. In order to reduce the membrane fouling, this paper studied the influence of pH and heat treatment (70-80 °C/2 minutes), before ultrafiltration, on permeate flux by response surface methodology (RSM). Sweet whey from Minas Frescal cheese was pretreated and ultrafiltered in a Carbosep tubular ceramic membrane, with cut off of 20.000 daltons and superficial area of 74,6 cm². UF temperature was 55 °C and transmembrane pressure 45 psi. Ultrafiltration was interrupted when a concentration factor of 8 was reached. Flux decreased slightly when heat treatment increased. pH showed a quadratic relationship on permeate flux. The best region was found between pH 5,9 and 6,5, with a minimum heat treatment (68 °C/2 minutes). Maximum flux was found at pH 6.22 and 68 °C/2 minutes. Flux decline was correlated with protein solubility and ash content of WPC. At pH 7, ash content was higher, probably because the higher calcium salts deposition due to pH and more intense heat treatment. Flux permeate was extremely lower at pH 7. When pH decreased, permeate flux was determined by protein solubility.

Key-words: ultrafiltration, permeate flux , pH, heat treatment, calcium salts, proteins.

INTRODUÇÃO

O processo de ultrafiltração tornou possível o aproveitamento do soro de queijo, através da produção comercial dos concentrados protéicos de soro. Entretanto, o problema do “fouling” durante o processo de UF reduz drasticamente a capacidade de concentração do soro. A formação do “fouling” tem sido atribuída principalmente à deposição das proteínas e dos sais de cálcio (11).

Visando a diminuição do “fouling” das membranas e o conseqüente aumento do fluxo, vários tipos de pré-tratamentos tem sido estudados (14, 19). Segundo Muller & Harper (14), tratamentos no soro como clarificação, centrifugação (às vezes, precedida de adição de cálcio), tratamentos térmicos, desmineralização, pH e a pré-concentração do soro podem melhorar o fluxo durante a ultrafiltração. Além disso, um aumento do fluxo de ultrafiltração pode ser obtido pelo tratamento com ácidos, agentes sequestrantes de cálcio e compostos que modificam a superfície das cadeias de proteínas ou com o aumento da força iônica do meio (10).

Os tratamentos térmicos parecem melhorar o fluxo de permeado (7, 11, 14). Hickey *et alii* (7) atribuiu à uma interação entre albumina do soro bovino (ASB) e a β -lactoglobulina uma melhora do fluxo de permeado. Também tem sido atribuído à uma possível interação entre a caseína e a β -lactoglobulina uma melhora no fluxo com o tratamento térmico (14). A influência do pH parece está ligada à solubilidade dos fosfatos de cálcio (8, 11, 12, 17, 20). Segundo Maubois (12) além da influência sobre os sais de cálcio, o pH também afeta as proteínas do soro. Em um pH mais distante do ponto isoelétrico da β -lactoglobulina, ocorre a formação de um fouling dominado por material protéico.

Os poucos trabalhos relatando o comportamento do fluxo de permeado na faixa de pH do soro doce (5,6-6,5) apresentam resultados conflitantes. Rao *et alii* (18) encontraram um melhor fluxo à pH 6 do que à pH 5 e 7. Viotto & Roig (20) relataram um aumento no fluxo de permeado quando o pH foi aumentado de 5,6 para 6,5, antes do tratamento térmico. Já para Maubois (12) ocorreu um aumento no fluxo à pH 5,2 e 5,5, quando comparado com o pH 6. Hiddink *et alii* (8) relatou um fluxo maior à pH 7,5 em relação ao pH 6,6. Este

trabalho teve como objetivo estudar a influência do pH e do tratamento térmico do soro no fluxo de permeado de ultrafiltração.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Efeito do Tratamento Térmico

Em processos de UF, tratamentos térmicos ou a formação de agregados na solução de alimentação parecem melhorar o fluxo de permeado. O aumento no fluxo parece estar ligado à desnaturação das proteínas do soro, que são consideradas como potenciais agentes formadores de “fouling” na sua forma nativa (11).

Hayes *et alii* (6) foram os primeiros a desenvolverem um pré-tratamento que se baseia no efeito do pH e tratamento térmico combinados. O uso desse pré-tratamento dobrou o fluxo na UF de soros ácidos (caseínicos) e melhorou em cerca de 50% o fluxo para soros doces (Cheddar). Para o soro ácido, o tratamento utilizado consistiu de um aquecimento do soro à 80°C durante 15 segundos e ajuste do pH para um ótimo na região de 5,9, com temperatura de UF de 50°C. Para o soro doce, o aquecimento no seu pH natural de 6 ou acima, à 85°C por 15 segundos, resultou num fluxo 50% maior em relação ao soro pasteurizado. Essa redução foi atribuída principalmente a formação de um agregado entre a caseína e a β -lactoglobulina.

Hickey *et alii* (7) atribuíram às interações entre a albumina do soro bovino (ASB) e a β -lactoglobulina, uma melhora no fluxo de permeado do soro ácido na faixa de pH entre 4,2-6,2, após um tratamento térmico de 80°C/15 segundos. A adição de cálcio teve dois efeitos bastante distintos: quando o cloreto de cálcio foi adicionado antes do tratamento térmico, uma melhora sensível ocorreu no fluxo de permeado, enquanto quando o cálcio foi adicionado após o tratamento térmico, houve uma considerável queda na taxa de permeação da membrana. Para o soro doce do queijo Cheddar, o efeito do tratamento térmico foi menor em relação ao soro ácido, provavelmente devido ao baixo teor de cálcio do soro doce.

Viotto & Roig (20) estudaram os efeitos de pH, temperatura e clarificação, como pré-tratamentos na ultrafiltração de soro de queijo Minas Frescal. O declínio do fluxo, logo nos primeiros estágios da ultrafiltração, foi dependente do tipo de pré-tratamento utilizado, o que parece indicar que o pré-tratamento modifica a interação dos compostos do soro com a membrana, ocasionando maior ou menor “fouling”. Foi observado que pH e temperatura influenciaram a taxa de permeação da membrana, sendo interdependentes entre si. Os tratamentos com maiores valores de pH e temperatura apresentaram as maiores taxas de permeação. Maiores temperaturas mostraram maiores fluxos de permeado, provavelmente pela diminuição da viscosidade do retentado e ao aumento da difusividade, em relação aos efeitos prejudiciais da perda da solubilidade dos sais de cálcio. Um tratamento adicional de 55°C por 1 hora mostrou uma curva de fluxo de permeado semelhante às curvas com maiores valores de pH, sugerindo que os tratamentos que resultaram em taxas de permeação mais elevadas podem retardar a formação da camada secundária.

O Efeito do Nível de pH e a Influência dos Sais de Cálcio

Vários autores tem demonstrado a grande influência dos sais de cálcio no fluxo de permeado (8,11,12,15,17,20). A redução no teor de cálcio na alimentação geralmente resulta no melhoramento do fluxo de permeado devido à dois fatores: redução da deposição de proteína e a prevenção da precipitação dos fosfatos de cálcio. O teor de cálcio pode ser reduzido através do uso de agentes sequestrantes ou por desmineralização (11).

Patocka & Jelen (17) estudaram o efeito da quelação do cálcio e ajuste de pH no fluxo de permeado. A diminuição do pH torna mais solúveis os sais de cálcio, particularmente o fosfato de cálcio, resultando numa maior permeação pela membrana. Quando o cálcio foi quelado por agentes como o EDTA e o ácido cítrico, um aumento do fluxo foi observado. Todos os tratamentos que reduzem o teor de cálcio livre parecem melhorar a taxa de permeação pela membrana. A ligação do cálcio com os agentes quelantes parece minimizar a disponibilidade do cálcio para as interações com a membrana.

As proteínas e outros minerais parecem estabilizar os fosfatos de cálcio em solução. Quando as caseínas são removidas, como no caso do soro de queijo, o equilíbrio é quebrado e a precipitação é maior, provavelmente devido à baixa capacidade tampão das proteínas do

soro. A precipitação também é maior no permeado de soro ou de leite, onde as proteínas são removidas (11). Brule *et alii* (3) mostrou que à concentrações de 0.7%, as proteínas do soro e as proteínas do permeado de leite exibem um efeito protetor contra a precipitação dos sais de cálcio. O aquecimento do permeado de leite induziu a quebra do equilíbrio existente entre os sais, favorecendo (dependendo da intensidade do tratamento térmico) a precipitação de fosfato monocálcico ou fosfato tricálcico. A formação desses precipitados requer a transferência do cálcio na forma iônica para a forma di ou trifosfato. Essa transferência pode implicar na dissociação do tricitrato de cálcio existente no meio ou no aumento dos ions PO_4H^{2-} e PO_4H^{3-} . A segunda hipótese foi considerada ser a mais provável pois explicaria a redução no teor de cálcio iônico e a queda no pH. A dissociação do ácido fosfórico a qual resulta na complexação do cálcio iônico e na queda do pH foi dependente do pH inicial e do tratamento térmico da amostra. O efeito protetor das proteínas foi atribuído à reversibilidade da complexação dos sais de cálcio e fósforo durante o resfriamento.

Durante a UF do soro de queijo, o permeado que está no interior dos poros da membrana existe como uma solução bastante instável de lactose, sais minerais e nitrogênio não protéico (12). À temperaturas maiores que 20°C, pode ocorrer a precipitação do cálcio, o que diminui o fluxo de permeado. Isso ocorre mais fortemente no interior dos poros, onde não existe o efeito protetor das proteínas do soro (3). O ajuste de pH, seguido de um tratamento térmico, conduz a desmineralização do soro pela indução da formação de depósitos de fosfatos de cálcio. O aumento do pH conduz à uma queda da solubilidade dos sais de cálcio pela formação de fosfatos de cálcio insolúveis, e num pH mais distante do ponto isoelétrico da β -lactoglobulina, ocorre a formação de um fouling dominado por material protéico (12).

Além do efeito do pH na solubilidade dos sais de cálcio, o pH tem também um efeito na carga elétrica da proteína. Uma carga elétrica alta melhora a dispersão protéica e diminui a tendência de deposição. Um considerável aumento no fluxo de permeado à pH 3 foi atribuído à elevada carga elétrica positiva das proteínas. A clarificação ou descalcificação do soro de queijo (Gouda) também provocou um aumento do fluxo, provavelmente pelo

fato da não ocorrência da precipitação dos sais de cálcio. Nesses casos, o “fouling” foi controlado pela deposição de proteínas (8).

Segundo Rao *et alii* (18), a redução no pH diminuiu o fluxo inicial, enquanto que o ajuste para pH 6 ou acima, resultou em fluxos iniciais maiores. No entanto, quanto maior foi o fluxo inicial, maior foi o seu declínio durante a UF. Ocorreu um alto grau de fouling à pH 7 e 8. Esses resultados concordam com os resultados obtidos por Lee & Merson (10), que observaram uma alta redução do fluxo em soro ácido neutralizado à pH 7, comparado com o soro ácido não neutralizado. Quando o soro ácido foi neutralizado, obteve-se um material gelatinoso espesso responsável pelo “fouling”, provavelmente devido à presença de fosfato de cálcio coloidal insolúvel (10). Rao *et alii* (18) também estudaram a influência da concentração de cálcio em permeado de soro (soluções livres de proteína) no fluxo da membrana. Surpreendentemente, a concentração de cálcio pareceu não afetar o fluxo em uma solução onde a proteína não estava presente.

Segundo Marshal & Daufin (11), quando o fosfato de cálcio estava presente no soro e as condições de operação (pH, temperatura e concentração de cálcio) favoreciam a sua precipitação, ocorreu a formação de uma camada de “fouling” densa e de pouca permeabilidade. Quando o teor de cálcio foi reduzido pelo uso de condições apropriadas, as proteínas foram os principais agentes formadores da camada de fouling.

Clarificação do Soro

Durante a UF do soro, uma membrana dinâmica é formada sobre a membrana propriamente dita, a qual é formada pela acumulação de microrganismos, finos de caseína, complexos lipoprotéicos, minerais precipitados e proteínas de soro desnaturadas (10, 12). Conseqüentemente, qualquer tratamento tecnológico que venha a remover essa camada tende a minimizar o fouling e melhorar o fluxo de permeado (12).

A centrifugação ou a filtração do soro antes da UF pode remover parte dos compostos que causam o fouling (5,8). A adição de agentes que causam a precipitação de lipídeos, com conseqüente remoção do precipitado formado, parece ser benéfico para a UF (14).

Hiddink *et alii* (8), encontrou maiores fluxos para soros clarificados ou descalcificados, em relação ao soro não tratado.

Musale & Kulkarni (15) estudaram a clarificação do soro (doce e ácido), quando o pH foi aumentado até pH 7,5 e o precipitado foi filtrado. O aumento do fluxo, com esse método, foi devido não só à redução do teor de cálcio, mas também à redução da concentração de proteínas de alto peso molecular, como a imunoglobulina G, cujo ponto isoelétrico é próximo do pH de clarificação usado. Além da clarificação, o uso de microfiltração do soro também pode ser empregado para melhorar o fluxo de ultrafiltração (19).

Pré-concentração do Soro

O uso de pré-concentração do soro por evaporação tem sido usado para se aumentar o fluxo de permeado, sendo que um efeito mais pronunciado foi obtido quando se alcançou o dobro da concentração (19). O efeito benéfico da pré-concentração no aumento do fluxo de permeado foi atribuído à complexação dos sais e ao aumento da força iônica, que aumentam a dispersão das proteínas, diminuindo a tendência à deposição (12).

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do CPS

O soro obtido da produção de queijo Minas Frescal, a partir de 100 litros de leite, foi desnatado e dividido em 11 partes iguais, de seis litros cada uma. Cada parte foi ajustada ao pH escolhido com NaOH ou HCl segundo os níveis da Tabela 1. O soro permaneceu sob leve agitação durante um período de 15 minutos, sendo continuamente monitorado. Após o ajuste de pH, o soro foi aquecido à taxa de aproximadamente 6°C/minuto, até os níveis de temperatura escolhidos. Após permanecer por 2 minutos na temperatura desejada, o soro foi resfriado à temperatura ambiente com o auxílio de um banho de gelo e congelado a -7°C. Antes de cada ultrafiltração, cada amostra foi descongelada e centrifugada à 1600 rpm durante 25 minutos, para a remoção de uma pequena quantidade de material insolúvel, formado após os tratamentos térmicos mais intensos ($\geq 75^\circ\text{C}/2$ minutos). A ultrafiltração

foi realizada em uma membrana cerâmica Carbosep, com peso molecular de corte de 20.000 Daltons e área superficial de 74,6 cm². A temperatura de ultrafiltração utilizada foi de 55°C e a pressão transmembrana de 45 psi. O processo de UF foi interrompido quando se atingiu o fator de concentração de 8. O retentado foi congelado e liofilizado por um período de 48 horas. O pó obtido (concentrado protéico de soro) foi então embalado em recipientes plásticos herméticos e armazenados em freezer para posterior análise.

A limpeza da membrana foi realizada com a circulação de hipoclorito de sódio a 200 ppm e ácido nítrico (5ml/l), durante 30 minutos à uma temperatura de 50°C e pressão de 30 psi. Água deionizada foi usada para o enxague da membrana, após o uso das soluções de limpeza.

Os CPS produzidos foram comparados com uma amostra comercial, Alacen 152[®], fornecida pela New Zealand Milk Products, comercializado pelo fabricante para aplicações funcionais em alimentos.

Unidade de Ultrafiltração

Um esquema do equipamento utilizado pode ser visto na Figura 1. O soro foi recirculado do compartimento de alimentação da bomba através da membrana de ultrafiltração. A pressão transmembrana foi monitorada através de dois manômetros que se localizavam na entrada e na saída da membrana. A temperatura de UF foi monitorada através de um termômetro imerso dentro do compartimento de alimentação. A temperatura de UF foi mantida a 55°C, com auxílio de um isolante térmico e de água quente recirculando entre o isolante e a bomba. As curvas de permeação foram construídas através do monitoramento do peso de permeado, em intervalos pré-determinados, através de uma balança semi-analítica.

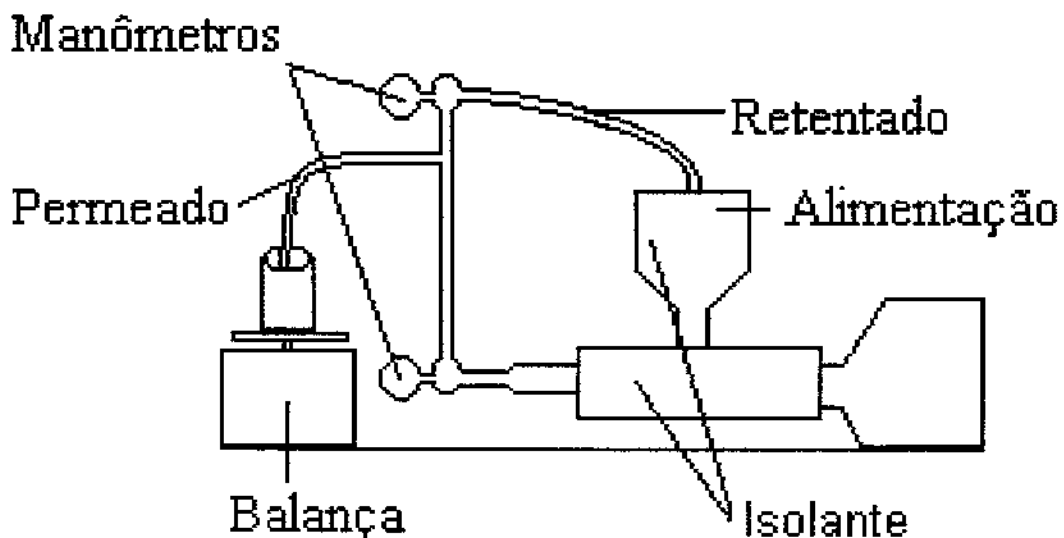


Figura 1 - Unidade de UF.

Métodos

Determinação da composição dos CPS

Duas gramas de CPS foram diluídas em água destilada, em balão volumétrico de 100 ml. Os teores de gordura, cinzas, umidade e nitrogênio não protéico (NNP) desta solução foram determinadas segundo metodologia da AOAC (1). A gordura foi determinada pelo método de Mojonnier. O nitrogênio total foi determinado usando o método de micro-Kjeldahl (5). As determinações de nitrogênio foram multiplicadas por 6,38 para dar o equivalente em proteína. O teor de lactose foi determinada por diferença. O valor das médias das triplicatas foi então multiplicado pelo fator de diluição de 50 para a obtenção da composição nos CPS.

Determinação do índice de solubilidade à pH 4,6

Para a determinação do índice de solubilidade seguiu-se o método descrito por Morr *et alii* (13). Pesou-se precisamente 500 mg de proteína de soro em pó em um bequer de 50 ml. Foram adicionadas várias alíquotas de NaCl 0,1 M com agitação até a formação de uma pasta. Adicionou-se NaCl 0,1 M até a marca de 40 ml de volume. Colocou-se o béquer sob

agitação e acertou-se imediatamente o pH da solução com HCl 0,1 N até 4,6. A dispersão foi então agitada por 1 hora e o pH monitorado e mantido no valor escolhido por todo o período de agitação. A dispersão foi então transferida para um balão de 50 ml e diluída até a marca com NaCl 0,1 M. A solução foi centrifugada por 30 minutos à 20.000 x g e o sobrenadante foi pesado em papel Watman N°1. O teor de proteína do sobrenadante foi analisada por Kjeldahl e o índice de solubilidade à pH 4,6 (%PS) foi calculado como abaixo:

$$\%PS = \frac{(C \times 50)}{P} \times 100$$

onde C = concentração de proteína no sobrenadante (mg/ml) e P = massa de proteína na amostra (mg).

Determinação do fluxo de permeado

As curvas de permeação foram construídas através do cálculo do fluxo de permeado (F):

$$F = \frac{P}{t A} \quad (\text{Kg/h m}^2)$$

onde P = peso de permeado no instante t (Kg); A = área total de permeação (m²) e t = tempo (horas).

O fluxo global, utilizado para a construção dos gráficos de superfície de resposta, foi calculado usando P = peso total de permeado retirado ao final da ultrafiltração; A = área total de permeação e t = tempo final de ultrafiltração.

Determinação do coeficiente de retenção protéica

O coeficiente de retenção ou rejeição (CR) foi calculado por:

$$CR = [1 - (P_P/P_R)] \times 100$$

onde: P_P = porcentagem de proteína no permeado e P_R = porcentagem de proteína no retentado.

Planejamento experimental

O planejamento experimental foi estabelecido conforme o procedimento descrito por Bruns *et alii* (4). Foi usado um planejamento fatorial 2^2 , isto é, um planejamento com duas variáveis (pH e tratamento térmico), e dois níveis para cada variável. Os níveis para o pH foram de 6 (nível inferior) e 7 (nível superior), e para o tratamento térmico os níveis foram de 70°C/2 minutos (nível inferior) e 80°C/2 minutos (nível superior). Nesse estudo, o nível inferior foi codificado como -1 e o nível superior como +1.

Tabela 1: Planejamento fatorial para os níveis de pH e tratamento térmico.

Experimentos	Níveis Codificados		Níveis Descodificados	
			pH	T (°C)
T1	-1	-1	6	70
T2	+1	-1	7	70
T3	-1	+1	6	80
T4	+1	+1	7	80
T5 (C*)	0	0	6,5	75
T6 (C)	0	0	6,5	75
T7 (C)	0	0	6,5	75
T8	-1,4142	0	5,79	75
T9	0	1,4142	6,5	82
T10	1,4142	0	7,21	75
T11	0	-1,4142	6,5	68

* (C) – experimentos no ponto central.

Através dos tratamentos no ponto central (T5, T6 e T7) foi calculado o erro experimental do processo. Os resultados foram analisados através do cálculo dos efeitos, segundo Bruns *et alii* (4), e através das superfícies de resposta geradas pelo Software STATISTICA 5.0®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra a composição centesimal do CPS em função dos pré-tratamentos. Em média, o teor de proteína do CPS foi de 29 a 34%, e o teor de cinzas variou entre 4,5 e 8,66%. O teor de cinzas aumentou com o aumento do pH e do tratamento térmico, provavelmente devido à uma maior precipitação dos sais de cálcio. O teor de gordura variou em média entre 7 e 11% e o NNP entre 0,44 e 0,70%. A solubilidade da proteína à pH 4,6 diminuiu com o aumento do pH e do tratamento térmico, indicando uma maior precipitação das proteínas do soro nessas condições.

Tabela 2: Composição centesimal* dos concentrados protéicos de soro e porcentagem de proteína solúvel à pH 4,6 (%PS).

Tratamento (pH-T°C)	Cinzas	Proteína	Gordura	Lactose	NNP	%PS
1 (6-70)	5,48 ± 0,23	31,31 ± 0,06	8,25 ± 1,45	54,40	0,57 ± 0,06	85,64 ± 1,29
2 (7-70)	6,24 ± 0,88	29,67 ± 0,29	9,79 ± 0,24	53,70	0,60 ± 0,01	76,28 ± 2,72
3 (6-80)	5,26 ± 0,16	27,33 ± 0,05	10,00 ± 1,15	56,82	0,59 ± 0,04	68,67 ± 4,25
4 (7-80)	7,37 ± 0,43	32,23 ± 0,12	9,60 ± 1,17	50,22	0,58 ± 0,02	63,80 ± 1,94
5 (6,5-75)	6,19 ± 0,05	31,87 ± 0,12	10,93 ± 0,57	50,54	0,47 ± 0,08	78,63 ± 0,73
6 (6,5-75)	6,19 ± 0,37	33,10 ± 0,05	13,38 ± 1,20	46,79	0,54 ± 0,03	82,21 ± 2,25
7 (6,5-75)	5,81 ± 1,39	31,09 ± 0,03	9,08 ± 0,67	53,58	0,44 ± 0,02	85,06 ± 1,02
8 (5,79-75)	4,40 ± 0,40	33,06 ± 0,08	6,94 ± 0,21	55,13	0,48 ± 0,03	75,97 ± 0,49
9 (6,5-82)	4,13 ± 0,88	25,58 ± 0,11	10,99 ± 0,87	58,63	0,66 ± 0,06	68,19 ± 0,07
10 (7,21-75)	8,66 ± 0,26	33,39 ± 0,30	7,98 ± 0,51	49,11	0,85 ± 0,01	66,05 ± 0,55
11 (6,5-68)	5,86 ± 0,20	33,10 ± 0,25	9,33 ± 0,33	51,13	0,58 ± 0,02	88,57 ± 1,01
ALA**	3,15 ± 0,89	73,89 ± 0,30	6,82 ± 0,29	15,95	0,19 ± 0,01	89,23 ± 2,99
Soro***	0,36 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,32 ± 0,05	4,91	0,03 ± 0,00	-

* Composição centesimal em base seca, onde cada valor é a média de três pontos (Média ± Desvio Padrão) ** Amostra comercial obtida com a New Zealand Milk Products, *** Soro original obtido da produção do queijo Minas Frescal (em base úmida, com %Umidade = 93,72 ± 0,16).

O Efeito do pH e do Tratamento Térmico

O aumento do pH e do tratamento térmico do soro diminuiu o fluxo de permeado durante a UF (Tabela 3). Nessas condições, deve ter ocorrido uma maior precipitação das proteínas do soro e dos sais de cálcio, o que pode ser confirmado pela queda no índice de solubilidade à pH 4.6 e pela maior concentração de cinzas nos CPS produzidos à pH 7 (Tabela 2). A Figura 2 apresenta as curvas de permeação em função do pré-tratamento do soro. Os processos T2 (pH 7 e 70°C/2 minutos), T4 (pH 7 e 80°C/2 minutos) e T10 (pH 7,21 e 75°C/2 minutos) mostram um declínio mais acentuado, sugerindo um entupimento contínuo dos poros da membrana. O declínio foi mais pronunciado na medida em que ocorreram as condições de pré-tratamento que favoreceram a precipitação das proteínas e dos sais de cálcio. Os maiores fluxos encontrados ocorreram com as combinações de pH 6 e tratamento térmico de 70°C/2 minutos (T1), e com a combinação de pH 6,5 e 75°C/2 minutos (T5, T6 e T7).

Tabela 3: Valor dos efeitos do pH, do tratamento térmico e da interação sobre o fluxo de permeado (F) e o coeficiente de retenção protéica (CR).

	F (Kg/hm ²)	CR (%)
Tratamento Térmico	- 3,70 *	-2,45 ^{ns}
pH	-10,34 *	-3,09 ^{ns}
pH x Trat.Térmico	1,9 ^{ns}	-1,57 ^{ns}

*= Efeito significativo à $p < 0,05$; ns = efeito não significativo à $p < 0,05$.

A análise da Tabela 3 permite verificar que nenhum efeito sobre o coeficiente de retenção de proteína foi significativo ($p < 0,05$), indicando que a retenção protéica foi uma característica da membrana e não do pré-tratamento utilizado. O severo fouling da membrana ocorrido nos processos realizados à pH 7 e 7,21, não permitiu que se alcançasse o fator de concentração de 8, como nos demais processamentos. O Fc alcançado para os processos T2, T4 e T10 foram, respectivamente, de 3,65, 2,60 e 1,67. Isso implicou num erro associado aos efeitos sobre a retenção de proteína, que não foi possível separar da verdadeira influência dos pré-tratamentos, isto é, os efeitos negativos em CR, tanto do pH quanto do tratamento térmico, podem ter ocorrido devido aos pré-tratamentos utilizados ou

ao baixo nível de concentração alcançado nos processos à pHs 7 e 7,21. Portanto, não foi possível a análise do coeficiente de retenção protéica através da metodologia de superfície de resposta.

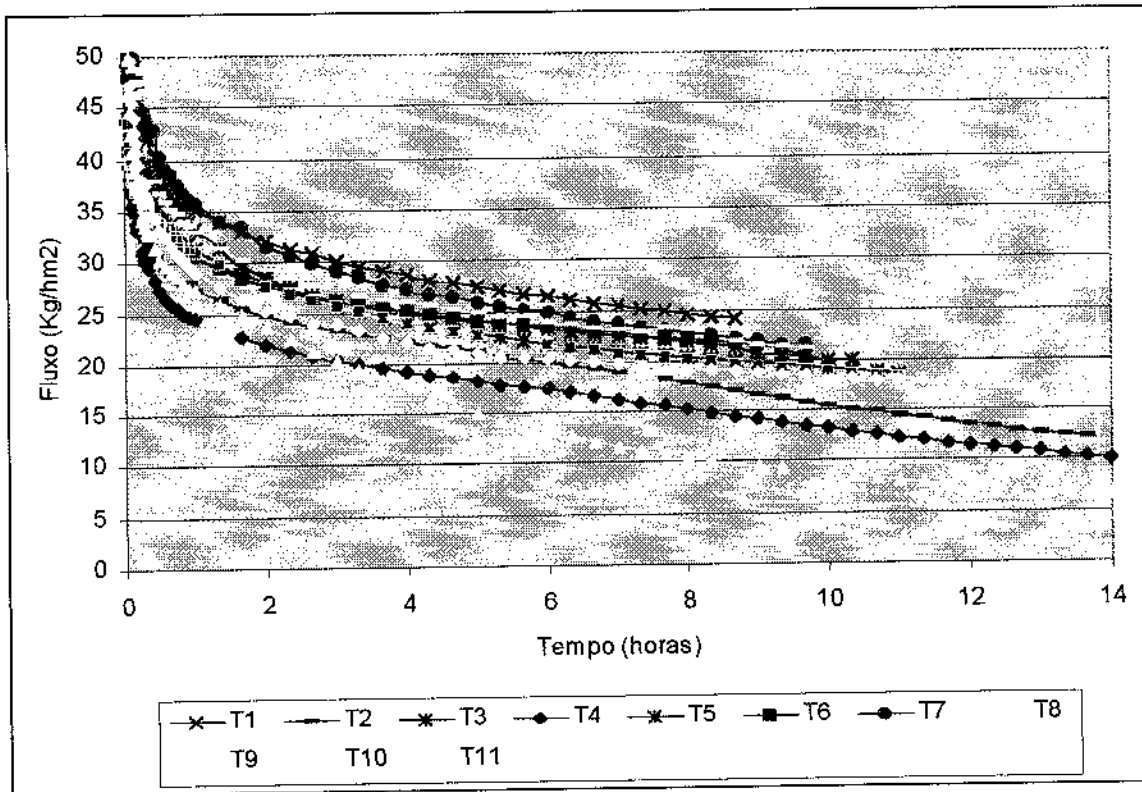


Figura 2 – Curvas de permeação em função dos pré-tratamentos do soro. T1 (pH 6 e 70°C/2 minutos), T2 (pH 7 e 70°C/2 minutos), T3 (pH 6 e 80°C/2 minutos), T4 (pH 7 e 80°C/2 minutos), T5-T6-T7 (pH 6.5 e 75°C/2 minutos), T8 (pH 5,79 e 75°C/2 minutos), T9 (pH 6,5 e 82°C/2 minutos), T10 (pH 7,21 e 75°C/2 minutos) e T11 (pH 6,5 e 68°C/2 minutos).

Através da Tabela 4, que mostra o coeficiente de retenção (CR) em função do pré-tratamento do soro, verificou-se que as retenções de proteína foram de 94 a 96%, e que somente nos tratamentos onde não foi possível a obtenção de um Fc de 8, principalmente nos tratamentos 4 e 10, ocorreu uma menor retenção.

Tabela 4: Coeficiente de retenção protéica (CR) e fluxo de permeado (F) em função do pré-tratamento utilizado.

Tratamentos	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes	
	pH	Trat. Térmico (°C/2 minutos)	F* (Kg/m ² h)	CR* (%)
1	6	70	24,19	95,79
2	7	70	11,94	94,28
3	6	80	18,59	94,92
4	7	80	10,15	90,25
5	6,5	75	20,67	94,22
6	6,5	75	21,02	95,97
7	6,5	75	21,58	95,95
8	5,79	75	17,95	94,99
9	6,5	82	17,83	94,25
10	7,21	75	6,64	85,09
11	6,5	68	21,17	94,94

* O fluxo de permeado e o coeficiente de retenção protéica foram obtidos no fator de concentração de 8, com exceção feita aos tratamentos T2, T4 e T10, cujos fatores foram de 3,65, 2,60 e 1,67, respectivamente.

Análise Estatística e Superfície de Resposta

O modelo gerado para o fluxo global (Z), através dos dados da Tabela 4, pode ser visto abaixo:

$$Z = 20,42 - 1,52 Y - 4,58 X - 4,11 X^2 \quad (1)$$

onde Y = tratamento térmico e X = nível de pH.

É geralmente usado o teste F para verificar se a regressão linear é estatisticamente significativa (4). Segundo Box and Wetz (2), para um modelo ser, além de significativo do

ponto de vista do teste F, útil do ponto de vista preditivo, o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser quatro a cinco vezes maior que o F_{tabelado} , no nível de significância desejado. A análise de variância para o modelo de fluxo se encontra na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância para a resposta fluxo de permeado (F).

	SQ*	GL**	MQ***	F	F_{tabelado}
Regressão	290,82133	3	96,9404	62,99	4,35
Resíduos	10,77287	7	1,53898		
Falta Ajuste	10,35276	5	2,07055	9,86	19,3
Erro Puro	0,420067	2	0,21003		
Total	301,5942				

*SQ- soma quadrática, **GL – graus de liberdade e ***MQ – Média quadrática

O modelo gerado foi altamente significativo, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi quase quinze vezes maior que o F_{tabelado} , à $p < 0,05$. O coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,96. O modelo também não apresentou falta de ajuste, pois $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste foi menor que o F_{tabelado} ($9,86 < 19,30$). Para a obtenção do valor do fluxo através do modelo da equação (1), os valores das variáveis independentes (pH e tratamento térmico) devem estar em sua forma codificada (Tabela 1).

A natureza da relação entre pH e tratamento térmico do soro no fluxo de permeado é representada na superfície de resposta tridimensional gerada da equação quadrática desenvolvida da análise matemática (Figura 3a).

O pH assumiu maior importância nas variações do fluxo, enquanto que o tratamento térmico contribuiu com um pequeno efeito negativo à medida que sua intensidade aumentou. Portanto, é interessante se usar o valor de tratamento térmico que menos influenciou o fluxo de permeado (68°C/2 minutos) para o termo Y na equação (1), com o objetivo de se analisar separadamente o efeito do pH no fluxo de permeado.

Se $Y = 68^\circ\text{C}/2 \text{ minutos} = -1,4142$ na equação (1), o modelo para o fluxo pode ser resumido para:

$$Z = 22,52 - 4,58 X - 4,11 X^2 \quad (2)$$

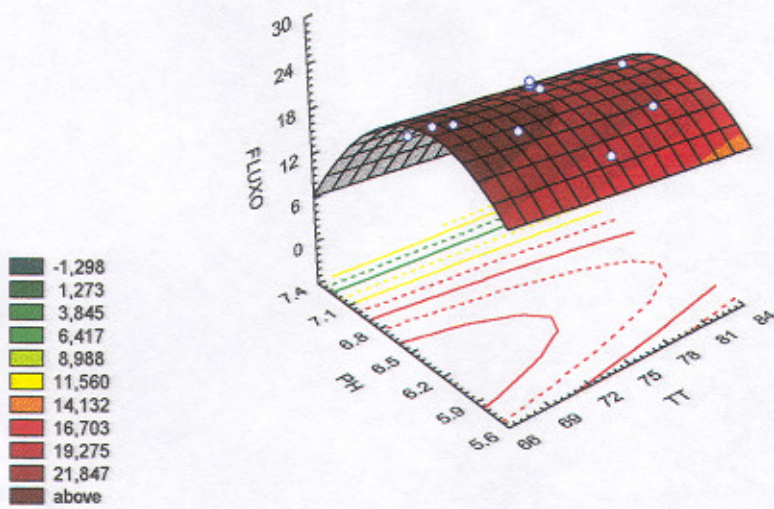
A parábola representada pela equação (2) pode ser vista claramente na Figura 3a. Se derivarmos a equação (2), temos que:

$$\frac{dz}{dx} = -4,58 - 8,22 X \quad (3)$$

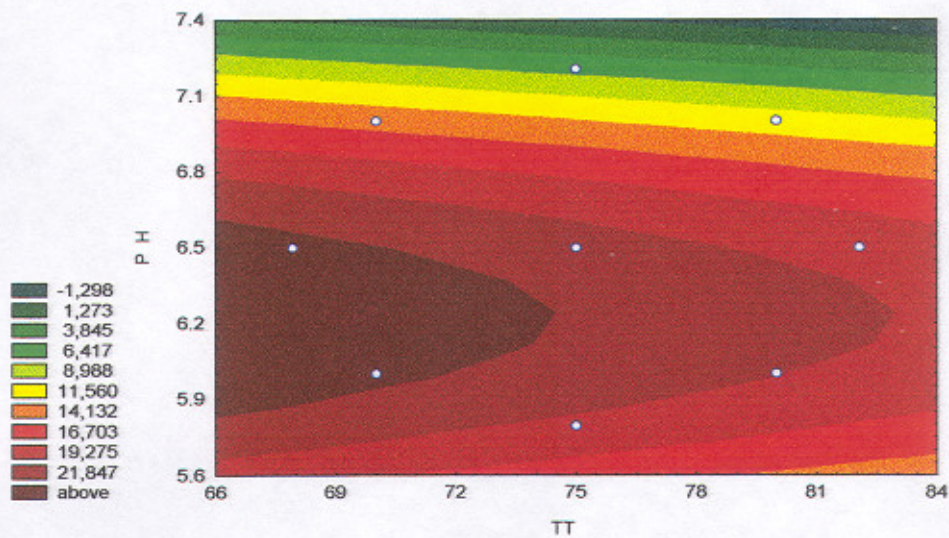
Fazendo $(dz/dx) = 0$, obteve-se o valor de pH igual à 6,22, onde o fluxo de permeado é máximo. Esse valor coincidiu exatamente com o valor obtido por Hickey *et alii* (7), que encontrou um melhor fluxo à pH 6,2, usando uma membrana de acetato de celulose e soro ácido proveniente da produção de caseína. Hickey *et alii* (7) atribuiu esse aumento no fluxo de permeado à uma interação entre a β -lactoglobulina e a albumina do soro bovino, sendo que esse efeito foi aumentado pela presença de cálcio antes do tratamento térmico.

Embora a análise pontual (pH 6,22) seja também importante, a informação mais proveitosa está na obtenção de uma região onde o fluxo de permeado seja máximo, dentro da faixa estudada (Figura 3b). Pode ser claramente observado que a faixa de pH entre 5,9 e 6,5, com um tratamento térmico de 68°C/2 minutos, apresentou os maiores fluxos de permeado dentro das condições estudadas. Essa informação é bastante importante, pois o pH do soro doce se encontra geralmente na faixa de pH entre 5,6 e 6,5.

O comportamento quadrático apresentado pelo modelo do pH para o fluxo de permeado foi determinado pela solubilidade das proteínas. O comportamento da solubilidade à pH 4,6 também apresentou um comportamento quadrático e teve sua região ótima entre a faixa de pH de 6,1 à 6,6, com um tratamento térmico de 68°C/2 minutos. O pH de máxima solubilidade foi à 6,33 e 68°C/2 minutos (ver Capítulo II). Essa região é praticamente a mesma região onde ocorreu o máximo fluxo de permeado.



(a)



(b)

Figura 3. Superfície de resposta do efeito do pH e do tratamento térmico no fluxo de permeado. (a) superfície em 3D. (b) superfície rebatida em 2D.

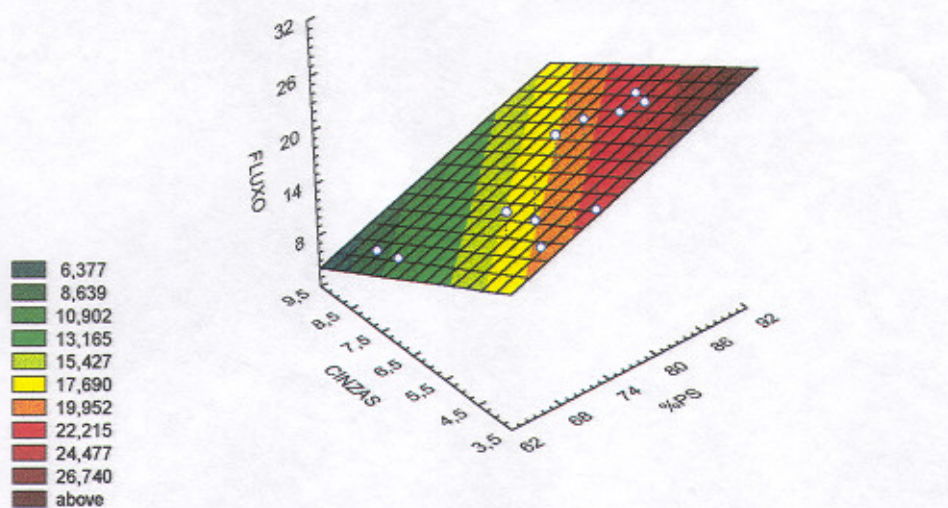
O fluxo de permeado apresentou uma correlação significativa com a solubilidade protéica à pH 4,6 e com o teor de cinzas do CPS. Essa correlação foi evidenciada pela regressão múltipla dada por:

$$Z = 0,40 Y - 2,16 X \quad (3)$$

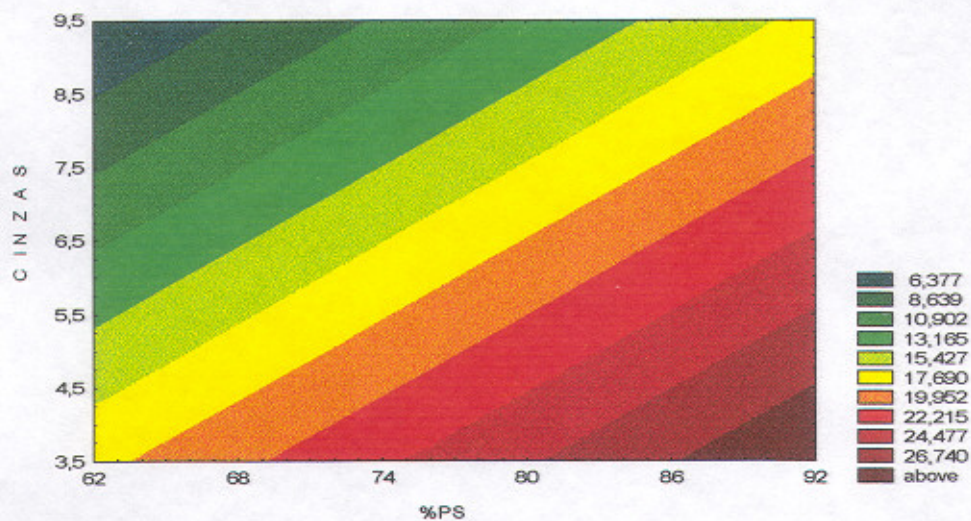
onde Z = fluxo global (Kg/m²h); Y = índice de solubilidade protéica à pH 4,6 e X = porcentagem de cinzas do CPS.

O coeficiente do modelo para o termo Y foi significativo à $p < 0,001$ e para o termo X à $p < 0,002$. O coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,98, evidenciando que o índice de solubilidade e o teor de cinzas explicaram adequadamente o comportamento do fluxo de permeado. A superfície gerada pela equação (3) pode ser vista na Figura 4.

Portanto, pode-se concluir que o declínio do fluxo de permeado foi devido às combinações de pH e tratamento térmico que favoreceram a precipitação das proteínas e dos sais de cálcio. O fluxo foi maior quando as proteínas foram mais solúveis e quando a concentração de cinzas do CPS diminuiu, ou seja, quando se usou pré-tratamentos de menor pH e tratamento térmico menos intensos. No pH 7, deve ter ocorrido uma maior deposição das proteínas e dos sais de cálcio, o que resultou em fluxos de permeado extremamente baixos, quando comparados com os fluxos à pH 6, onde a deposição dos sais foi menor e ocorreu uma maior solubilidade das proteínas do soro. É sabido que a insolubilidade dos sais de cálcio aumenta com o aumento do pH e da temperatura. Segundo Marshal & Daufin (11), além da precipitação dos sais de cálcio no interior dos poros da membrana, o cálcio também influencia o fouling das proteínas, tanto por interações proteína-proteína, como através de interações proteína-membrana. Os agregados que se formam entre as proteínas do soro, sob tratamento térmico, tem sua solubilidade reduzida à medida que a concentração dos sais de cálcio aumenta no meio (9,16).



(a)



(b)

Figura 4 – Regressão múltipla da solubilidade protéica à pH 4.6 e do teor de cinzas dos CPS sobre o fluxo de permeado. (a) Superfície em 3D. (b) Superfície rebatida em 2D.

CONCLUSÃO

Os pré-tratamentos do soro mudaram severamente o fluxo de permeado. O fluxo apresentou um comportamento quadrático em função do pH, com uma região ótima entre 5,9 e 6,5, aliada à um tratamento térmico de 68°C/2 minutos. O fluxo de permeado foi máximo a pH 6,22 e 68°C/2 minutos. O aumento do tratamento térmico na faixa de 68 até 82°C/2 minutos diminuiu o fluxo de permeado. O declínio do fluxo de permeado foi provavelmente devido à precipitação das proteínas do soro e dos sais de cálcio, sendo muito severo na região de pH 7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) AOAC. METHODS OF ANALYSIS. 1995. 16^a ed., Washington, D.C., **Assoc. Official Analytical Chemists**.
- 2) BOX, G.E.P. and J. WETZ. 1995. Criteria for judging adequacy of estimation by na approximate response function. University of Wisconsin, **Technical Report**, 9, 1973. *Apud*. Planejamento e otimização de experimentos, Campinas, SP, Editora da Unicamp, 299 p.
- 3) BRULE, G.; REAL DEL SOL, E.; FAUQUANT, J.; FIAUD, C. Mineral salts stability in aqueous phase of milk: influence of heat treatments, **Journal of Dairy Science**, 61: 1225-1232, 1978.
- 4) BRUNS, P.E.; NETO, B.B.; SCARMINIO, T.S. **Planejamento e otimização de experimentos**, Campinas, SP, Editora da Unicamp, 299 p., 1995.
- 5) FIL-IDF – INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 20, Brussels, Belgium, 1962.
- 6) HAYES, J.F.; DUNKERLEY, J.A; MULLER, L.L. GRIFFIN, A T. **Aust. J. Dairy Technol.** 29, 132 p., 1974. *Apud*: **Journal Agric. Food Chemistry**, 27 (4) 662-664, 1979.
- 7) HICKEY, M. W.; HILL, R. D.; SMITH, B. R. Investigations into the ultrafiltration and reverse osmosis of whey I. The effects of certain pretreatments. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, 15 (2) 109-121, 1980.
- 8) HIDDINK, R.J.; DE BOER, R.; NOOY, P.F.C. Effect of various pre-treatments on the ultrafiltration of sweet cheese whey at about 55°C, **Milchwissenschaft** 36 (11) 657-663, 1981.

- 9) HOLLAR, C. M.; PARRIS, N.; HSIEH, A; COCKLEY, K. D Factors affecting the denaturation and aggregation of whey proteins in heat whey protein concentrates mixtures, **Journal Dairy Science**, 78: 260-267, 1995.
- 10) LEE, D. N.; MERSON, R. L. Chemical treatments of cottage cheese whey to reduce fouling of ultrafiltration membranes, **Journal of Food Science**, 41 (4) 778-786, 1976.
- 11) MARSHALL, A D.; DAUFIN, G. Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids. In: Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes, **IDF Special Issue 9504**, International Dairy Federation, Brussels (Belgium), 1995.
- 12) MAUBOIS, J.L. Ultrafiltration of whey. **Journal of the Society of Dairy Technology**, 33(2) 55-58, 1980.
- 13) MORR, C.V.; GERMAN, B., KINSELLA, J.E., REGENSTEIN, J.M., VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure, **Journal of Food Science**, Vol 50: 1717-1718.
- 14) MULLER, L. L.; HARPER, W. J. Effects on membrane processing of pretreatments of whey, **Journal Agric. Food Chemistry**, 27 (4) 662-664, 1979.
- 15) MUSALE, D.A; KULKARNI, S.S. Effect of whey composition on ultrafiltration performance. **J. Agric. Food Chem.**, 46: 4717-4722, 1998.
- 16) PARRIS, N.; ANEMA, S. G.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Aggregation of whey proteins in heated sweet whey. **Journal Agric. Food Chemistry**, 41: 460-464, 1993.
- 17) PATOCKA, J; JELEN P. Calcium chelation and other pretreatments for flux improvement in ultrafiltration of cottage cheese whey, **Journal of Food Science**, 52 (5) 1241-1244, 1987.

- 18) RAO, H.G.R.; LEWIS, M.J.; GRANDISON, A.S. Effect of pH on flux during ultrafiltration of sweet whey and buttermilk. **Journal of Dairy Science**, 62: 441- 449, 1995.
- 19) RENNER, E.; ABD EL-SALAM, M. H. **Application of ultrafiltration in the dairy industry**. London and New York, Elsevier Applied Science, 1991, 371 p.
- 20) VIOTTO, W. H.; ROIG, S. M. Efeito de pré-tratamentos no fluxo de permeado durante ultrafiltração de soro de queijo. **Bol. da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28 (1) 47-55, jan/jun, 1994.

CAPÍTULO II

ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO - INFLUÊNCIA DO pH e TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DO CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO

ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO - INFLUÊNCIA DO pH e TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DO CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO

Luciano Fachin, Walkíria Hanada Viotto*

RESUMO

A influência do pH (6-7) e do tratamento térmico (70-80 °C/2 minutos) do soro na solubilidade protéica à pH 4,6 e nas propriedades emulsificantes do concentrado protéico de soro (CPS), foi estudada através da metodologia de superfície de resposta (RSM). O nível de desnaturação protéica foi avaliado pelo índice de solubilidade à pH 4,6 e as propriedades emulsificantes pelo índice de atividade da emulsão (EAI) e pela variação de estabilidade (SR). O aumento dos níveis de pH e de tratamento térmico resultaram em uma diminuição da solubilidade do CPS. O aumento do pH melhorou sensivelmente as propriedades emulsificantes. O aumento da intensidade do tratamento térmico diminuiu o índice de estabilidade (SR), principalmente à pH 7, provavelmente devido à uma maior interação entre grupos hidrofóbicos expostos. A melhor combinação obtida para o índice de atividade (EAI) e para o índice de estabilidade (SR) foi com pH 7 e 70 °C/2 minutos.

Palavras-chave: propriedades emulsificantes, desnaturação, ultrafiltração, pH, tratamento térmico, concentrado protéico de soro.

* Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp - Barão Geraldo - Campinas - SP - CEP: 13.083-970

ABSTRACT

The influence of whey pH (6-7) and heat treatment (70-80°C/2 minutos), on protein denaturation and emulsifying properties of whey protein concentrate were studied by Response Surface Methodology (RSM). Degree of protein denaturation was determined by protein solubility at pH 4.6 and emulsifying properties were evaluated by emulsifying activity index (EAI) and stability rating (SR). Denaturation of WPC increased as pH and heat treatment increased. Emulsifying properties (EAI and SR) increased as pH increased. More intense heat treatment (80°C/2 minutos) decreased slightly the stability rating, mainly at pH 7, probably due to interactions between the exposed hydrophobic residues. Combination of pH 7 and heat treatment of 70°C/2 minutos showed the best emulsifying properties.

Key-words: emulsifying properties, whey protein concentrate, pH, heat treatment, ultrafiltration, denaturation.

INTRODUÇÃO

Uma emulsão é uma mistura termodinamicamente instável entre dois líquidos imiscíveis, os quais requerem o fornecimento de energia para ocorrer a dispersão (20). As emulsões podem melhorar a textura e a aparência de produtos alimentícios, como sorvetes, salsichas e chocolates. O estudo das emulsões produzidas por proteínas é de grande interesse, devido à possibilidade de se aproveitar tanto o seu potencial nutricional, quanto funcional.

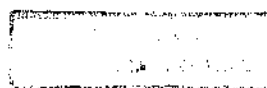
Infelizmente, a grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura se baseia em estudos feitos com amostras comerciais. Apesar de ser possível estimar qual o nível de desnaturação protéica dessas amostras, é difícil correlacionar o nível de desnaturação com fatores relativos ao processo de produção dos concentrados protéicos de soro.

Os pré-tratamentos do soro são frequentemente usados com o objetivo de se melhorar o fluxo de permeado das membranas de ultrafiltração. No entanto, a influência dos pré-tratamentos sobre as propriedades emulsificantes dos CPS tem sido pouco estudadas.

Com o objetivo de se estudar a produção de CPS mais específicos, do ponto de vista funcional, foi estudada a influência de alguns pré-tratamentos do soro (pH e tratamento térmico), antes da ultrafiltração, na desnaturação protéica e nas propriedades emulsificantes do CPS obtido.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em uma emulsão, o papel da proteína é formar uma membrana interfacial ao redor dos glóbulos de gordura, prevenindo a desestabilização do sistema (14). O agente emulsificante deve interagir entre o glóbulo de gordura e a água, reduzindo a tensão interfacial. Em geral, proteínas solúveis possuem atividade superficial por causa de suas cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas. A capacidade das proteínas para formar e estabilizar emulsões é devida à sua composição e sequência de aminoácidos, sua hidrofobicidade e sua estabilidade conformacional (58).



O Efeito do Tipo de Equipamento

Segundo Hill (23), dois líquidos imiscíveis como óleo e água requerem uma agitação mecânica para a sua dispersão. Portanto, quanto mais efetivo for o agente emulsificante, menor será a intensidade de agitação necessária para a formação da emulsão. O método de formação da emulsão é extremamente importante, pois se relaciona diretamente com o tamanho do glóbulo de gordura formado e, conseqüentemente com a sua desestabilização.

O tamanho do glóbulos depende do tipo de equipamento usado e da quantidade de energia que se transmite ao sistema através dele. Misturadores de baixa velocidade produzem emulsões com uma larga faixa de tamanhos de glóbulos, ficando os menores diâmetros em torno de 20 μm . Aparelhos de altas velocidades, como o "Ultra Turrax", que alcançam velocidades entre 8.000-24.000 rpm, produzem glóbulos na faixa de 5-10 μm . Homogenizadores ultrasônicos, os quais produzem alta cavitação, produzem glóbulos de 1 μm de diâmetro. Homogenizadores à pistão também são largamente usados, e produzem emulsões com glóbulos numa faixa ainda menor que os homogenizadores ultrasônicos.

Tornberg & Hermansson (55) comparou a intensidade e o tempo de emulsificação, em relação à estabilidade da emulsão para vários tipos de proteínas. Em todos os equipamentos, a estabilidade aumentou com o aumento da intensidade (velocidade de rotação ou pressão) e do tempo de emulsificação. Esse aumento foi alcançado até um certo limite, onde esses fatores deixaram de influenciar a estabilidade. Para as emulsões formadas com os concentrados protéicos de soro (CPS) no equipamento do tipo Ultra Turrax, o nível de rotação para que se atinga esse limite ficou em aproximadamente 10.000 rpm. O aumento entre 10.000 e 20.000 rpm praticamente não aumentou a estabilidade. Melhores resultados foram alcançados com homogenizadores ultrasônicos e pistão. Yamauchi *et alii* (59) usou um homogenizador Polytron PT20 à 19500 rpm, que usa o mesmo princípio de dispersão do Ultra Turrax, e encontrou um tempo de 8 minutos onde a estabilidade não é mais afetada.

Conformação Protéica na Interface

Em relação à natureza protéica, podemos dizer que existem dois fatores importantes que determinam a capacidade das proteínas apresentarem atividade superficial: sua composição e distribuição de aminoácidos, e a conformação estrutural em que a proteína se apresenta. O segundo fator ganha muita importância por ser susceptível a mudanças, do ponto de vista tecnológico.

Adsorção na interface

Segundo Philips (47), as proteínas precisam primeiro chegar até a interface óleo-água, e depois “se desdobrar”, para que se tenha um ótimo contato dos grupos não polares com a fase oleosa. A interação das moléculas de água com os grupos polares e eletricamente carregados diminui a energia livre total da molécula de proteína. À medida que ocorre a adsorção de proteína na interface, existe uma menor probabilidade desses grupos da proteína interagirem com moléculas de água. Assim, forma-se uma situação energeticamente desfavorável. Caso estes grupos estejam numa região flexível da cadeia, a proteína tende a se desdobrar e rearranjar, expondo os grupos não polares. Quando os grupos não polares são expostos no meio aquoso, ocorre um aumento da energia livre e esses grupos se inserem na fase lipídica. Essa inserção possui uma baixa energia de ativação e acontece espontaneamente. Uma vez na interface, ocorre a formação de uma barreira energética desfavorável à adsorção de uma nova quantidade de proteína. Para que uma nova quantidade de proteína seja adsorvida, ocorre uma compressão e um rearranjo da proteína que já está na interface. Esse “empacotamento” da proteína depende da sua flexibilidade molecular e da carga elétrica residual.

Quando a α -lactalbumina é adsorvida na interface, a sua estrutura secundária muda mais em função da concentração de proteína do que do pH (6-7) ou do tempo de estocagem. Ocorre então um aumento na sua estrutura β -folha pregueada, devido à perda de parte da sua estrutura helicoidal. Esse efeito é maior numa concentração de proteína de 2% do que em 1%. Não há praticamente diferenças devido ao nível de pH (6 e 7) e o tempo de estocagem (72 horas). A desnaturação da α -lactalbumina parece ocorrer num curto espaço de tempo quando na interface, não sendo dependente do tempo. Já o mesmo não ocorre para a β -lactoglobulina, cuja desnaturação na interface aumenta com o tempo (16).

Desdobramento na interface

Em baixas concentrações de proteína, a velocidade de adsorção é controlada pela difusão da proteína até a interface, sendo um ponto crítico para a rápida formação da membrana interfacial (7,47). Em concentrações de proteína mais elevadas (em torno de 0.5%), a membrana é rapidamente formada por um filme fino, e o transporte de proteína não é mais um fator chave (7,35). Segundo Damodaran (10), a rápida adsorção da proteína é o fator mais importante para a formação das emulsões e, sob as condições de turbulência que existem durante os processos de homogeneização, o fator limitante torna-se a capacidade-velocidade de desdobramento e reorientação da proteína na interface, e isso depende das suas propriedades moleculares.

A medida que a proteína é adsorvida, o aumento da pressão superficial reflete uma diminuição de sua energia livre superficial. Em geral, a primeira camada protéica é a que mais contribui para o aumento da pressão superficial (32). Como, então, a pressão superficial está associada à uma queda na tensão interfacial (19), alguns autores tem usado o seu monitoramento, juntamente com a medida da concentração protéica interfacial, para o monitoramento da capacidade de desdobramento das proteínas na interface (10,35,47).

Phillips (47) estudou o comportamento da β -caseína, da albumina do soro bovino (ASB) e da lisozima na interface. Existem duas zonas temporais distintas: a primeira, acontece quando tanto a pressão superficial (π) e a concentração interfacial da proteína (Γ) aumentam. O segundo período acontece quando apenas a pressão superficial aumenta à uma concentração interfacial fixa. Esse fato ocorre devido ao desdobramento das proteínas, e a sua velocidade depende da flexibilidade e compressibilidade do filme.

Segundo Damodaran (10), a β -caseína, logo que chega na interface, rapidamente se desdobra e se reorienta. Por consequência, diminui rapidamente a tensão interfacial. Para a ASB, a concentração de proteína na interface atingiu um valor estacionário após 100 minutos, mas a pressão interfacial continuou aumentando até um tempo de 1000 minutos. Isso sugere que a ASB se desdobra e se reorienta na interface em uma velocidade bem menor, e que esse processo continua mesmo após a membrana total ter se formado. Para a lisozima, o comportamento foi bem mais lento do que para a ASB. A concentração

interfacial somente atingiu a saturação em 900 minutos, enquanto que a pressão interfacial apenas começou a aumentar a partir dos 650 minutos de adsorção.

Estrutura dos filmes na interface

Proteínas de menor peso molecular, como a β -caseína, possuem excelente atividade interfacial no que se refere ao desenvolvimento da pressão superficial, mas em virtude do seu pequeno tamanho, elas não conseguem produzir filmes fortes e coesos. Proteínas de maior peso molecular, como a ASB, que conseguem reter parte da sua estrutura terciária na interface, produzem filmes mais espessos e viscosos, o que reflete, em geral, uma melhor estabilidade para emulsões (32,35).

Segundo Phillips (47), a β -caseína, que possui uma estrutura desordenada e flexível, forma monocamadas diluídas na interface, enquanto que proteínas mais compactas, como a lisozima, formam filmes mais concentrados. É suposto que as monocamadas da β -caseína sejam formadas por moléculas completamente desdobradas, enquanto que a estrutura dos filmes mais concentrados ainda necessita ser melhor esclarecida.

A carga elétrica também é importante. Uma alta carga elétrica retarda a adsorção e as interações proteína-proteína, causando a formação de filmes expandidos, com pouca coesividade. Uma adsorção máxima ocorre perto do ponto isoelétrico caso a proteína seja solúvel, com a formação de filmes viscosos e condensados, pois existe uma interação máxima proteína-proteína (32,35). No entanto, nem sempre esse fator implica em uma melhor estabilidade. Segundo Yamauchi *et alii* (59), para as proteínas do soro, a estabilidade é mínima no ponto isoelétrico, enquanto que a adsorção de proteína e a viscosidade são máximas. Esse fato reflete a grande dependência da estabilidade das proteínas do soro com as forças de repulsão eletrostáticas, que são mínimas no ponto isoelétrico.

O tipo de proteína que se adsorve na interface é pH-dependente. Em pHs menores que o ponto isoelétrico, a α -lactalbumina predomina na interface da emulsão. Provavelmente isso se deva ao fato de que, nesse pH, ocorre uma maior mudança

conformacional em sua estrutura, o que expõe seus grupos hidrofóbicos. Em pH 5, perto do ponto isoelétrico, praticamente todas as proteínas estão adsorvidas sem seletividade. No pH 7 e 9, ocorre uma maior adsorção de β -lactoglobulina (59). Segundo Leman & Kinsella (35), nesse pH, a β -lactoglobulina contribui com 46,1 e 61,6% do total, respectivamente. Já a α -lactalbumina contribui com apenas 11 e 9,9%, respectivamente. No pH 5, a camada formada tem estrutura granular, refletindo uma maior agregação da proteína. No pH 9, uma fixa camada de proteína é formada, mostrando uma maior orientação na interface (59).

Fatores que Afetam as Emulsões

Hidrofobicidade

Devido ao fato de que a emulsão se produz pela interação dos grupos não polares com a fase lipídica, a hidrofobicidade de uma proteína é um dos mais importantes preditores das suas propriedades emulsificantes. Pode-se calcular a hidrofobicidade média, através da composição dos aminoácidos da cadeia polipeptídica, mas essa média não tem importância para ser correlacionada com as propriedades emulsificantes, pois muitos dos resíduos não polares estão escondidos no interior da estrutura nativa das proteínas, principalmente das globulares. Portanto, o que pode ser relacionado é a “hidrofobicidade efetiva” da proteína, através do uso de reagentes químicos e probes específicos (48). A maioria dos trabalhos determina a fluorescência relativa (RFI) de soluções protéicas conjugadas com o ácido cis-parinário (37,57).

Flexibilidade Molecular

A flexibilidade molecular das proteínas é outro fator importante, pois se relaciona com a sua capacidade em se desdobrar e rearranjar na interface (32,35,48). Proteínas flexíveis são mais suscetíveis à desnaturação na interface, e por isso à uma maior proteólise. Assim, essa propriedade se relaciona com a susceptibilidade à digestão proteolítica das proteínas após a sua adsorção na interface. A β -lactoglobulina e a ASB apresentam alta velocidade de digestão proteolítica e melhores propriedades de emulsificação, quando comparadas à lisozima e a ovalbumina, as quais são mais resistentes

à digestão proteolítica. Isso mostra que a ovalbumina e a lisozima retém uma estrutura mais compacta e rígida do que a β -lactoglobulina e a ASB, formando filmes menos coesos (32,48). Os resultados de Damodaran (10) e Phillips (47), através da medida da pressão interfacial e da concentração interfacial, também mostraram que a lisozima, devido à sua estrutura mais rígida e compacta, se desdobra mais lentamente que proteínas mais desordenadas e flexíveis, como a β -caseína.

Forças eletrostáticas

A energia total (U_T) de um glóbulo estabilizado por um filme protéico pode ser dado por (47,48):

$$U_T = U_V + U_E + U_S + U_H$$

onde U_V = interação atrativa de London-van der Waals; U_E = força de repulsão eletrostática; U_S = interação repulsiva estérica e U_H = potencial atrativo de hidratação.

Segundo Hill (23), para uma emulsão ser estável, ela deve ser balanceada por forças de atração e repulsão. Pela teoria DVLO, as forças de atração de Van der Waals são contrabalanceadas pelas forças de repulsão eletrostáticas (23,47,48).

Os termos U_S e U_H explicam a estabilidade de filmes não carregados eletricamente, como os filmes produzidos por monoglicerídeos (48).

Para agentes emulsificantes iônicos, como as proteínas, a estabilização é feita pelo estabelecimento de uma dupla camada elétrica, que se estabelece ao redor do glóbulo, prevenindo a coalescência (23,35,48). Isso mostra a grande relação da estabilidade com o nível de pH. Para as proteínas do soro, ocorreu uma maior estabilidade da emulsão quando o pH estava distante do ponto isoelétrico (19,35,44,47,48).

Efeito estérico

A medida que os glóbulos se aproximam, os “loops” e as caudas da proteína inseridos na fase aquosa começam a interagir, criando uma energia de repulsão devido à sobreposição da proteína, através de uma restrição do volume e de efeitos osmóticos (23,48). A restrição de volume ocorre porque parte da proteína da fase aquosa perde sua conformação. Já os efeitos osmóticos ocorrem devido à uma redução na concentração da fase contínua por causa da presença da proteína (47,48).

Nível de pH

Mudanças no pH afetam diretamente a carga elétrica das camadas adsorvidas na interface e a conformação da molécula de proteína (19,48). Segundo Halling (19), existem três possibilidades em que o pH pode afetar as emulsões: algumas proteínas são insolúveis perto do seu ponto isoelétrico; a coesividade e a rigidez dos filmes de proteína é máxima no ponto isoelétrico e as forças eletrostáticas de repulsão entre as proteínas opõem os glóbulos à coalescência ou floculação.

Existem dois comportamentos distintos em relação à dependência da estabilidade com o pH: o primeiro mostra uma estabilidade máxima no ponto isoelétrico da proteína, sugerindo a importância da rigidez do filme (propriedades reológicas), e o segundo mostra uma estabilidade mínima no ponto isoelétrico, sugerindo a importância das forças de repulsão eletrostáticas. No primeiro grupo, tem-se proteínas como a gelatina, insulina, pepsina, proteínas do ovo e a ASB (em concentrações entre 0,05-0,1%). No segundo grupo, tem-se as proteínas do soro (19). A β -lactoglobulina tem uma coalescência máxima junto ao seu ponto isoelétrico e essa velocidade diminui em pHs alcalinos (48).

Temperatura

O aumento da temperatura tende a acelerar o processo de desestabilização de qualquer emulsão, com a redução da viscosidade e da rigidez do filme protéico. No entanto, certas proteínas podem desnaturar, resultando num processo de geleificação (exemplo: β -lactoglobulina), o que aumenta a viscosidade e pode diminuir a desestabilização pela diminuição da mobilidade do glóbulo (35).

A temperatura como “tratamento térmico” tem grande impacto nas propriedades emulsificantes das proteínas, pela mudança conformacional que causa em sua estrutura.

Força iônica

Como o efeito de pH depende das forças de repulsão eletrostáticas, o seu efeito pode ser reduzido pelo aumento da força iônica do meio (19). Segundo Leman *et alii* (36), o aumento da força iônica de 0 até 15 mM de cloreto de sódio, tende a aumentar a estabilidade das proteínas do leite, mas de um modo pouco significativo. Um aumento da força iônica acima de 25 mM de cloreto de sódio tende a diminuir a estabilidade, especialmente da β -lactoglobulina. Isso reflete a influência na carga elétrica que estabiliza os glóbulos, enfraquecendo as forças de repulsão eletrostáticas.

Concentração de proteína

Vários estudos mostram que as propriedades de emulsificação melhoram com o aumento da concentração de proteína e que esse comportamento é diferenciado pelo tipo de proteína utilizado (7,36,46,59). A área interfacial total da emulsão é função da concentração de proteína. Aumentando-se a concentração de proteína, reduz-se o tempo requerido para a formação do filme, o que resulta num aumento da área interfacial (7). Com o aumento da concentração, tem-se um melhoramento da adsorção de proteína na interface, diminuindo com isso a tensão interfacial, e melhorando a estabilidade (59).

A viscosidade da fase contínua aumenta com o aumento do número de partículas suspensas. Esse fato pode ser mais um fator que contribui para a maior estabilidade de sistemas com maior concentração de proteína (36). Segundo Yamauchi *et alii* (59), o efeito da viscosidade do meio foi bem mais acentuado quando a quantidade de óleo (~40%) foi elevada conjuntamente com a concentração de proteína (> 5%).

Segundo Dumay & Cheftel (12), os efeitos de concentração devido ao aumento da viscosidade foram maiores à um nível de 5% de proteína, enquanto que para valores

menores (0.4%), a solubilidade da proteína assumiu maior importância. Concentrados protéicos de soro complexados com carboxi-metil-celulose (CMC), mostraram uma estabilidade duas vezes maior que o controle, devido ao aumento da viscosidade (39).

Os concentrados protéicos de soro não possuem uma boa estabilidade, quando comparados com outras proteínas (34,36,55). Segundo Yamauchi (59), emulsões estáveis foram produzidas somente a partir de 6% de concentração de proteína.

Sistemas de Proteínas: Competição na Interface

Segundo Phillips *et alii* (48), as proteínas com melhor atividade superficial são capazes de remover da interface proteínas com menor atividade. Em sistemas binários, a β -caseína removeria facilmente a α_{s1} -caseína da interface. Damodaran (10) ao estudar o comportamento de sistemas binários com diferentes combinações estruturais na interface ar-água encontrou que uma proteína de estrutura desordenada (β -caseína) não consegue retirar uma proteína globular de estrutura mais rígida (ASB ou lisozima) da interface. Uma proteína globular rígida não consegue remover uma proteína desordenada ou outra proteína globular rígida. No entanto, uma proteína desordenada poderia remover outra proteína desordenada. Isso significa que, para sistemas com combinações de proteínas na forma rígida-rígida e rígida-desordenada, tem-se uma adsorção não competitiva irreversível. Para sistemas binários de proteínas desordenadas, a adsorção é termodinamicamente controlada e reversível. A classe das proteínas usadas também foi importante. Para uma proteína retirar outra da interface, ela deveria se dissolver no filme e, para duas proteínas de classes diferentes, como a lisozima e a β -caseína, existe uma certa incompatibilidade termodinâmica inerente. Em sistemas com a β -caseína e a α_{s1} -caseína, ambas de estrutura desordenada, não existe incompatibilidade termodinâmica e a competição é totalmente determinada pela afinidade de cada uma delas com a interface.

Termodesnaturação das Proteínas do Soro

Como já foi discutido anteriormente, a adsorção das proteínas do soro na formação do filme protéico é pH-dependente. Em pHs abaixo do ponto isoelétrico a contribuição da α -lactoglobulina é predominante. Na faixa do ponto isoelétrico, não houve predominância de

nenhuma delas e quando o pH foi aumentado para valores acima do ponto isoelétrico, a β -lactoglobulina assumiu maior importância. É portanto razoável pensar que a β -lactoglobulina é a proteína mais importante na formação de emulsões na faixa de pH de 6 a 7. Além disso, a β -lactoglobulina é a proteína que está presente em maior quantidade nos concentrados protéicos de soro (CPS) e tende a comandar o seu comportamento (43). Portanto, o comportamento térmico dos CPS seria determinado pela β -lactoglobulina (5).

A desnaturação das proteínas do soro é afetada pelas condições do meio, como pH, concentração de proteína, concentração de íons de cálcio e agentes que modificam a conformação protéica (43).

Dois processos distintos ocorrem quando as proteínas do soro são tratadas termicamente: o processo de desnaturação propriamente dito, e um processo posterior de agregação (11,18,38). Segundo de Wit *et alii* (11), tratamentos térmicos médios (4-60°C) são reversíveis e governados principalmente por interações hidrofóbicas. Essas interações aumentam até 60°C. Isso implica que proteínas com alta quantidade de resíduos hidrofóbicos, como a β -lactoglobulina e a β -caseína, são sensíveis às associações ou dissociações induzidas pelo calor. O aquecimento de 4-60°C à pH 4,6, causa associações intramoleculares para a β -lactoglobulina sem perda da solubilidade, e reações intermoleculares para a β -caseína com perda de solubilidade. Já a ASB mostra precipitação intensa a temperaturas entre 40-45°C, em função dessa proteína apresentar grande tendência à interações hidrofóbicas. Entre 60-100°C a desnaturação das proteínas do soro segue dois passos distintos: um desdobramento que pode ser reversível ou irreversível e uma agregação irreversível. A β -lactoglobulina mostrou ser a mais termoestável das proteínas do soro (78°C) e a α -lactalbumina, a mais termolábil (62°C). Esses dados diferiram daqueles obtidos usando-se como índice de desnaturação a solubilidade protéica à pH 4,6. Isso se deve ao fato de que a α -lactalbumina possui alta capacidade de renaturação quando resfriada (>90%). Esse efeito, no entanto, não foi observado quando esta proteína está presente no CPS, o que pode ser devido à reações induzidas pelo calor com a β -lactoglobulina e a ASB. Segundo Fang & Dalgleish (16), o termo “renaturação” deve ser substituído pelo termo “reestruturação”, pois a α -lactalbumina não retorna ao seu estado

nativo após o resfriamento, mas sim à uma estrutura padrão também organizada que apresenta transição térmica quando analisada por calorimetria. Quando a β -lactoglobulina se desnaturou à 80°C, ocorreu uma estabilização parcial da sua estrutura, provavelmente devido a ocorrência de pontes dissulfídicas. Essa estabilização foi completamente destruída à cerca de 140°C. Esse fenômeno não ocorreu com a α -lactalbumina.

Efeito do nível de pH

É sabido que a desnaturação das proteínas do soro, principalmente da β -lactoglobulina, aumenta com o aumento do pH na faixa de 6 à 7 (5,11,18,21,22,24,43,51,52,53). Tem sido sugerido que esse aumento se deve ao aumento da reatividade do grupo sulfidril livre presente na β -lactoglobulina. Em pH básico, ocorre a oxidação do grupo sulfidril livre, com conseqüentes reações intra ou intermoleculares (SH/SS), as quais ocorrem em paralelo com o desdobramento e agregação. O efeito do calor na conformação da proteína implica na quebra das interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (41,42).

Quando o pH foi aumentado de 6 para 7,5, a reatividade do grupo sulfidril livre foi o dobro. Isso resultou num aumento das reações dissulfídicas (SH/SS) que são catalizadas pelo próton dissociado do grupo sulfidril (11).

Segundo Kinsella & Whitehead (32), a β -lactoglobulina existe como dímero na faixa de pH entre 5-8, devido à interações eletrostáticas entre os resíduos Asp-130 e Glu-134 de um monômero, com os resíduos lisina de outro monômero. Segundo Phillips *et alii* (48), o grupo sulfidril livre está localizado no resíduo Cys-121 na superfície do monômero, numa região hidrofóbica perto da interface de interação de cada monômero. O aumento do pH causa uma maior dissociação do dímero da β -lactoglobulina para a forma de monômero, o que coincide com o aumento da reatividade do grupo sulfidril livre. Agentes que causam a dissociação do dímero da β -lactoglobulina aumentam a reatividade do grupo sulfidril, enquanto que agentes que estabilizam a estrutura do dímero reduzem a sua reatividade.

Li-Chan (38) usou a solubilidade à pH 4,6 para analisar o nível de desnaturação dos concentrados protéicos de soro. A interação do pH e tratamento térmico à $p < 0.01$, afetou o índice de solubilidade. Quanto maior foi o tratamento térmico, menor foi o índice de solubilidade. Aquecimentos à pH 8 resultaram em grande diminuição do índice de solubilidade quando comparados com pH 6 e 4,6. Geralmente, quando a temperatura aumenta, as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas são enfraquecidas. As interações hidrofóbicas se intensificam com o aumento da temperatura até 60-70°C, e enfraquecem gradualmente acima desse valor. As reações dissulfídicas e a frequência de colisão molecular aumentam. Consequentemente, a quantidade de desnaturação e agregação, com provável insolubilização, aumentam com o aumento da temperatura. O pH afeta a facilidade de desdobraimento e a possibilidade de ocorrência de interações intermoleculares. Portanto, as reações de grupos sulfidríla são promovidas no pH 8 em relação ao pH 6 e 4,6. A quebra das pontes dissulfídicas intramoleculares promove a desnaturação, enquanto a formação de novas pontes intermoleculares favorecem a agregação e a insolubilização.

Alguns autores tem demonstrado que as proteínas do soro são mais estáveis em pHs ácidos do que em pHs próximos à neutralidade (5,11,21,22,52). Esse fato tem sido atribuído à diminuição da reatividade do grupo sulfidríla, o qual não se ioniza nessa faixa de pH (21,52). Segundo Bernal *et alii* (5), as forças de repulsão eletrostáticas que são criadas quando o pH é reduzido provavelmente previnem as proteínas da agregação e precipitação.

Efeito da concentração de cálcio

Segundo Mulvihill *et alii* (43), a adição de cálcio induziu uma substancial precipitação da β -lactoglobulina a pH acima de 6 e para a α -lactalbumina, em toda faixa de pH. A precipitação da β -lactoglobulina, em soluções que contém cálcio (pH 6-8), é equivalente à carga elétrica negativa da proteína. Essa precipitação é análoga aquela obtida baixando o pH até seu ponto isoelétrico.

Uma maior floculação para a β -lactoglobulina ocorreu quando íons de cálcio foram adicionados após o tratamento térmico e resfriamento da solução de proteína. No mesmo pH, a floculação aumentou com o aumento da concentração de cálcio (11).

Segundo Li-Chan (38), o teor de β -lactoglobulina foi significativamente menor quando o aquecimento foi feito com adição de 0,03M de cloreto de cálcio, presumivelmente devido ao contrabalanceamento da carga negativa da proteína pela ligação aos íons positivos do Ca^{++} , facilitando a agregação e precipitação intermolecular.

Grupos SH

Segundo Li-Chan (38), o teor de grupos SH foi menor quanto maior a temperatura, o pH e o tempo de aquecimento imposto ao CPS. Como o teor de SH+SS não foi significativamente afetado, concluiu-se que a diminuição dos grupos SH pode ser atribuída à um aumento correspondente no teor de ligações dissulfídicas (SS). Apesar das pontes dissulfídicas serem afetadas pelo aquecimento, a perda de solubilidade não pode ser totalmente explicada em termos de ligações SS. Apesar da desnaturação ser dependente da influência das reações SH-SS, uma vez associadas, as mudanças que conduzem à perda de solubilidade podem ocorrer independentemente do balanço SH-SS. Ocorrem agregações que são tanto dependentes ou independentes dos grupos SH e, mesmo entre as dependentes, os agregados podem não necessariamente ser formados por pontes dissulfídicas, mas a conformação que assumem é dependente da reatividade desses grupos.

Agregação das proteínas do soro

Vários autores (9,11,13,18,22,25,33,38) tem estudado o processo de agregação que pode ocorrer com as proteínas do soro, principalmente a β -lactoglobulina. Segundo Ghotan *et alii* (18), a reação de desnaturação está intimamente ligada à reação de agregação e não podem ser separadas pelo estudo com calorimetria.

Li-Chan (38) mostrou a existência, através da análise em HPLC, de um agregado de alto peso molecular (200.000 Daltons), formado pelas proteínas do soro em amostras de CPS não tratadas termicamente. Após a adição de mercaptoetanol, a área correspondente ao

agregado diminuiu de 15 para 5%. Esses resultados mostram que esse agregado é formado por pontes dissulfídicas, pois o tamanho do agregado diminuiu com a adição de mercaptoetanol. Quando o CPS foi tratado termicamente, esse agregado não diminuiu de tamanho mesmo com a adição de mercaptoetanol, mostrando uma estabilização por forças adicionais que não podem ser dissociadas por uma simples redução das ligações dissulfídicas.

Parris *et alii* (45) estudou a formação de agregados no soro de queijo. O nível de tratamento térmico ficou entre 65-85°C por 30 minutos. A quantidade de agregados aumentou quase linearmente nessa faixa. A quantidade de agregados solúveis aumentou com o aumento do pH de 6,6 para 7,0, enquanto que agregados insolúveis foram formados com o aquecimento a pHs abaixo de 6,6. O teor de cálcio induziu significativamente a formação térmica dos agregados e complexos entre as proteínas do soro. Quando a concentração de íons de cálcio diminuiu, a extensão da formação dos agregados solúveis aumenta concomitantemente com a diminuição dos agregados insolúveis.

Harwalkar *et alii* (22) estudou a ocorrência de precipitados de β -lactoglobulina quando a solução de proteína foi tratada termicamente a 90°C por 30 minutos a pH 2,5, 4,5 e 6,5. Após o aquecimento das amostras de pH 2,5 e 6,5, estas foram resfriadas e ajustadas para o pH 4,5 e analisadas. No pH 4,5, a β -lactoglobulina formou agregados bastante compactos. Houve a formação de glóbulos de 0,5 μ m de diâmetro que se fundiram em grandes agregados de formato irregular. Os precipitados de pH 2,5 e 6,5 formaram agregados consideravelmente menores que os agregados de pH 4,5. A estrutura dos agregados de pH 6,5 foi parecida com a estrutura obtida no pH 2,5, apresentando este último uma rede fibrosa mais densa. A β -lactoglobulina precipitou quando aquecida em pH 4,5, o que não ocorreu no pH 6,5 ou no pH 2,5.

Segundo Hollar *et alii* (26), agregados solúveis são formados em CPS com pH \geq 6,6, quando tratado termicamente por 30 minutos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Parris *et alii* (45). Entretanto, o aquecimento por um tempo maior que 60 minutos diminuiu os agregados solúveis e aumentou os precipitados insolúveis. Esse fato sugere que uma concentração crítica de agregados solúveis é necessária para a formação de

agregados grandes e insolúveis. Quanto menor o teor de cálcio do CPS, maior foi o número de agregados solúveis formados.

Segundo Havea *et alii* (25), soluções de CPS aquecidas à 75°C formam agregados de β -lactoglobulina, α -lactalbumina, ASB, caseínas e constituintes menores, através tanto de interações hidrofóbicas quanto de pontes dissulfídicas. A extensão da agregação e a natureza das forças estabilizadoras dependeram da concentração da proteína na solução. A quantidade de β -lactoglobulina associada hidrofobicamente aumentou com o aumento da concentração, enquanto que para a α -lactalbumina esse comportamento aconteceu de maneira menos pronunciada.

Dumay & Cheftel (13) observaram a formação de agregados solúveis de β -lactoglobulina nos níveis de pH de 7,7 e 9,2 e tratamento térmico de 65-82°C. Tais agregados apresentaram os seguintes pesos: 37.000-150.000 Daltons (com concentração de proteína de 0,94%) ou entre $6 - 10 \times 10^{-5}$ (à 10,4% de dispersão de proteína). A quantidade dos agregados solúveis aumentou com a temperatura, pH e tempo de aquecimento (entre 0 e 10 minutos).

Segundo Dalgueish *et alii* (9) a α -lactalbumina não forma agregados quando aquecida à 75°C por 8 minutos. Já a β -lactoglobulina forma agregados grandes sem a evidência da ocorrência de intermediários. Em soluções binárias, essas proteínas interagem formando agregados solúveis, tanto por interações hidrofóbicas como por ligações dissulfídicas. A formação dos agregados foi significativamente afetada pela proporção entre as duas proteínas. Quando a proporção em peso de α -lactalbumina foi $< 0,3$, ocorreu a formação dos agregados (300.000 Daltons), sem a formação de intermediários. Estes, por sua vez, apareceram quando existiu uma proporção igual entre as duas proteínas, e seu peso médio foi de 100.000 Daltons. Quando a proporção de α -lactalbumina foi de 0,95, somente intermediários foram formados e sua quantidade aumentou lentamente com o tempo.

Exposição da superfície hidrofóbica pela ação do calor

Vários autores tem relacionado a necessidade de que ocorra uma certa exposição dos grupos hidrofóbicos das proteínas para que se melhore as propriedades emulsificantes (20,32,35,48,57). Esse aumento nas propriedades emulsificantes das proteínas, pela exposição dos grupos hidrofóbicos que estão escondidos dentro da sua estrutura globular, deve ocorrer de modo que não ocorra uma considerável perda de solubilidade (4, 57). Outro fator importante é que as propriedades emulsificantes dependem do balanço existente entre os grupos hidrofílicos e hidrofóbicos da molécula da proteína, isto é, do seu valor de HLB. Segundo Aoki *et alii* (3), um leve deslocamento do balanço para um valor mais hidrofóbico pode melhorar sensivelmente as propriedades emulsificantes; entretanto, uma exposição excessiva causa uma diminuição nas propriedades de emulsificação.

Laligant *et alii* (33) estudou a superfície hidrofóbica da β -lactoglobulina pela sua ligação com ANS (8-anilino-1-naftalenosulfonato) e retinol. A afinidade da β -lactoglobulina com o ANS foi muito pequena, quando comparada com sua afinidade pelo retinol. Essa afinidade pelo retinol diminuiu quando o pH diminuiu de 7,5 para 6,5, provavelmente pela alta proporção de dímeros da β -lactoglobulina no pH 6,5. O aquecimento da β -lactoglobulina (1%) também diminuiu a afinidade pelo retinol. O progressivo aquecimento à pH 7,5 causou a dissociação dos dímeros em monômeros e uma agregação posterior em oligômeros. O aquecimento no pH 6,5 causou a formação de agregados solúveis de alto peso molecular os quais foram, provavelmente responsáveis pela menor afinidade pelo retinol.

Voutsinas *et alii* (57), estudou a hidrofobicidade de várias proteínas afetadas pela desnaturação térmica. Em geral, à medida que a desnaturação aumentou, houve diminuição da solubilidade da proteína, mas a hidrofobicidade aumentou, com uma consequente melhora das propriedades emulsificantes. No caso das proteínas do soro como a ASB e a β -lactoglobulina, a hidrofobicidade diminuiu com a desnaturação, diminuindo com isso também as propriedades emulsificantes. Esse fato mostra uma possível participação de grupos hidrofóbicos expostos em interações hidrofóbicas. Em geral, para amostras com mesmo índice de solubilidade, aquela mais hidrofóbica apresentou as melhores propriedades emulsificantes. Zhu *et alii* (60) também observou uma queda na superfície hidrofóbica para a β -lactoglobulina durante o tratamento térmico.

Tipos de Desestabilização

Cremação ou Drenagem

O cremação é o movimento da fase dispersa, devido à diferença de densidade óleo-água. Em emulsões com baixo volume de óleo esse processo é chamado de *cremação*, enquanto que para altas proporções de óleo o processo é chamado *drenagem* (19,23). A velocidade de cremação (V) vem da lei de Stokes:

$$V = \frac{g \Delta\rho d^2}{18 \eta_0}$$

onde g = força gravitacional; $\Delta\rho$ = diferença de densidade entre as fases; d = diâmetro do glóbulo e η_0 = viscosidade da fase contínua.

Segundo Hill (23), para glóbulos menores que 1 μm não há cremação, pois o movimento Browniano torna-se maior que a força gravitacional. Segundo Halling (19), a equação que descreve o movimento Browniano é:

$$V = \frac{4 K T \phi}{\pi d^3 \eta_0}$$

onde K = constante de Boltzmann; T = temperatura; ϕ = fração volumétrica de óleo; $\pi = 3.1416$; d = diâmetro do glóbulo; η_0 = viscosidade da fase contínua.

Pode-se claramente notar, através da comparação das duas equações acima, a importância da diminuição do diâmetro do glóbulo de gordura na desestabilização por cremação. O efeito elétrico não tem importância quando existe cremação (23).

Floculação

A floculação é uma agregação reversível de glóbulos de gordura unidos por forças frágeis. O aparecimento do “floco” depende da fração volumétrica entre óleo e água, e das forças de interação entre os glóbulos. A floculação é prevenida pelas forças de repulsão eletrostáticas e pelo efeito estérico. Sua maior diferença em relação à coalescência está no fato de que na floculação os glóbulos se unem sem a ruptura do filme interfacial que os envolve (19).

Coalescência

Caso as forças atrativas forem grandes o suficiente para vencer a barreira energética e juntar dois glóbulos, quebrando o filme ou retirando os estabilizantes da interface, o glóbulo irá então coalescer. A quebra do filme é um processo lento e ocorre somente quando os glóbulos estão juntos por certo tempo, numa camada de creme ou em flocos (23).

Avaliação das Propriedades Emulsificantes

Existem dois problemas na avaliação das propriedades emulsificantes: o primeiro diz respeito ao procedimento com que a emulsão é feita; o segundo, ao método que se usa para a análise da emulsão já formada.

Vários equipamentos tem sido usados para a formação de emulsões: homogenizadores de pistão (46,50), equipamentos ultrasônicos (40), misturadores tipo Waring Blenders (46) e equipamentos como o Ultra Turrax (15,30) e o Polytron PT20 (44,59). Esses instrumentos tem diferentes capacidades de formar a emulsão quanto ao tamanho do glóbulo, e por isso as comparações entre os diversos trabalhos devem ser feitas com cautela.

Existem três tipos de medida geralmente usados para se avaliar as propriedades de emulsificação: a capacidade da emulsão (EC), o índice de atividade da emulsão (EAI) e o índice de estabilidade da emulsão.

A capacidade da emulsão (EC) refere-se ao teste onde o óleo é adicionado numa velocidade fixa, em uma solução de proteína de concentração predeterminada, a qual é

continuamente agitada por um misturador. Num certo ponto, ocorre o ponto de “quebra” ou “inversão” da emulsão. A EC mede a quantidade de óleo que é emulsificada até o ponto antes da quebra da emulsão. Geralmente é expressa em “ml_{óleo}/g_{proteína}”. Vários podem ser os indicadores da quebra da emulsão: mudança visual, repentina queda na viscosidade ou repentino aumento na resistência elétrica (23). A EC também pode ser estimada através de medidas contínuas na alteração da condutividade elétrica (29,30).

Outro método grandemente utilizado é o método turbidimétrico de Pearce and Kinsella (46), que estabeleceu o índice de atividade da emulsão (EAI). Esse método baseia-se em que, para dispersões diluídas de partículas esféricas, a turbidez é diretamente proporcional a área interfacial da emulsão. Portanto, o EAI pode ser definido como:

$$EAI = \frac{2 T D}{\phi C}$$

onde T = turbidez; D = fator de diluição; ϕ = fração volumétrica de óleo; C = peso de proteína por unidade de volume da fase aquosa, antes da formação da emulsão.

Essa equação relaciona a área interfacial da emulsão que é estabilizada por peso de proteína. É geralmente expressa em “m²/g”.

O terceiro parâmetro se relaciona com a estabilidade e é, por definição, a capacidade que uma proteína possui de “manter” a emulsão inalterada, após um certo tempo, à uma temperatura e força gravitacional fixas. O índice de estabilidade da emulsão é, sem dúvida, o teste que apresenta a maior variabilidade de métodos para a sua execução. Métodos gravimétricos são frequentemente usados (1,27,34,36,55,59). Os métodos podem usar centrífugas (27,36), ou esperar que a separação ocorra após certo tempo, geralmente 24 horas (1,34,55,59). Vários autores também usam a queda na turbidez como índice de estabilidade (44,46,54).

Segundo Pilosof *et alii* (49), a estimativa do tamanho do glóbulo em função do tempo é a medida mais apropriada para a avaliação da “qualidade” de uma emulsão. O tamanho do

glóbulo pode ser estimado por microscopia, sedimentação com centrífugas, espectroturbidimetricamente, ou com o uso do analisador de partículas ou por difração de raios laser.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do CPS

O soro obtido da produção de queijo Minas Frescal, a partir de 100 litros de leite, foi desnatado e dividido em 11 partes iguais, de seis litros cada uma. Cada parte foi ajustada ao pH escolhido com NaOH ou HCl segundo os níveis da Tabela 1. O soro permaneceu sob leve agitação durante um período de 15 minutos, sendo continuamente monitorado. Após o ajuste de pH, o soro foi aquecido à taxa de aproximadamente 6°C/minuto, até os níveis de temperatura escolhidos. Após permanecer por 2 minutos na temperatura desejada, o soro foi resfriado à temperatura ambiente com o auxílio de um banho de gelo e congelado a -7°C. Antes de cada ultrafiltração, cada amostra foi descongelada e centrifugada à 1600 rpm durante 25 minutos, para a remoção de uma pequena quantidade de material insolúvel formado após os tratamentos térmicos mais intensos ($\geq 75^\circ\text{C}/2$ minutos). A ultrafiltração foi realizada em uma membrana cerâmica Carbosep, com peso molecular de corte de 20.000 Daltons e área superficial de 74,6 cm². A temperatura de ultrafiltração utilizada foi de 55°C e a pressão transmembrana de 45 psi. O processo de UF foi interrompido quando se atingiu o fator de concentração de 8. O retentado foi congelado e liofilizado por um período de 48 horas. O pó obtido (concentrado protéico de soro) foi então embalado em recipientes plásticos herméticos e armazenados em freezer para posterior análise.

A limpeza da membrana foi realizada com a circulação de hipoclorito de sódio a 200 ppm e ácido nítrico (5ml/l), durante 30 minutos à uma temperatura de 50°C e pressão de 30 psi. Água deionizada foi usada para o enxague da membrana, após o uso das soluções de limpeza.

Os CPS produzidos foram comparados com uma amostra comercial, Alacen 152®, fornecida pela New Zealand Milk Products, comercializado pelo fabricante para aplicações funcionais em alimentos.

Unidade de Ultrafiltração

Um esquema do equipamento utilizado pode ser visto na Figura 1. O soro foi recirculado do compartimento de alimentação da bomba através da membrana de ultrafiltração. A pressão transmembrana foi monitorada através de dois manômetros que se localizavam na entrada e na saída da membrana. A temperatura de UF foi monitorada através de um termômetro imerso dentro do compartimento de alimentação. A temperatura de UF foi mantida a 55°C, com auxílio de um isolante térmico e de água quente recirculando entre o isolante e a bomba. As curvas de permeação foram construídas através do monitoramento do peso de permeado, em intervalos pré-determinados, através de uma balança semi-analítica.

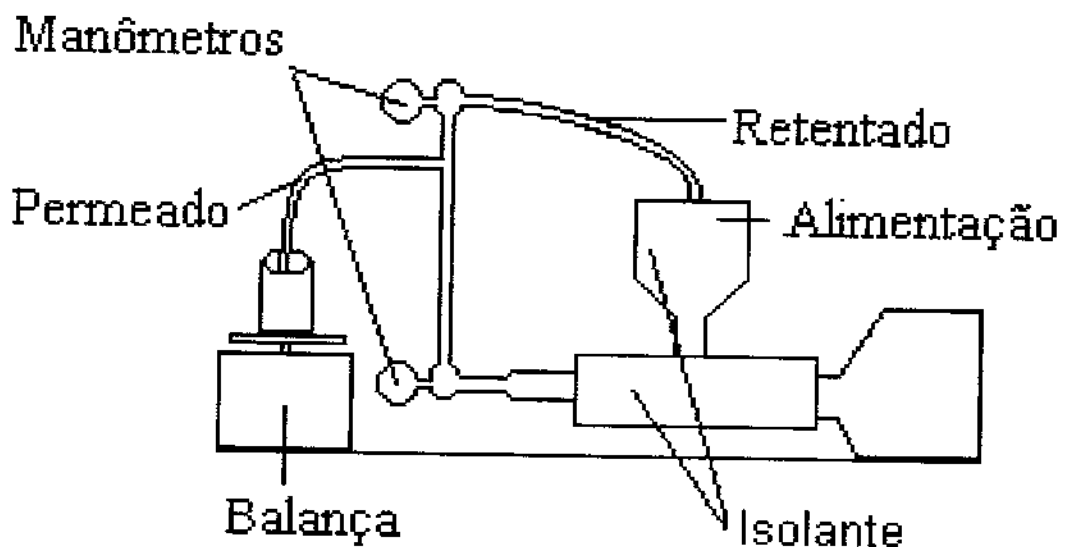


Figura 1. Unidade de UF.

Métodos

Determinação da composição dos CPS

Duas gramas de CPS foram diluídas em água destilada, em balão volumétrico de 100 ml. Os teores de gordura, cinzas, umidade e nitrogênio não protéico desta solução foram determinadas segundo metodologia da AOAC (2). A gordura foi determinada pelo método de Mojonier. O nitrogênio total foi determinado usando o método de micro-Kjeldahl (17). As determinações de nitrogênio foram multiplicadas por 6,38 para dar o equivalente em proteína. O teor de lactose foi determinada por diferença. O valor das médias das triplicatas foi então multiplicado pelo fator de diluição de 50 para a obtenção da composição nos CPS.

Formação da emulsão

50 ml de uma solução à 2 % de proteína (p/v) foi emulsificada com 12,5 ml de óleo de soja, em homogenizador Janke & Kunkel Ika-Werk, modelo T25 Basic, com haste dispersora SN 18 G à 9500 rpm por 10 minutos.

Determinação do índice de solubilidade à pH 4,6

Para a determinação do índice de solubilidade seguiu-se o método descrito por Morr *et alii* (42). Pesou-se precisamente 500 mg de proteína de soro em pó em um bequer de 50 ml. Foram adicionadas várias alíquotas de NaCl 0,1 M com agitação até a formação de uma pasta. Adicionou-se NaCl 0,1 M até a marca de 40 ml de volume. Colocou-se o béquer sob agitação e acertou-se imediatamente o pH da solução com HCl 0,1 N até 4,6. A dispersão foi então agitada por 1 hora e o pH monitorado e mantido no valor escolhido por todo o período de agitação. A dispersão foi então transferida para um balão de 50 ml e diluído até a marca com NaCl 0,1 M. A solução foi centrifugada por 30 minutos à 20.000 x g e o sobrenadante foi pesado em papel Watman N°1. O teor de proteína do sobrenadante foi analisada por Kjeldahl e o índice de solubilidade à pH 4,6 (%PS) foi calculado como abaixo:

$$\%PS = \frac{(C \times 50)}{P} \times 100$$

onde C = concentração de proteína no sobrenadante (mg/ml) e P = massa de proteína na amostra (mg).

Determinação do índice de atividade da emulsão

Para a determinação do índice de atividade da emulsão seguiu-se o procedimento descrito por Pearce & Kinsella (46). Uma alíquota de 0,5 ml de emulsão foi primeiramente diluída em 25g de uma solução de 1% de sódio dodecil sulfato (SDS). Dessa primeira diluição uma nova alíquota de 0,5 ml foi novamente diluída em 50g de uma solução 1% de SDS, para que se estabeleça uma diluição 1/5000. A absorvância à 500 nm da solução final foi medida em espectrofotômetro e o índice de atividade da emulsão (EAI) foi dado por:

$$EAI = \frac{2 \times 2,303 \times D \times A}{\phi \times C \times 10000} \quad (m^2/g)$$

onde D = fator de diluição; A = absorvância à 500 nm; ϕ = fração volumétrica de óleo; C = concentração de proteína da fase aquosa antes da formação da emulsão e 10.000 = fator de correção para metros quadrados.

Determinação do índice de estabilidade da emulsão

Para a determinação do índice de estabilidade seguiu-se o método descrito por Tornberg & Hermansson (55), modificado por Yamauchi *et alii* (59). A emulsão foi deixada em repouso, à temperatura de 15°C por 24 horas, em béquer de plástico de 100 ml. Uma alíquota de 3 gramas foi então retirada do fundo do béquer e o seu teor de gordura (F₁) foi analisado através do método de Bligh and Dyer (6). A variação da estabilidade (SR) foi então medida por:

$$SR = \frac{F_1 \times 100}{F_0} \quad (\%)$$

onde F_1 = porcentagem de gordura do fundo do recipiente após 24 horas e F_0 = porcentagem de gordura inicial.

Planejamento experimental

O planejamento experimental foi estabelecido conforme o procedimento descrito por Bruns *et alii* (8). Foi usado um planejamento fatorial 2^2 , isto é, um planejamento com duas variáveis (pH e tratamento térmico), e dois níveis para cada variável. Os níveis para o pH foram de 6 (nível inferior) e 7 (nível superior), e para o tratamento térmico os níveis foram de 70°C/2 minutos (nível inferior) e 80°C/2 minutos (nível superior). Nesse estudo, o nível inferior foi codificado como -1 e o nível superior como +1.

Tabela 1: Planejamento fatorial para os níveis de pH e tratamento térmico.				
Experimentos	Níveis Codificados		Níveis Descodificados	
			pH	T (°C)
T1	-1	-1	6	70
T2	+1	-1	7	70
T3	-1	+1	6	80
T4	+1	+1	7	80
T5 (C*)	0	0	6,5	75
T6 (C)	0	0	6,5	75
T7 (C)	0	0	6,5	75
T8	-1,4142	0	5,79	75
T9	0	1,4142	6,5	82
T10	1,4142	0	7,21	75
T11	0	-1,4142	6,5	68

* (C) – experimentos no ponto central.

Através dos tratamentos no ponto central (T5, T6 e T7) foi calculado o erro experimental do processo. Os resultados foram analisados através do cálculo dos efeitos, segundo Bruns *et alii* (8), e através das superfícies de resposta geradas pelo Software STATISTICA 5.0®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição dos CPS

A Tabela 2 mostra a composição centesimal do CPS em função dos pré-tratamentos. Em média, o teor de proteína do CPS foi de 29 a 34%, e o teor de cinzas entre 4,5 e 8,66%. O teor de cinzas aumentou nos níveis de maior pH e maior tratamento térmico, provavelmente devido à uma maior precipitação dos sais de cálcio. O teor de gordura variou em média entre 7 e 11% e o NNP entre 0,44 e 0,70% .

Tabela 2: Composição centesimal* dos concentrados protéicos de soro, do soro original e da amostra comercial.

Tratamento (pH-T°C)	Cinzas	Proteína	Gordura	Lactose	NNP
1 (6-70)	5,48 ± 0,23	31,31 ± 0,06	8,25 ± 1,45	54,40	0,57 ± 0,06
2 (7-70)	6,24 ± 0,88	29,67 ± 0,29	9,79 ± 0,24	53,70	0,60 ± 0,01
3 (6-80)	5,26 ± 0,16	27,33 ± 0,05	10,00 ± 1,15	56,82	0,59 ± 0,04
4 (7-80)	7,37 ± 0,43	32,23 ± 0,12	9,60 ± 1,17	50,22	0,58 ± 0,02
5 (6,5-75)	6,19 ± 0,05	31,87 ± 0,12	10,93 ± 0,57	50,54	0,47 ± 0,08
6 (6,5-75)	6,19 ± 0,37	33,10 ± 0,05	13,38 ± 1,20	46,79	0,54 ± 0,03
7 (6,5-75)	5,81 ± 1,39	31,09 ± 0,03	9,08 ± 0,67	53,58	0,44 ± 0,02
8 (5,79-75)	4,40 ± 0,40	33,06 ± 0,08	6,94 ± 0,21	55,13	0,48 ± 0,03
9 (6,5-82)	4,13 ± 0,88	25,58 ± 0,11	10,99 ± 0,87	58,63	0,66 ± 0,06
10 (7,21-75)	8,66 ± 0,26	33,39 ± 0,30	7,98 ± 0,51	49,11	0,85 ± 0,01
11 (6,5-68)	5,86 ± 0,20	33,10 ± 0,25	9,33 ± 0,33	51,13	0,58 ± 0,02
ALA**	3,15 ± 0,89	73,89 ± 0,30	6,82 ± 0,29	15,95	0,19 ± 0,01
Soro***	0,36 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,32 ± 0,05	4,91	0,03 ± 0,00

*Composição centesimal em base seca, onde cada valor é a média de três pontos (Média ± Desvio Padrão) ** Amostra comercial obtida com a New Zealand Milk Products, *** Soro original obtido da produção do queijo Minas Frescal (em base úmida, com %Umidade = 93,72 ± 0,16).

Efeitos do pH e do Tratamento Térmico

O valor do índice de estabilidade da emulsão (EAI), do índice de estabilidade (SR) e do índice de solubilidade protéica à pH 4,6 (%PS) podem ser vistos na Tabela 3. O índice de atividade da emulsão (EAI) dos CPS variou em média entre 26 e 49 m²/g, e o índice de estabilidade (SR) entre 3,20 e 9,6%. O índice de atividade e o índice de estabilidade aumentaram com o aumento do pH. O EAI da amostra comercial foi comparável aos índices de atividade dos CPS produzidos à pH 6. Entretanto, o valor de SR da amostra comercial foi comparável aos índices de estabilidade dos CPS produzidos à pH 7. A amostra comercial apresentou a melhor solubilidade à pH 4,6 (89,23%), a qual foi bastante similar à solubilidade da combinação de menor tratamento térmico (88,57%).

Tabela 3: O índice de atividade da emulsão (EAI)*, a variação de estabilidade (SR)* e a solubilidade à pH 4.6 (%PS)* para cada tratamento				
Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes		
pH	Trat. Térmico (°C/2 minutos)	EAI (m ² /g)	SR (%)	%PS
6	70	26,57 ± 0,32	3,54 ± 0,07	85,64 ± 1,29
7	70	49,20 ± 1,31	9,60 ± 0,60	76,28 ± 2,72
6	80	28,99 ± 0,60	3,34 ± 0,18	68,67 ± 4,25
7	80	40,76 ± 0,69	7,41 ± 0,02	63,80 ± 1,94
6,5	75	31,41 ± 0,09	6,44 ± 0,97	78,63 ± 0,73
6,5	75	35,52 ± 1,15	6,80 ± 0,00	82,21 ± 2,25
6,5	75	30,51 ± 0,17	6,30 ± 0,37	85,06 ± 1,02
5,79	75	24,76 ± 0,23	3,24 ± 0,17	75,97 ± 0,49
6,5	82	28,41 ± 0,20	4,52 ± 0,25	68,19 ± 0,07
7,21	75	41,80 ± 1,43	5,61 ± 1,05	66,05 ± 0,55
6,5	68	26,95 ± 0,34	3,35 ± 0,06	88,57 ± 1,01
ALA		26,00 ± 0,66	5,83 ± 0,33	89,23 ± 2,99

* Análise realizada em duplicata (Média ± Desvio Padrão).

A Tabela 4 mostra os efeitos do pH e do tratamento térmico nas propriedades emulsificantes do concentrado protéico de soro e na solubilidade à pH 4,6. O índice de atividade (EAI) e o índice de estabilidade (SR) foram principalmente afetados pelo pH do soro. Já o aumento do nível do tratamento térmico foi o principal responsável pela diminuição da solubilidade protéica à pH 4,6 (%PS) e contribuiu levemente para a diminuição do índice de estabilidade (SR).

Tabela 4: Valor dos efeitos de cada pré-tratamento sobre as respostas EAI, SR e %PS.

Efeito	EAI	SR	%PS
Trat. Térmico	-3,01 ^{ns}	-1,20*	-14,73*
PH	17,20*	5,06*	-7,12 ^{ns}
pHxTrat. Térmico	-5,43 ^{ns}	-1,00 ^{ns}	2,25 ^{ns}

*= Efeito significativo à $p < 0,05$; ns = efeito não significativo à $p < 0,05$.

Análise Estatística e Superfície de Resposta

Solubilidade à pH 4,6

O nível de desnaturação das proteínas do soro pode ser estimado pela medida da perda de solubilidade dos CPS na faixa do ponto isoelétrico (43). Embora o efeito do pH tenha se mostrado não significativo à $p < 0,05$, os coeficientes da regressão referentes ao pH foram mantidos no modelo. É longamente sabido que o nível de desnaturação depende tanto do tratamento térmico quanto do pH (5,11,18,43,52), razão pela qual foram mantidos esses coeficientes no modelo de superfície de resposta. Apesar de não ser significativo à $p < 0,05$, o coeficiente de pH quadrático foi significativo à $p < 0,06$, enquanto que o termo de pH linear foi significativo à $p < 0,10$. O coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,93. A significância do modelo gerado foi analisada por ANOVA (Tabela 5). Através do ajuste dos pontos experimentais (Tabela 3) foi gerado o modelo abaixo:

$$Z = 80,02 - 7,28Y - 3,53X - 5,14X^2 \quad (1)$$

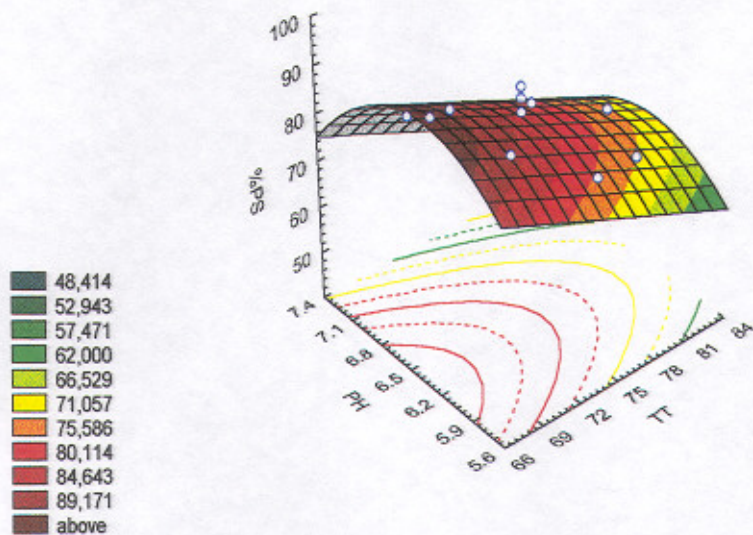
onde Z = %PS; Y = tratamento térmico e X = nível de pH.

	SQ*	GL**	MQ***	F	F _{tabelado}
Regressão	687,84991	3	229,28330	30,61	4,35
Resíduos	52,43309	7	7,49044		
Falta Ajuste	31,67187	5	6,334374	0,61	19,3
Erro Puro	20,76127	2	10,380635		
Total	740,283				

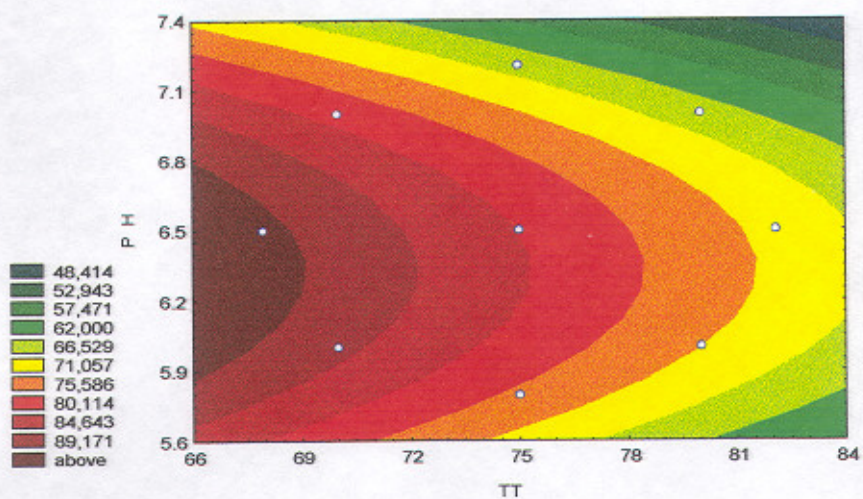
* SQ – Soma quadrática. ** GL – graus de liberdade. *** MQ – média quadrática.

Em geral, se o valor de $F_{\text{calculado}}$ do modelo for de quatro a cinco vezes maior que o F_{tabelado} , assume-se que o modelo é significativo e preditivo, no nível de significância escolhido. Portanto, os resultados obtidos e apresentados na Tabela 5 mostram que o modelo é significativo e preditivo, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi sete vezes maior que o F_{tabelado} , a $p < 0,05$. A superfície de resposta para a solubilidade à pH 4,6 pode ser vista na Figura 2. Para a obtenção do valor da solubilidade protéica à pH 4,6 através do modelo da equação (1), os valores das variáveis independentes (pH e tratamento térmico) devem estar em sua forma codificada (Tabela 1).

Segundo o modelo gerado, o aumento do tratamento térmico do soro diminuiu a solubilidade dos CPS. Quando a temperatura aumenta, as interações eletrostáticas, as pontes de hidrogênio e as interações de Wan der Waals são enfraquecidas (37,52). As interações hidrofóbicas aumentam até a faixa de 60-70°C, quando então começam a diminuir. As reações dissulfídicas e a frequência de colisão molecular também aumentam (37). Consequentemente, é natural que a desnaturação e a agregação das proteínas aumentem com o aumento da temperatura.



(a)



(b)

Figura 2 – Superfície de resposta do efeito do pH e do tratamento térmico na solubilidade à pH 4.6 (%PS). (a) superfície em 3D. (b) superfície rebatida em 2D. TT = Tratamento térmico.

A Figura 2 mostra um comportamento quadrático para o efeito do pH na solubilidade à pH 4,6. A região de máxima solubilidade da proteína esteve entre o pH 6,1 e 6,6, com um tratamento térmico de 68°C/2 minutos. A solubilidade máxima foi encontrada à pH 6,33 e 68°C/2 minutos. Vários autores tem demonstrado que um aumento no pH, entre 6 e 7, antes do tratamento térmico, provoca um aumento na desnaturação protéica (5,11,18,43,52). Tem sido sugerido que isso ocorra pelo aumento da reatividade do grupo sulfidril livre da β -lactoglobulina. À medida que o pH é aumentado de 6 para 7, a conformação das proteínas muda consideravelmente e a β -lactoglobulina, principal proteína dos CPS, tende a passar do seu estado de dímero para o de monômero (33,48). Essa passagem expõe o grupo sulfidril da β -lactoglobulina, o qual fica localizado numa região hidrofóbica entre os dois monômeros que formam o dímero (48). A exposição do grupo sulfidril livre também é favorecida pelo aumento da temperatura acima de 65°C (9). Em pH mais básico, ocorre também a oxidação desse grupo, promovendo reações dissulfídicas intra ou intermoleculares, as quais ocorrem em paralelo com o desdobramento e agregação (41,52).

Com o aumento da temperatura e do pH, ocorre também um aumento na insolubilidade dos sais de cálcio. Isso fez com que, durante o processo de UF do soro, a concentração de cálcio no retentado aumentasse progressivamente à medida que o processo de UF fosse sendo realizado. Isso pode ser observado pelo aumento na concentração de cinzas dos CPS à pH 7 (Tabela 2). Agregados solúveis entre as proteínas do soro são formados quando o pH é aumentado acima de 6,6 (26,45). No entanto, a solubilidade desses agregados diminui com o aumento da concentração de cálcio do meio (13,26,45). deWitt and Klarenbeek (11) demonstraram que um aumento na concentração de íons de cálcio do meio, após o tratamento térmico, diminui consideravelmente a solubilidade da β -lactoglobulina. O fato de que a concentração de cálcio aumentou nos processamentos à pH 7, pode ajudar a explicar porque foi encontrada uma maior precipitação de proteína nesse pH, visto que os agregados formados deveriam ser, teoricamente, mais solúveis nessas condições. O tempo prolongado de ultrafiltração, cerca de 8-10 horas para os CPS produzidos à pH 6 e 6,5, e 14 horas para os CPS produzidos à pH 7, pode também ter promovido uma maior precipitação das proteínas.

Estabilidade da emulsão

Os resultados para o índice de estabilidade SR foram analisados com base na tabela dos efeitos (Tabela 4). O aumento no pH aumentou significativamente o valor de SR à $p < 0,05$. Esse fato pode ser atribuído à forte dependência das emulsões produzidas com CPS com as forças eletrostáticas do meio (5,18,44). Essas forças aumentam quando o pH é aumentado de 6 para 7, prevenindo a aproximação dos glóbulos de gordura.

O aumento do tratamento térmico ocasionou uma diminuição significativa no valor da estabilidade somente à pH 7. Em pH 6, o efeito do tratamento térmico não foi significativo à $p < 0,05$. O valor do efeito a pH 7 foi de -1.1%, enquanto que o efeito a pH 6 foi de apenas -0.1%. Isso está de acordo com uma maior perda de solubilidade da proteína, ocorrida com o aumento da temperatura à pH 7 (Figura 2). Esse fato mostra que provavelmente uma desnaturação mais acentuada a pH 7 pode ter diminuído a superfície hidrofóbica disponível para interagir com a fase lipídica. Um efeito prejudicial no índice de estabilidade (SR) também foi encontrado por Kim *et alii* (31), usando um tratamento térmico de 50°C/8 minutos à pH 7,3, antes da UF do soro de queijo. Em pH 6, no entanto, não é possível afirmar que isso ocorra, devido ao baixo efeito obtido. Segundo Voutsinas *et alii* (57), um tratamento térmico de 80°C/4 minutos em pH 6, provocou um pequeno aumento da superfície hidrofóbica dos concentrados protéicos de soro, com uma pequena melhora do índice de estabilidade da emulsão (EAI) e do índice de estabilidade usado. Portanto, em pH 6, estudos mais aprofundados devem ser realizados para uma melhor clareza dos efeitos associados ao tratamento térmico.

Índice de atividade da emulsão

O modelo gerado, através dos dados da Tabela 3, para o índice de atividade pode ser visto abaixo:

$$Z = 32,85 + 6,88 X \quad (2)$$

onde Z = índice de atividade da emulsão (EAI) e X = nível de pH.

O coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,76. A tabela de análise de variância pode ser vista na Tabela 7. Como o $F_{\text{calculado}}$ foi seis vezes maior que o F_{tabelado} , o modelo foi significativo à $p < 0,05$ e a superfície de resposta pode ser vista na Figura 3. Provavelmente, devido ao R^2 de 0,76 ser relativamente baixo, outras variáveis podem ser importantes para explicar a variação das propriedades emulsificantes, além da variação do nível de pH e tratamento térmico. Para a obtenção do valor do índice de atividade da emulsão através do modelo da equação (2), os valores das variáveis independentes (pH e tratamento térmico) devem estar em sua forma codificada (Tabela 1).

Tabela 7: Tabela ANOVA para o índice de atividade da emulsão (EAI)					
	SQ*	GL**	MQ***	F	F_{tabelado}
Regressão	378,3753	1	378,3753	28,64	5,12
Resíduos	118,9198	9	13,21331		
Falta Ajuste	104,6524	7	14,95034	2,10	19,35
Erro Puro	14,2674	2	7,1337		
Total	497,2951				

*SQ – Soma Quadrática; ** GL – Graus de Liberdade e *** MQ – Média Quadrática.

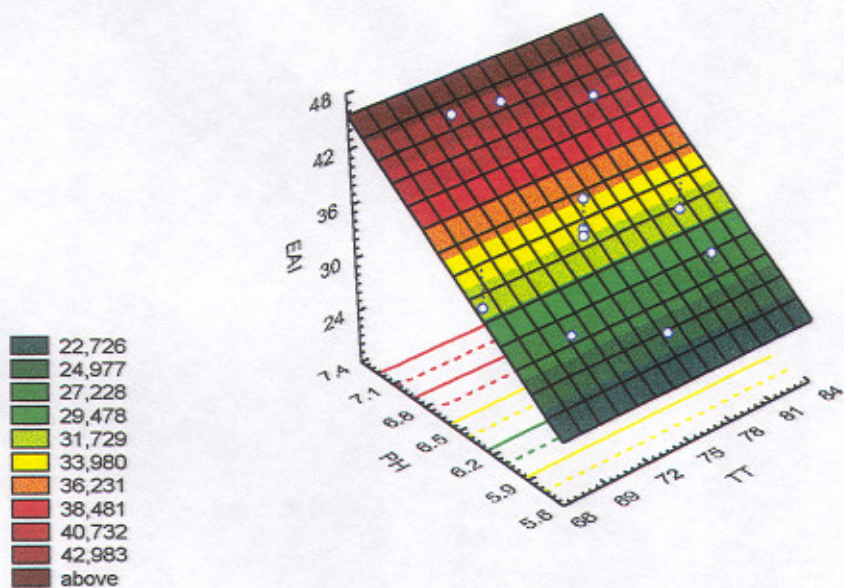
O EAI relaciona-se com a capacidade-habilidade da proteína ser absorvida na interface e se desdobrar-expandir, estabilizando a nova área criada (46). Nesse sentido, as mudanças conformacionais impostas à sua estrutura são extremamente importantes, pois se relacionam com variáveis como a sua superfície hidrofóbica efetiva, sua flexibilidade molecular, solubilidade, extensão de ligações dissulfídicas, nível de interações hidrofóbicas, e outras forças de estabilização. Uma forma de se perceber possíveis alterações na conformação protéica é através do monitoramento do seu nível de desnaturação.

Como pode ser visto na Figura 3, a variação no pH aumentou sensivelmente o índice de atividade da emulsão. Esse aumento está associado à uma maior desnaturação da proteína nessas condições, como podemos ver pela Figura 2. Tem-se proposto que uma desnaturação até certo nível, de modo que se exponham certos grupos hidrofóbicos das proteínas, pode melhorar as propriedades emulsificantes (20,57). Segundo Aoki *et alii* (3), as propriedades de emulsificação dependem do balanço existente entre os grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (HLB), e não necessariamente aumentam quando as proteínas se

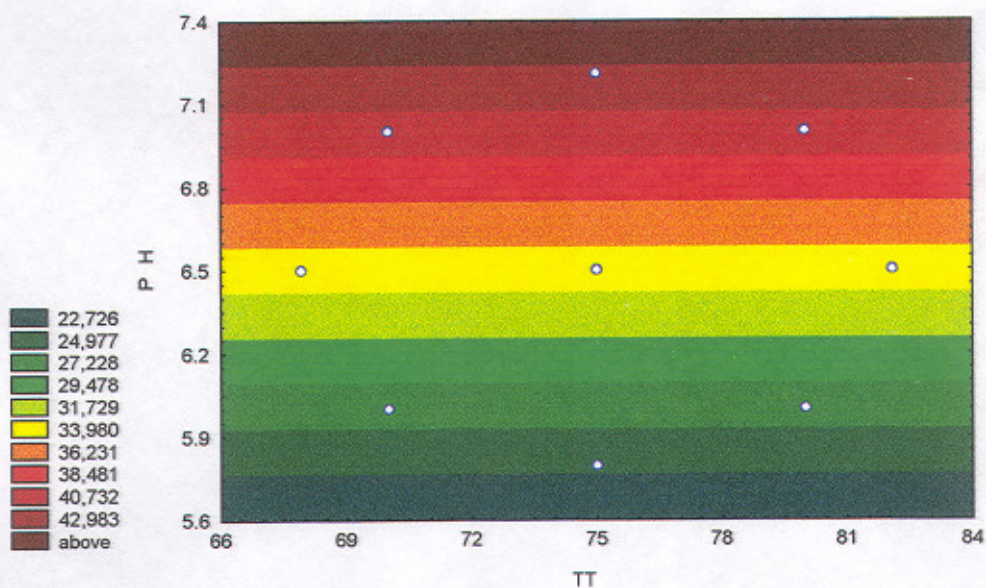
tornam mais hidrofóbicas. O grau de exposição dos resíduos hidrofóbicos deve estar relacionado com o balanço existente entre os resíduos hidrofóbicos e os resíduos hidrofílicos da molécula de proteína. Uma desnaturação excessiva pode tornar a molécula excessivamente hidrofóbica, prejudicando as propriedades de emulsificação (3).

As mudanças conformacionais na estrutura protéica parecem ter maior importância sobre o índice de atividade da emulsão, enquanto que as forças de repulsão eletrostáticas parecem influenciar mais fortemente a estabilidade da emulsão. Esse ponto pode ser analisado pelo fato de que a amostra comercial, apesar de possuir um pH de dispersão igual aos valores de pH dos concentrados produzidos à pH 7, apresentou valores de EAI consideravelmente menores. O EAI obtido com a amostra comercial foi semelhante aos valores obtidos com os CPS produzidos à pH 6, que foram na faixa de 24-28 m²/g (Tabela 3), enquanto os valores para os CPS produzidos à pH 7 foram na faixa de 40-49 m²/g. É razoável imaginar que essa diferença no EAI seja devida ao estado conformacional que a proteína se encontra, isto é, ao seu nível de desnaturação. Isso pode ser visto pelo modelo da solubilidade à pH 4,6, o qual mostra um nível de desnaturação bem maior para os CPS à pH 7 (faixa de 63,80 e 76,28%), em relação à pouca desnaturação da amostra comercial (89,23%). No entanto, tais diferenças conformacionais devem ser atribuídas à diferenças no processamento dos dois concentrados como um todo, desde o tipo de queijo produzido até o tipo de secagem utilizada. No entanto, se compararmos os valores do índice de estabilidade (SR), veremos que o valor obtido com a amostra comercial (5,8%), é bem maior que os valores obtidos com os concentrados protéicos de soro à pH 6 (na faixa de 3,34-3,54%), apesar dos seus valores de EAI estarem bastante próximos. Isso mostra a grande importância do nível de pH, maior na amostra comercial, devido ao aumento das interações eletrostáticas de repulsão na prevenção da desestabilização das emulsões.

O índice de atividade (EAI) apresentou correlação positiva e significativa de 0,86 à $p < 0,05$, com o índice de estabilidade da emulsão (SR). Outros trabalhos também encontraram altas correlações entre o EAI e o índice de estabilidade usado (28,56). Quanto maior é a área superficial, menor é o diâmetro dos glóbulos, e maior é a estabilidade da emulsão (56). Isso mostra que os CPS produzidos à pH 7, além de emulsificar quase o dobro da área interfacial, também possuem uma melhor capacidade de manter a emulsão inalterada.



(a)



(b)

Figura 3 – Superfície de resposta do efeito do pH e do tratamento térmico no índice de atividade da emulsão (concentração de proteína de 2% e $\phi = 0.20$). (a) superfície em 3D. (b) superfície rebatida em 2D. TT = Tratamento térmico.

CONCLUSÃO

A desnaturação dos concentrados protéicos de soro aumentou significativamente com o aumento do pH e do tratamento térmico do soro de queijo. O índice de atividade da emulsão e o índice de estabilidade aumentaram sensivelmente com o aumento do pH na faixa de 6 à 7. Um tratamento térmico mais intenso (80°C/2 minutos), diminuiu levemente a estabilidade da emulsão à pH 7. A combinação de pH 7 e de um tratamento térmico de 70°C/2 minutos, resultou num CPS com as melhores propriedades emulsificantes, provavelmente devido à algumas mudanças conformacionais na estrutura protéica, evidenciadas pela perda da solubilidade à pH 4,6, aliadas com a maior força de repulsão eletrostática nesse pH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ACTON, J. C.; SAFFLE, R.L. Stability of oil-in-water emulsions 1- Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**, 35:852-855, 1970.
- 2) AOAC. METHODS OF ANALYSIS. 16^a ed., Washington, D.C., **Assoc. Official Analytical Chemists**, 1995.
- 3) AOKI, H.; TANEYAMA, O.; ORIMO, N.; KITAGAWA, I. Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties, **Journal of Food Science**, Vol. 46: 1192-1195, 1981.
- 4) AKITA, E.M; NAKAI, S. Lipophilization of β -lactoglobulin. Effect on hydrophobicity, conformation and surface functional properties. **Journal of Food Science**, 55 (3) 7111-717, 1990).
- 5) BERNAL, V.; JELEN, P. Thermal stability of whey proteins: a calorimetric study. **Journal of Dairy Science** 68 (11) 2847-2852, 1985.
- 6) BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917, 1959.
- 7) BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Interfacial properties of milk protein-stabilized emulsions as influenced by protein concentration. **Journal Agric. Food Chemistry**, 41: 1187-1191, 1993.
- 8) BRUNS, P.E.; NETO, B.B.; SCARMINIO, T.S. **Planejamento e otimização de experimentos**, Campinas, SP, Editora da Unicamp, 299 p., 1995.

- 9) DALGLEISH, D. G.; SENARATNE, V.; FRANCOIS, S. Interactions between α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. **Journal Agric. Food Chemistry**, 45: 3459-3464, 1997.
- 10) DAMODARAN, S. Molecular properties affecting binding of proteins at interfaces. In: Seminário Internacional: Tópicos Especiais em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25, 26 e 27 de novembro de 1997, Ital-Campinas, p. 19-28.
- 11) De WITT, J. N.; KLARENBECK, G. Effects of Various heat treatments on the structure and solubility of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, 67: 2701-2710, 1984.
- 12) DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Emulsifying properties of whey protein concentrates. Correlations between different methods of evaluation. **Sciences des Aliments**, 6: 147-176, 1986.
- 13) DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Heat treatment of a β -lactoglobulin concentrate at slightly alkaline pHs: effects on the solubility and the chromatographic behaviour of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. **Sciences des Aliments**, 9: 561-582 (1989).
- 14) DYBING, S. T.; SMITH, D. E. Relation of chemistry and processing procedures to whey protein functionality: a review, **Cultured Dairy Products Journal**, 26 (1) 4-12, 1991.
- 15) EINHORN-STOLL, U.; CLASENAPP, N.; KUNZEK, H. Modified pectins in whey protein emulsions. **Nahrung** 40 (2) 60-67, 1996.
- 16) FANG, Y.; DALGLEISH, D.G. The conformation of α -lactalbumin as function of pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surfaces studied by FTIR. **Food Hydrocolloids**, 12: 121-126, 1998.
- 17) FIL-IDF – INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 20, Brussels, Belgium, 1962.

- 18) GHOTHAM, S.M.; FRYER, P.J.; PRITCHARD, A M. β -lactoglobulin denaturation and aggregation reactions and fouling formation: a DSC study. **International Journal of Food Science and Technology**, 27: 313-327, 1992.
- 19) HALLING, P.J. Protein-stabilized foams and emulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 15 (2) 155-203, 1981.
- 20) HARPER, W. J. Functional properties of whey protein concentrate and their relationship to ultrafiltration. **New Applications of Membrane Process, International Dairy Federation Issue N° 9201**, 1992.
- 21) HARWALKAR, V. R. Kinetic study of thermal denaturation of proteins in whey. **Milchwissenschaft**, 41 (4) 206-209, 1985.
- 22) HARWALKAR, V. R.; KALAB, M. Microstructure of isoelectric precipitates from β -lactoglobulin solutions heated at various pH values. **Milchwissenschaft**, 40 (11) 665-668, 1985.
- 23) HILL, S.E. Emulsions. In: Hall, G.M. (Ed.) **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Black Academic & Professional, 1996. Cap. 6, p. 153-182.
- 24) HILLIER, R. M.; LYSTER, R.L.; CHEESEMAN, G. C. Thermal denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cheese whey: effect of total solids concentration and pH. **Journal of Dairy Research**, 46, 103-111, 1979.
- 25) HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L.K.; CAMPANELLA, O. H. Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions, **Journal of Dairy Research**, 65: 79-94, 1998.
- 26) HOLLAR, C. M.; PARRIS, N.; HSIEH, A; COCKLEY, K. D Factors affecting the denaturation and aggregation of whey proteins in heat whey protein concentrates mixtures, **Journal Dairy Science**, 78: 260-267, 1995.

- 27) HUNG, S. C.; ZAYAS, J. F. Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour. **Journal of Food Science**, 56 (5) 1216-1223, 1991.
- 28) JACKMAN, R.; YADA, R. Y. Functional properties of whey-potato protein composite blends in a model system. **Journal of Food Science**, 53 (5) 1427 – 1432 (1451) 1988.
- 29) KAMAL AL-MALAH, P. S.; MCGUISE, J. On evaluating the emulsifying properties of protein using conductivity measurements. **Food Hydrocolloids**, 7 (3) 241-253, 1993.
- 30) KATO, A; FUJISHIGE, T.; MATSUDOMI, N.; KOBAYASHI, K. Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. **Journal of Food Science**, 50: 56-62, 1985.
- 31) KIM, S. H.; MORR, C. V.; SEO, A; SURAK, J. G. Effect of whey pretreatment on composition and functional properties of whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, 54 (1) 25-29, 1989.
- 32) KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, 33: 343-439, 1989.
- 33) LALIGANT, A; DUMAY, E.; VALENCIA, C. C.; CUQ, J. J.; CHEFTEL, J. C. Surface hydrophobicity and aggregation of β -lactoglobulin heated near neutral pH, **Journal Agric. Food Chemistry**, 39: 2147-2155, 1991.
- 34) LEE, S. Y.; MORR, C. V.; HÁ, E. W. Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. **Journal of Food Science** 57 (5) 1210-1213, 1992.
- 35) LEMAN, J.; KINSELLA, J. E. Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 28 (2) 115-139, 1989.

- 36) LEMAN, J.; HAQUE, Z.; KINSELLA, J. E. Creaming stability of fluid emulsions containing different milk protein concentrates preparations. **Milchwissenschaft**, 43 (5) 286-289, 1988.
- 37) LI-CHAN, E.; NAKAI, S.; WOOD, D. F. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties, **Journal of Food Science**, 49: 345-350, 1984.
- 38) LI-CHAN, E. Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate, **Journal of Food Science**, 48: 47-56, 1983.
- 39) MAN, B. ; MALIK, R.C. Studies on some functional characteristics of whey protein-polysaccharide complex. **Journal of Food Science and Technology**, 33 (3) 202-206, 1996.
- 40) McCLEMENTS, D. J. Advances in the ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science and Technology**, 6: 293-299, 1995.
- 41) MONAHAN, F. J.; GERMAN, J. B; KINSELLA, J.E.; Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/dissulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins. **Journal Agric. Food Chemistry**, 43: 46-52, 1995.
- 42) MORR, C.V.; GERMAN, B., KINSELLA, J.E., REGENSTEIN, J.M., VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure, **Journal of Food Science**, Vol 50: 1717-1718.
- 43) MULVIHILL, D. M.; DONOVAN, M. Whey proteins and their thermal denaturation – a review. **Irish Journal of Food Science and Technology**, 11: 43-75, 1987.

- 44) MUTILANGI, W. A. M.; KILARA, A. Functional properties of heat-denatured whey proteins II. Emulsifying and foaming properties. *Milchwissenschaft*, 40 (7) 391-393, 1985.
- 45) PARRIS, N.; ANEMA, S. G.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Aggregation of whey proteins in heated sweet whey. *Journal Agric. Food Chemistry*, 41: 460-464, 1993.
- 46) PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal Agric. Food Chemistry*, 26 (3) 716-723, 1978.
- 47) PHILLIPS, M. C. Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technology*, 35: 50-57, 1981.
- 48) PHILLIPS, L. G.; KINSELLA, J.; WHITEHEAD, D. M. Structure-function properties of food proteins, Academic Press, Inc., 1994.
- 49) PILOSOFF, A. M. R.; ELIZALDE, E. E.; CARP, D. J. Methodology for the study of surface functional properties. In: Seminário Internacional: Tópicos Especiais em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25, 26 e 27 de novembro de 1997, Ital-Campinas, p. 85-104.
- 50) PITTIA, P.; WILDE, P. J.; HUSHAND, F. A.; CLARK, D. C. Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high pressure treatment, *Journal of Food Science*, 61 (6) 1123-1128, 1996
- 51) RAEMY, A.; LAMBELET, P. Thermal behaviour of foods. *Thermochemica Acta*, 193: 417-439, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1991.
- 52) RELKIN, P. Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (6) 565-601, 1996.

- 53) RUEGG, M.; MOOR, U.; BLANC, B. A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. **Journal of Dairy Research**, 44: 509-520, 1977.
- 54) SHIMIZU, M.; YAMAUCHI, K.; SAITO, M. Emulsifying properties of the proteose-peptone fraction obtained from bovine milk. **Milchwissenschaft**, 44 (8) 497-500, 1989.
- 55) TORNBERG, E.; HERMANSSON, A. M. Functional characterization of protein stabilized emulsions: effect of processing. **Journal of Food Science**, 42 (2) 468-472, 1977.
- 56) TORO-VAZQUEZ, J.F.; REGENSTEIN, J.M. Physicochemical parameters of protein additives and their emulsifying properties. **Journal of Food Science**, 54 (5) 1177-1185 1989.
- 57) VOUTSINAS, L. P.; CHEUNG, E.; NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. **Journal of Food Science**, 48: 26-56, 1983.
- 58) WILDING, P.; LILFORD, P. J.; REGENSTEIN, J. M. Functional properties of proteins in foods, **Journal Chem. Techn. Biotechnol.**, 34B, 182-189, 1984.
- 59) YAMAUCHI, K.; SHIMIZU, M.; KAMIYA, T.; Emulsifying properties of whey proteins, **Journal of Food Science**, 45 : 1237-1242, 1980
- 60) ZHU, H.; DAMODARAN, S. Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties, **Journal Agric. Food Chemistry**, 42: 846-855, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE I – TABELAS DE CÁLCULO PARA A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Tabela 1. Teor de gordura em base seca (%Gm (BS)) dos concentrados protéicos de soro em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamento	Replicatas	Peso Placa	Amostra	Placa+G.	%G	%Gm
1	1	129,0345	10,1266	129,0533	0,18565	0,15446
	2	102,3275	10,1335	102,3413	0,136182	
	3	118,1363	10,1026	118,1506	0,141548	
2	1	117,5192	9,959	117,5372	0,180741	0,184986
	2	130,1711	9,9673	130,1895	0,184604	
	3	125,3212	9,9676	125,3401	0,189614	
3	1	117,5183	9,9117	117,536	0,178577	0,194377
	3	130,1694	9,8964	130,1902	0,210177	
4	2	115,4571	10,0654	115,4738	0,165915	
	3	117,1598	10,0436	117,1796	0,19714	
5	1	67,1682	10,0566	67,1883	0,199869	0,20306
	2	117,1562	10,0503	117,1778	0,214919	
	3	115,4537	10,0827	115,4733	0,194392	
6	1	129,0375	10,0906	129,0629	0,251719	0,248193
	2	116,5073	10,0726	116,5299	0,224371	
	3	102,3305	10,0935	102,3576	0,26849	
7	1	89,1022	10,0399	89,1209	0,186257	0,17195
	2	116,5049	10,0647	116,5218	0,167914	
	3	128,5646	10,0198	128,5808	0,16168	
8	1	128,5673	10,0418	128,5808	0,134438	0,131558
	3	117,5216	10,025	117,5345	0,128678	
9	1	67,1665	9,8709	67,1877	0,214773	0,214184
	2	116,5025	9,9018	116,522	0,196934	
	3	125,3195	9,92	125,3424	0,230847	
10	1	119,5025	10,0706	119,5176	0,149941	0,145659
	2	115,4525	10,0636	115,4678	0,152033	
	3	129,0331	10,0739	129,0467	0,135002	
11	1	102,3258	9,8925	102,3428	0,171847	0,178796
	2	128,5648	9,9391	128,5831	0,184121	
	3	115,4531	9,9214	115,471	0,180418	
Ala	1	32,5219	5,1279	32,5308	0,694241	0,664227
	2	35,3253	5,0753	35,3334	0,638386	
	3	27,5725	5,0905	27,5809	0,660053	
Soro	1	117,1549	10,2093	117,1916	0,359476	0,315686
	2	89,1004	10,2153	89,1273	0,26333	
	3	118,1349	10,2081	118,168	0,324252	

Continuação da Tabela 1.

SD	%G x 50	%Gm	SD	%G(BS)	SD (BS)	%Gm (BS)
0,027144	9,282484 6,809099 7,077386	7,722989	1,357207	9,911889 7,270794 7,557273	1,449234	8,246652
0,004449	9,037052 9,230183 9,480718	9,249317	0,222451	9,559983 9,764289 10,02932	0,235323	9,784531
0,022345	8,928842 10,50887	9,718857	1,11725	9,183217 10,80826	1,14908	9,995739
		9,076385	1,10399	0	1,166762	9,592459
	8,295746 9,857023			8,767434 10,41748		
0,010629	9,993437 10,74595 9,719619	10,153	0,531445	10,71912 11,52628 10,42542	0,570036	10,89027
0,02227	12,58597 11,21855 13,42448	12,40967	1,113482	13,56978 12,09548 14,47383	1,200519	13,3797
0,012776	9,312842 8,39568 8,083994	8,597505	0,638801	9,830932 8,862747 8,533721	0,674339	9,0758
0,004073	6,721902 6,433915	6,577909	0,203638	7,087624 6,783968	0,214717	6,935796
0,016964	10,73864 9,846695 11,54234	10,70922	0,848205	11,01738 10,10228 11,84194	0,870221	10,9872
0,009288	7,497071 7,601653 6,750117	7,282947	0,464398	8,21867 8,333319 7,399821	0,509097	7,983937
0,006296	8,592368 9,206065 9,020904	8,939779	0,314789	8,970942 9,611678 9,418359	0,328658	9,333659
0,028161	6,942413 6,383859 6,60053	6,642268	0,281606	7,122615 6,549563 6,771858	0,288916	6,814679
0,048642						

Tabela 2. Teor de cinzas em base seca (%Cm(BS)) dos concentrados protéicos de soro em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamento	Replicatas	Peso Cadinho	Amostra	Cad+Cinzas	%C	%Cm
1	1	64,1583	10,035	64,1691	0,107623	0,10267873
	2	60,386	10,0301	60,396	0,0997	
	3	59,3751	10,0285	59,3852	0,100713	
2	1	69,874	9,9361	69,8855	0,11574	0,118031757
	2	73,6458	9,9376	73,656	0,10264	
	3	71,0218	9,9473	71,0353	0,135715	
3	1	60,6161	9,956	60,6265	0,10446	0,102249819
	2	59,3739	9,996	59,3839	0,10004	
4	1	51,9411	9,9888	51,9555	0,144161	0,139346272
	2	47,0909	10,005	47,1053	0,143928	
	3	54,1963	10,0039	54,2093	0,129949	
5	1	52,1848	9,9755	52,1962	0,11428	0,115330722
	2	52,7386	9,9656	52,7501	0,115397	
	3	60,6169	9,9729	60,6285	0,116315	
6	1	74,9927	10,0088	75,0042	0,114899	0,11484035
	2	34,7285	10,0212	34,7407	0,121742	
	3	58,84	10,0111	58,8508	0,10788	
7	1	49,9044	9,9477	49,9172	0,128673	0,110055933
	2	45,1682	9,952	45,1773	0,091439	
8	1	50,2166	9,9772	50,2241	0,075171	0,083464576
	2	47,5895	9,9717	47,598	0,085241	
	3	51,8925	10,0021	51,9015	0,089981	
9	1	76,7665	10,0006	76,7747	0,081995	0,053706171
	3	75,6981	9,9844	75,706	0,079123	
10	1	58,8381	10,0202	58,8543	0,161673	0,158020103
	2	60,3856	10,0123	60,4016	0,159803	
	3	74,9944	10,0273	75,0097	0,152583	
11	1	64,1583	10,0427	64,17	0,116503	0,112162467
	2	57,5665	10,0452	57,5776	0,110501	
	3	60,7042	10,0471	60,7152	0,109484	
Ala	1	73,6382	4,9829	73,6457	0,150515	0,102248661
	2	69,863	4,9926	69,8708	0,156231	
Soro	1	74,7282	5,0519	74,7466	0,364219	0,364893198
	2	75,6799	5,0653	75,7006	0,408663	
	3	88,5783	5,0653	88,5946	0,321797	

Continuação da Tabela 2.

SD	%C x 50	%Cm	SD	%C (BS)	SD (BS)	%Cm (BS)
0,004311994	5,381166 4,984995 5,035648	5,133936	0,2156	5,746039 5,323006 5,377094	0,230219	5,482046
0,016656087	5,786979 5,132024 6,785761	5,901588	0,832804	6,121844 5,42899 7,178421	0,880995	6,243085
0,003125134	5,222981 5,002001	5,112491	0,156257	5,371779 5,144504	0,160708	5,258141
0,008138836	7,208073 7,196402 6,497466	6,967314	0,406942	7,617917 7,605582 6,866906	0,43008	7,363468
0,00101923	5,713999 5,769848 5,815761	5,766536	0,050961	6,128928 6,188832 6,238079	0,054662	6,18528
0,006931013	5,744944 6,087095 5,394013	5,742017	0,346551	6,19401 6,562906 5,815647	0,373639	6,190854
0,026328451	6,433648 4,571945	5,502797	1,316423	6,791563 4,826291	1,389658	5,808927
0,007563021	3,75857 4,262062 4,499055	4,173229	0,378151	3,963064 4,493949 4,743837	0,398725	4,400283
0,002030562	4,099754 3,956172	4,027963	0,101528	4,20617 4,058861	0,104163	4,132515
0,004800221	8,083671 7,990172 7,629172	7,901005	0,240011	8,861731 8,759233 8,363486	0,263112	8,661483
0,003792797	5,825127 5,525027 5,474216	5,608123	0,18964	6,081778 5,768456 5,715407	0,197995	5,855213
0,004042149	3,010295 3,124624	3,06746	0,080843	3,088433 3,205729	0,082941	3,147081
0,043436688						

Tabela 3. Teor de nitrogênio não protéico em base seca (%NNPm(BS)) dos concentrados protéicos de soro em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamento	Replicatas	Amostra	Filtrado	HCl	%NNP	NNPm
1	1	4,9798	5,2208	2	0,011826	0,010613
	2	4,9778	5,221	1,87	0,010522	
	3	4,9869	5,2248	1,75	0,00929	
	4	4,988	5,2144	1,9	0,010815	
2	1	4,932	5,2335	1,82	0,011608	0,011407
	2	4,9322	5,219	1,8	0,011436	
	3	4,933	5,2291	1,78	0,011209	
	4	4,9342	5,2442	1,8	0,011377	
3	1	5,0726	5,2332	1,85	0,011582	0,011512
	2	5,0725	5,2338	1,75	0,010596	
	3	5,0736	5,2404	1,92	0,012253	
	4	5,0673	5,2231	1,85	0,011617	
4	1	5,0032	5,234	2	0,010742	0,01101
	2	4,987	5,2343	2,05	0,011277	
	3	4,993	5,2406	2	0,01075	
	4	4,988	5,2365	2,05	0,01127	
5	1	4,9849	5,1943	1,7	0,008843	0,008832
	2	5,0097	5,1674	1,9	0,010866	
	3	4,9808	5,2097	1,6	0,007815	
	4	5,0045	5,1935	1,6	0,007803	
6	1	4,9858	5,2463	1,95	0,010254	0,009998
	2	4,9895	5,2534	1,9	0,009733	
	3	4,9878	5,2455	2	0,010751	
	4	4,9818	5,2509	1,85	0,009253	
7	1	4,9737	5,2105	1,65	0,00833	0,008399
	2	4,9584	5,2176	1,7	0,00885	
	3	4,9611	5,2347	1,65	0,008313	
	4	4,9763	5,2229	1,63	0,008105	
8	1	4,8747	5,2106	1,75	0,008499	0,009134
	2	4,8756	5,2175	1,9	0,010029	
	3	4,8704	5,2182	1,8	0,009009	
	4	4,8797	5,2136	1,8	0,009	
9	1	5,0008	5,2694	2,1	0,01415	0,012873
	2	5,0219	5,2763	2	0,013085	
	3	5,0105	5,2657	1,8	0,011158	
	4	5,0149	5,2775	2	0,0131	
10	1	4,9002	5,2196	2,2	0,015602	0,015589
	2	4,9098	5,2254	2,2	0,015554	
	3	4,906	5,21	2,2	0,015612	
11	1	5,0022	5,2411	2	0,011728	0,011107
	2	4,9994	5,244	1,95	0,011229	
	3	4,9975	5,2396	1,9	0,010743	
	4	4,9979	5,2451	1,9	0,010731	
Ala	1	5,0075	5,2098	1,75	0,009278	0,00913
	2	5,0177	5,2118	1,7	0,008755	
	3	5,024	5,2121	1,75	0,009243	
Soro	1	5,0094	5,1547	4,15	0,033694	0,034137
	2	4,9978	5,0713	4,15	0,034328	
	3	5,0053	5,0785	4,15	0,034228	

Continuação da Tabela 3.

SD	%NNP _{x50}	Media	SD	%NNP (BS)	SD	NNP _m (BS)
0,001044412	0,591306	0,530653	0,052221	0,631399	0,055761	0,566635
	0,526076			0,561747		
	0,464477			0,495971		
	0,540755			0,577421		
0,00016444	0,580381	0,570369	0,008222	0,613965	0,008698	0,603373
	0,571804			0,604892		
	0,560463			0,592895		
	0,568826			0,601741		
0,000684324	0,579112	0,575594	0,034216	0,595611	0,035191	0,591992
	0,529776			0,544869		
	0,612649			0,630103		
	0,580839			0,597387		
0,000304758	0,537093	0,550498	0,015238	0,567632	0,016104	0,581799
	0,563868			0,595929		
	0,537513			0,568075		
	0,563518			0,595559		
0,001441264	0,442128	0,441581	0,072063	0,474233	0,077296	0,473647
	0,54331			0,582763		
	0,390763			0,419138		
	0,390125			0,418454		
0,000647676	0,512695	0,499893	0,032384	0,552771	0,034915	0,538968
	0,486665			0,524706		
	0,537571			0,579591		
	0,462642			0,498805		
0,00031749	0,416503	0,419967	0,015875	0,439674	0,016758	0,44333
	0,442506			0,467123		
	0,41563			0,438753		
	0,405229			0,427773		
0,000642445	0,424953	0,456713	0,032122	0,448074	0,03387	0,481561
	0,501461			0,528744		
	0,450449			0,474957		
	0,449987			0,47447		
0,001247795	0,707518	0,643663	0,06239	0,725882	0,064009	0,66037
	0,654246			0,671228		
	0,557877			0,572358		
	0,655011			0,672013		
3,09839E-05	0,780085	0,779459	0,001549	0,855169	0,001698	0,854483
	0,777695			0,852549		
	0,780598			0,855731		
0,000474125	0,586378	0,555366	0,023706	0,612213	0,024751	0,579835
	0,561429			0,586165		
	0,537131			0,560797		
	0,536525			0,560164		
0,000250423	0,185559	0,182602	0,005008	0,190376	0,005138	0,187342
	0,175105			0,17965		
	0,184868			0,189667		
	0,184875			0,189674		
0,000298168						

Tabela 4. Teor de umidade (%Um) dos concentrados protéicos de soro em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamento	Replicatas	Peso Placa	Amostra	Placa+Sólidos.	%Umidade
1	1	48,6593	4,938	48,7523	98,11665
	2	60,7816	4,9268	60,874	98,12454
	3	63,3285	4,9087	63,4198	98,14004
2	1	61,4497	4,8705	61,542	98,10492
	2	65,8008	4,8504	65,8919	98,1218
	3	61,3737	4,8621	61,466	98,10164
3	1	75,8295	4,9113	75,9257	98,04125
	2	67,0254	4,9027	67,1199	98,07249
	3	80,7042	4,898	80,7996	98,05227
4	1	72,0283	5,025	72,1243	98,08955
	2	59,6258	5,0199	59,7199	98,12546
5	1	64,0164	4,9937	64,1097	98,13165
	2	61,4596	4,9869	61,5517	98,15316
	3	64,8027	4,9927	64,8965	98,12126
6	1	61,8782	5,0078	61,9722	98,12293
	2	61,4532	4,9902	61,5455	98,15037
	3	62,9196	5,0041	63,0116	98,16151
7	2	60,0243	4,9264	60,1177	98,10409
	3	62,4993	4,9334	62,5927	98,10678
8	1	59,7748	1,328	59,8001	98,09488
	2	62,6735	4,9774	62,7667	98,12754
	3	63,0101	4,982	63,1054	98,08711
9	1	63,2988	4,9776	63,3957	98,05328
	2	62,3523	4,9746	62,4494	98,04808
10	1	67,3513	4,9774	67,4416	98,1858
	2	46,3989	4,9745	46,4897	98,17469
	3	77,7215	4,9801	77,8128	98,1667
11	2	70,4725	4,9623	70,567	98,09564
	3	65,4233	4,9774	65,5192	98,07329
Ala	1	52,9149	4,9996	53,1584	95,12961
	2	59,6943	5,0197	59,9388	95,12919
Soro	1	75,6222	4,9519	75,9242	93,90133
	2	64,809	4,9324	65,124	93,61366
	3	81,1243	4,9337	81,4374	93,65385

Continuação da Tabela 4.

%U Média	SD	%U x 50	%Um	SD
98,12708	0,011899	5,832321 6,227166 7,001854	6,35378	0,594958
98,10946	0,010819	5,245868 6,090219 5,082166	5,472751	0,540971
98,05534	0,015844	2,06259 3,624533 2,613312	2,766812	0,792205
98,10751	0,025391	4,477612 6,273033	5,375323	1,269555
98,13535	0,016272	6,582294 7,658064 6,062852	6,767737	0,813614
98,14494	0,019856	6,146412 7,518737 8,075378	7,246842	0,992811
65,40362	0,001902	5,204612 5,339117	5,271864	0,09511
98,10318	0,021451	4,743976 6,376823 4,35568	5,158827	1,072535
65,36712	0,003673	2,663934 2,404213	2,534074	0,18365
98,17573	0,009591	9,289991 8,734546 8,335174	8,78657	0,47953
65,38964	0,015804	4,782057 3,664564	4,22331	0,790187
63,4196	0,000297	2,592207 2,58382	2,588014	0,005931
93,72295	0,155788			

Tabela 5. Teor de lactose em base seca (%Lm (BS)) dos concentrados protéicos de soro em função dos pré-tratamentos utilizados.

Trat.	%G	%G (bs)	%C	%C (bs)	%NNP	%NNP (bs)
1	7,72	8,24346	5,13	5,477843	0,5307	0,566684
2	9,25	9,785253	5,9	6,241405	0,5704	0,603406
3	9,72	9,996915	5,11	5,25558	0,5756	0,591998
4	9,08	9,59628	6,97	7,366307	0,5505	0,581801
5	10,19	10,92996	5,77	6,188995	0,4416	0,473667
6	12,41	13,38005	5,74	6,188679	0,4999	0,538976
7	8,6	9,078433	5,5	5,805975	0,42	0,443365
8	6,58	6,938001	4,17	4,396879	0,4567	0,481548
9	10,71	10,988	4,03	4,134606	0,6437	0,660408
10	7,28	7,980706	7,9	8,660381	0,7795	0,854528
11	8,94	9,33389	5,61	5,857173	0,5554	0,579871
Ala	6,64	6,816549	3,07	3,151627	0,1826	0,187455

Continuação da Tabela 5

NT	Proteína	Proteína (bs)	%U	(100-%U)	%L	%Lm (BS)
29,85	29,3193	31,30731	6,35	93,65	50,95	54,4047
28,62	28,0496	29,6727	5,47	94,53	50,76	53,69724
27,15	26,5744	27,33148	2,77	97,23	55,25	56,82403
31,05	30,4995	32,23367	5,38	94,62	47,52	50,22194
30,15	29,7084	31,86571	6,77	93,23	47,12	50,54167
31,2	30,7001	33,09984	7,25	92,75	43,4	46,79245
29,87	29,45	31,08836	5,27	94,73	50,76	53,58387
31,81	31,3533	33,05915	5,16	94,84	52,28	55,12442
25,58	24,9363	25,58356	2,53	97,47	57,15	58,63343
31,24	30,4605	33,39235	8,78	91,22	44,8	49,11204
32,26	31,7046	33,10148	4,22	95,78	48,97	51,12758
72,16	71,9774	73,89118	2,59	97,41	15,54	15,95319

Tabela 6. Teor de proteína em base seca dos concentrados protéicos de soro em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamentos	NT-CPS	NNP-CPS	Proteína-CPS	Proteína (bs)
1	29,8527	0,5307	29,322	31,30731
2	28,6175	0,5704	28,0471	29,6727
3	27,1456	0,5756	26,57	27,33148
4	31,049	0,5505	30,4985	32,23367
5	30,1549	0,4416	29,7133	31,86571
6	31,2036	0,4998	30,7038	33,09984
7	29,8725	0,42	29,4525	31,08836
8	31,8121	0,4567	31,3554	33,05915
9	25,5781	0,6437	24,9344	25,58356
10	31,2395	0,7795	30,46	33,39235
11	32,2611	0,5554	31,7057	33,10148
Ala	72,1642	0,1826	71,9816	73,89118

APENDICE II - TABELAS PARA CÁLCULO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES, DO FLUXO DE PERMEADO E DO COEFICIENTE DE RETENÇÃO

Tabela 1. Cálculo do coeficiente de retenção protéica (CR) em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamento	Replicatas	Retentado	Ret Media	SD	Permeado	Perm Medio	SD
1	1	3,7201	3,714567	0,008156	0,1566	0,1565	0,00755
	2	3,7184			0,164		
	3	3,7052			0,1489		
2	1	2,0426	2,053967	0,011064	0,131	0,117433	0,023758
	2	2,0546			0,1313		
	3	2,0647			0,09		
3	1	3,2964	3,308967	0,011134	0,156	0,168	0,017355
	2	3,3129			0,1601		
	3	3,3176			0,1879		
4	1	1,6372	1,645667	0,014665	0,1622	0,161633	0,002205
	2	1,6372			0,1592		
	3	1,6626			0,1635		
5	1	3,2092	3,205433	0,015791	0,1910	0,1854	0,012728
	2	3,219			0,1798		
	3	3,1881					
6	1	3,9834	3,994	0,014991	0,1453	0,160867	0,020131
	2	4,0046			0,1836		
7	1	3,5806	3,616867	0,034428	0,1666	0,14635	0,028638
	2	3,6491			0,1261		
	3	3,6209					
8	1	4,06	4,155033	0,180327	0,1901	0,202667	0,010889
	2	4,363			0,2086		
	3	4,0421			0,2093		
9	1	2,9696	2,9821	0,017678	0,1512	0,171367	0,020456
	2	2,9946			0,1921		
	3				0,1708		
10	1	0,9742	1,0055	0,035517	0,1255	0,1499	0,02249
	2	0,9982			0,1544		
	3	1,0441			0,1698		
11	1	3,8903	3,892267	0,018528	0,1861	0,197	0,015415
	2	3,8748			0,2079		
	3	3,9117					

Tratamentos	%Prot-Perm.	%Prot-Ret	CR (%)
1	0,1565	3,7149	95,78724
2	0,1174	2,054	94,28432
3	0,168	3,309	94,92294
4	0,1616	1,6574	90,24979
5	0,1854	3,2054	94,21601
6	0,1609	3,994	95,97146
7	0,1464	3,6169	95,95233
8	0,2027	4,0461	94,99024
9	0,1714	2,9821	94,25237
10	0,1499	1,0055	85,09199
11	0,197	3,8922	94,9386

Tabela 2. Cálculo do fluxo de permeado global (F) em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamento s	Peso de Permeado (Kg)	Fc	Tempo (horas)	F (Kg/hm ²)
1	1,50692	8	8,35	24,19162
2	1,248	3,65	14	11,94944
3	1,505	8	10,85	18,59379
4	1,05964	2,60	14	10,14592
5	1,505	8	9,76	20,67035
6	1,50569	8	9,6	21,02449
7	1,50517	8	9,35	21,57919
8	1,50763	8	11,26	17,94806
9	1,49763	8	11,26	17,82901
10	0,69298	1,67	14	6,635197
11	1,505	8	9,53	21,16922

Tabela 3. Cálculo do índice de estabilidade da emulsão (SR) em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamentos	%Gord1	%Gord2	SR1	SR2	SR Médio	SD
1	0,7144	0,7988	0,03572	0,03994	3,5385	0,0715
	0,7296	0,588	0,03648	0,0294		
%Média			0,0361	0,03467		
2	1,9275	1,71037	0,096375	0,085519	9,592838	0,5922
	2,1465	1,8899	0,107325	0,094495		
%Média			0,10185	0,090007		
3	0,6954	0,6687	0,03477	0,033435	3,337125	0,1819
	0,7122	0,5934	0,03561	0,02967		
%Média			0,03519	0,031553		
4	1,5146	1,4747	0,07573	0,073735	7,40575	0,0143
	1,442	1,4933	0,0721	0,074665		
%Média			0,073915	0,0742		
5	1,33196	1,43912	0,066598	0,071956	6,431908	0,494
	1,2348	1,52281	0,06174	0,076141		
%Média			0,064169	0,074048		
6	1,3046	1,4048	0,06523	0,07024	6,79875	1E-03
	1,4145	1,3151	0,070725	0,065755		
%Média			0,067978	0,067998		
7	1,3341		0,066705		6,3005	0,37
	1,1861		0,059305			
%Média			0,063005			
8	0,6282	0,5605	0,03141	0,028025	3,24125	0,1715
	0,7369	0,6674	0,036845	0,03337		
%Média			0,034128	0,030698		
9	0,9427	0,8685	0,047135	0,043425	4,522	0,2525
	0,9671	0,8393	0,048355	0,041965		
%Média			0,047745	0,042695		
10	0,9126		0,04563		5,614	1,051
	1,333		0,06665			
%Média			0,05614			
11	0,5751	0,7921	0,028755	0,039605	3,348375	0,0611
	0,7398	0,5717	0,03699	0,028585		
%Média			0,032873	0,034095		
Ala	1,2598	1,063	0,06299	0,05315	5,825625	0,3279
	1,2016	1,1361	0,06008	0,056805		
%Média			0,061535	0,054978		

Tabela 4. Cálculo da solubilidade protéica à pH 4,6 (%PS) em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamentos	Peso CPS (g)	NT-CPS	NNP-CPS	Proteína-CPS	NT-Sobre1	NT-Sobre2	NNP-Sobre
1	1,675	29,8527	0,5307	29,322	0,8474	0,8728	0,0189
2	1,747	28,6175	0,5704	28,0471	0,7916	0,7383	0,0174
3	1,8416	27,1456	0,5756	26,57	0,7326	0,6494	0,019
4	1,6103	31,049	0,5505	30,4985	0,6272	0,6653	0,0196
5	1,6583	30,1549	0,4416	29,7133	0,7845	0,7988	0,0168
6	1,6025	31,2036	0,4998	30,7038	0,8037	0,8479	0,0168
7	1,6739	29,8725	0,42	29,4525	0,8457	0,8658	0,017
8	1,5717	31,8121	0,4567	31,3554	0,7705	0,7608	0,0168
9	1,9547	25,5781	0,6437	24,9344	0,6873	0,6887	0,0233
10	1,6005	31,2395	0,7795	30,46	0,6614	0,6722	0,0228
11	1,5498	32,2611	0,5554	31,7057	0,8769	0,8968	0,0164
Ala	0,6928	72,1642	0,1826	71,9816	0,8628	0,9225	0,0027

Prot-Sobre1	Prot-Sobre2	C1(Prot-Sobre1/100)	C2(Prot-Sobre2/100)	%PS1	%PS2	%PS Média	SD
0,8285	0,8539	0,008285	0,008539	84,34398501	86,92979	85,63689	1,292901
0,7742	0,7209	0,007742	0,007209	79,00276719	73,5638	76,28328	2,719483
0,7136	0,6304	0,007136	0,006304	72,91854345	64,41683	68,66769	4,250857
0,6076	0,6457	0,006076	0,006457	61,85894324	65,73785	63,7984	1,939455
0,7677	0,782	0,007677	0,00782	77,90181144	79,35289	78,62735	0,725541
0,7869	0,8311	0,007869	0,008311	79,96489715	84,45651	82,2107	2,245805
0,8287	0,8488	0,008287	0,008488	84,04573299	86,08425	85,06499	1,019259
0,7537	0,744	0,007537	0,00744	76,46919547	75,48505	75,97712	0,492073
0,664	0,6654	0,00664	0,006654	68,1175546	68,26118	68,18937	0,071811
0,6386	0,6494	0,006386	0,006494	65,49578339	66,60345	66,04962	0,553832
0,8605	0,8804	0,008605	0,008804	87,56042814	89,58536	88,57289	1,012465
0,8601	0,9198	0,008601	0,009198	86,23619326	92,22189	89,22904	2,99285

Tabela 5. Cálculo do índice de atividade da emulsão (EAI) em função dos pré-tratamentos utilizados.

Tratamento	Absorb1	Absorb2	EAI1	EAI2	EAI Médio	SD
1	0,0456	0,0467	26,2542	26,88753	26,57086	0,316662
2	0,0711	0,075	47,886	50,51266	49,19933	1,313329
3	0,0514	0,0493	29,59355	28,38448	28,98901	0,604538
4	0,072	0,0696	41,454	40,0722	40,7631	0,6909
5	0,0544	0,0547	31,3208	31,49353	31,40716	0,086362
6	0,0637	0,0597	36,67528	34,37228	35,52378	1,1515
7	0,0533	0,0527	30,68748	30,34203	30,51475	0,172725
8	0,0426	0,0434	24,52695	24,98755	24,75725	0,2303
9	0,049	0,0497	28,21175	28,61478	28,41326	0,201512
10	0,0751	0,0701	43,23883	40,36008	41,79945	1,439375
11	0,0462	0,0474	26,59965	27,29055	26,9451	0,34545
Ala	0,0463	0,044	26,65723	25,333	25,99511	0,662113

APENDICE III- TABELAS PARA CÁLCULO DOS FLUXOS DE PERMEADO

Tabela 1. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 6 e 70°C/2 minutos (T1).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
1	0,016667	7,17	57,66756	55	0,916667	243,8	35,65196	1,165154
2	0,033333	12,58	50,58981	60	1	263,03	35,25871	1,180532
				80	1,333333	339,02	34,08378	1,245492
4	0,066667	21,89	44,01475	100	1,666667	409,95	32,97185	1,312927
5	0,083333	26,53	42,6756	120	2	478,44	32,06702	1,385354
6	0,1	31,19	41,80965	140	2,333333	544,79	31,29778	1,463568
7	0,116667	35,89	41,23707	160	2,666667	611,81	30,75452	1,55208
8	0,133333	40,59	40,80764	180	3	672,16	30,03396	1,641472
9	0,15	45,28	40,4647	200	3,333333	733,65	29,50335	1,743803
10	0,166667	50,2	40,37534	220	3,666667	793,61	29,01328	1,856669
11	0,183333	54,75	40,03168	240	4	852,24	28,56032	1,982115
12	0,2	59,4	39,81233	260	4,333333	910,21	28,15663	2,124007
13	0,216667	63,84	39,4968	280	4,666667	966,76	27,76982	2,283469
14	0,233333	68,43	39,31252	300	5	1022,14	27,40322	2,464678
				320	5,333333	1076,75	27,06309	2,673921
16	0,266667	78,25	39,33479	340	5,666667	1130,46	26,74168	2,917529
17	0,283333	82,25	38,91342	360	6	1184,14	26,45532	3,209794
18	0,3	86,67	38,72654	380	6,333333	1231,72	26,06999	3,522569
		91,25		400	6,666667	1280,98	25,75697	3,917817
20	0,333333	95,67	38,47319	420	7	1335,23	25,56932	4,470203
25	0,416667	118,02	37,9689	440	7,333333	1376,43	25,16019	5,006258
30	0,5	139,72	37,45845	460	7,666667	1426,6	24,94347	5,862304
35	0,583333	162	37,22712	485	8,083333	1474,72	24,45571	7,012394
40	0,666667	182,24	36,64343	500	8,333333	1505,72	24,2207	8,026881
50	0,833333	222,94	35,86166	501	8,35	1506,92	24,19162	8,072086

Tabela 2. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 7 e 70°C/2 minutos (T2).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²) T2	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²) T2	Fc
0	0		228,42	160	2,666667	471,97	23,72503	1,378172
1	0,016667	6,3	50,67024	180	3	521,43	23,29893	1,435043
2	0,033333	10,85	43,63271	200	3,333333	568,8	22,87399	1,494093
3	0,05	15,12	40,53619	220	3,666667	614,97	22,48245	1,556519
4	0,066667	19,52	39,24933	240	4	660,77	22,14377	1,623821
5	0,083333	23,68	38,09115	260	4,333333	704,54	21,79439	1,693814
6	0,1	27,82	37,29223	280	4,666667	746,83	21,45241	1,76742
7	0,116667	31,78	36,51475	300	5	786,96	21,09812	1,843437
8	0,133333	36	36,19303	322	5,366667	824,96	20,6058	1,921702
9	0,15	39,66	35,44236	340	5,666667	861,18	20,37171	2,002748
10	0,166667	43,38	34,89008	360	6	896,13	20,02078	2,087708
11	0,183333	47,32	34,59907	380	6,333333	928,21	19,64604	2,172293
				400	6,666667	958,39	19,27058	2,258374
13	0,216667	54,94	33,99051	420	7	986,33	18,88797	2,344378
14	0,233333	58,91	33,84336	460	7,666667	1036,08	18,1154	2,514914
15	0,25	61,96	33,22252	480	8	1057,22	17,71481	2,59513
16	0,266667	65,67	33,01106	500	8,333333	1080,18	17,37555	2,688256
17	0,283333	68,84	32,569	520	8,666667	1093,94	16,92009	2,747341
18	0,3	72,08	32,20733	540	9	1110,09	16,53396	2,820088
19	0,316667	75,94	32,14618	560	9,333333	1124,64	16,15243	2,889008
20	0,333333	78,9	31,72922	580	9,666667	1138,33	15,78529	2,957003
25	0,416667	95,48	30,71743	600	10	1150,98	15,42869	3,022741
30	0,5	111,77	29,96515	620	10,33333	1162,65	15,08237	3,086032
35	0,583333	127,5	29,29912	640	10,66667	1172,84	14,73911	3,143505
40	0,666667	142,85	28,72319	660	11	1182,5	14,41019	3,2
45	0,75	158,69	28,36282	680	11,33333	1194,71	14,13078	3,274382
50	0,833333	173,83	27,96193	700	11,66667	1200,8	13,79701	3,312789
55	0,916667	191,54	28,00975	720	12	1208,47	13,49944	3,362462
60	1	203,25	27,24531	740	12,33333	1217,36	13,23122	3,421932
80	1,333333	263,83	26,52446	760	12,66667	1222,32	12,93552	3,456036
100	1,666667	316,1	25,42359	780	13	1229,85	12,68148	3,50913
120	2	369,37	24,7567	800	13,33333	1236,02	12,42647	3,553866
140	2,333333	421,3	24,20337	840	14	1248,5	11,95423	3,647932

Tabela 3. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 6 e 80°C/2 minutos (T3).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
1	0,016667	9,25	74,39678	100	1,666667	367,76	29,57855	1,271964
2	0,033333	15,8	63,53887	120	2	424,12	28,42627	1,327283
3	0,05	22,14	59,35657	140	2,333333	479,84	27,56645	1,386918
4	0,066667	27,14	54,57105	160	2,666667	525,13	26,39729	1,439487
5	0,083333	32,8	52,76139	180	3	576,38	25,75424	1,503996
6	0,1	38,14	51,12601	200	3,333333	624,72	25,12279	1,570375
7	0,116667	43,8	50,32555	220	3,666667	670,89	24,52681	1,639485
8	0,133333	48,68	48,94102	240	4	716,48	24,01072	1,713967
9	0,15	53,55	47,85523	260	4,333333	762,21	23,57837	1,795801
10	0,166667	58,73	47,23592	280	4,666667	806,54	23,16756	1,882951
11	0,183333	63,51	46,43675	300	5	850,21	22,79383	1,977489
12	0,2	68,54	45,93834	320	5,333333	892,79	22,43943	2,079279
13	0,216667	73,02	45,17633	340	5,666667	934,78	22,11276	2,190469
14	0,233333	78,37	45,02298	360	6	976,52	21,8168	2,313445
15	0,25	82,46	44,21448	380	6,333333	1020,52	21,59983	2,45897
16	0,266667	87,21	43,83881	400	6,666667	1057,4	21,26139	2,595835
17	0,283333	91,92	43,48841	420	7	1096,72	21,00191	2,759594
18	0,3	96,28	43,02055	440	7,333333	1135,28	20,75213	2,941579
19	0,316667	100,48	42,53422	460	7,666667	1173,38	20,51603	3,14661
20	0,333333	104,5	42,02413	480	8	1211,45	20,2991	3,382165
25	0,416667	125,07	40,237	500	8,333333	1248,43	20,08198	3,647391
30	0,5	144,91	38,84987	520	8,666667	1285,23	19,87879	3,956115
35	0,583333	163,5	37,57181	540	9	1320,98	19,67501	4,310561
40	0,666667	181,85	36,56501	560	9,333333	1356,76	19,48621	4,735161
45	0,75	202,25	36,14835	580	9,666667	1395,76	19,35509	5,304713
50	0,833333	215,75	34,70509	600	10	1425,06	19,10268	5,831695
55	0,916667	231,96	33,92055	620	10,333333	1457,31	18,90483	6,547642
60	1	248,38	33,29491	640	10,666667	1488,35	18,70413	7,424995
80	1,333333	312,07	31,37433	651	10,85	1505,45	18,59935	8,016779

Tabela 4. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 7 e 80°C/2 minutos (T4).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
				180	3	453,88	20,28061	1,358481
1	0,016667	7,36	59,19571	200	3,333333	494	19,86595	1,402936
2	0,033333	12,22	49,14209	220	3,666667	533,33	19,49781	1,449434
3	0,05	16,44	44,07507	240	4	572,3	19,17895	1,498649
4	0,066667	20,56	41,34048	260	4,333333	609,59	18,85719	1,548977
5	0,083333	24,32	39,12064	280	4,666667	646,67	18,57535	1,602489
6	0,1	27,7	37,13137	300	5	681,44	18,26917	1,656139
7	0,116667	31	35,61854	322	5,366667	715,46	17,87071	1,712226
8	0,133333	34,88	35,06702	340	5,666667	745,66	17,63902	1,765298
				360	6	775,05	17,31568	1,820202
10	0,166667	41,92	33,71582	380	6,333333	801,59	16,96606	1,872802
11	0,183333	45,4	33,19522	400	6,666667	827,13	16,6313	1,926372
				420	7	849,18	16,26159	1,97515
13	0,216667	52,16	32,27057	440	7,333333	870,3	15,90848	2,024244
14	0,233333	55,2	31,71199	460	7,666667	889	15,54377	2,069795
15	0,25	58,25	31,23324	480	8	907	15,19772	2,115621
16	0,266667	61,23	30,77916	500	8,333333	922,6	14,84075	2,15701
17	0,283333	64,36	30,44946	520	8,666667	936,06	14,47814	2,194045
18	0,3	67,24	30,04468	540	9	949,53	14,14254	2,232404
19	0,316667	70,43	29,81374	560	9,333333	961,5	13,80936	2,267633
20	0,333333	73,44	29,53351	580	9,666667	971,52	13,47213	2,297991
25	0,416667	88,06	28,33029	600	10	981,9	13,1622	2,330308
30	0,5	101,67	27,25737	620	10,33333	991,6	12,86344	2,36134
35	0,583333	115,52	26,54615	640	10,66667	1000,6	12,57456	2,390881
40	0,666667	129,18	25,97453	660	11	1008	12,28369	2,41573
45	0,75	142,22	25,41912	680	11,33333	1015,2	12,00757	2,440409
50	0,833333	155,25	24,97319	700	11,66667	1022	11,74263	2,464183
55	0,916667	169,02	24,71655	720	12	1028,33	11,48715	2,486735
60	1	182,3	24,437	740	12,33333	1034	11,23832	2,507289
				760	12,66667	1039	10,99548	2,525698
100	1,666667	283,8	22,82574	780	13	1045,6	10,7816	2,550415
120	2	327,67	21,9618	800	13,33333	1050,3	10,55932	2,568314
140	2,333333	370,4	21,2792	820	13,66667	1054,96	10,34748	2,586311
160	2,666667	412,97	20,75922	840	14	1059,64	10,14592	2,60464

Tabela 5. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 6,5 e 75°C/2 minutos (T5).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
1	0,016667	8,67	69,7319	80	1,333333	297,3	29,88941	1,208969
2	0,033333	14,99	60,2815	100	1,666667	359,85	28,94236	1,264566
3	0,05	20,29	54,39678	120	2	418,08	28,02145	1,321126
4	0,066667	25,83	51,937	140	2,333333	475,46	27,31482	1,382037
5	0,083333	30,72	49,41555	160	2,666667	531,45	26,71498	1,447141
6	0,1	35,66	47,80161	180	3	586,3	26,1975	1,517156
7	0,116667	40,31	46,31559	200	3,333333	641,15	25,78351	1,59429
8	0,133333	44,88	45,12064	220	3,666667	700,58	25,61223	1,687234
9	0,15	49,56	44,28954	240	4	744,66	24,95509	1,763488
10	0,166667	53,76	43,23861	260	4,333333	794,81	24,58682	1,859078
11	0,183333	58,23	42,57616	280	4,666667	845,76	24,29414	1,967423
12	0,2	63,15	42,32574	300	5	894,41	23,97882	2,083359
13	0,216667	66,7	41,26624	340	5,666667	991,75	23,46042	2,361826
14	0,233333	70,52	40,51321	360	6	1042,33	23,28709	2,538109
16	0,266667	78,7	39,56099	380	6,333333	1083,6	22,93495	2,702703
17	0,283333	82,36	38,96546	400	6,666667	1129,04	22,70188	2,910518
18	0,3	86,45	38,62824	420	7	1174,3	22,48755	3,151915
20	0,333333	94,55	38,02279	440	7,333333	1217,61	22,25707	3,423635
25	0,416667	113,76	36,59839	460	7,666667	1261,05	22,0489	3,747685
30	0,5	132,14	35,42627	480	8	1303,67	21,84434	4,131338
35	0,583333	150,76	34,6442	500	8,333333	1345,29	21,64005	4,590216
40	0,666667	168	33,78016	520	8,666667	1385,85	21,43509	5,147389
45	0,75	185,06	33,07596	540	9	1429,26	21,28776	5,915939
50	0,833333	195,26	31,40912	560	9,333333	1460,89	20,98176	6,638107
55	0,916667	218,64	31,9727	580	9,666667	1496,23	20,74831	7,686464
60	1	234,45	31,42761	586	9,766667	1505,25	20,65967	8,009313

Tabela 6. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 6,5 e 75°C/2 minutos (T6).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
1	0,016667	7,85	63,13673	60	1	228,92	30,68633	1,153526
2	0,033333	13,35	53,68633	80	1,333333	292,8	29,437	1,205157
3	0,05	18,6	49,86595	100	1,666667	354,6	28,52011	1,259704
4	0,066667	23,91	48,07641	120	2	413,97	27,74598	1,316968
5	0,083333	29,11	46,82574	140	2,333333	472,3	27,13328	1,378537
6	0,1	34,01	45,58981	160	2,666667	528,77	26,58026	1,443886
7	0,116667	38,92	44,7185	180	3	584,7	26,12601	1,515018
8	0,133333	43,05	43,28083	200	3,333333	640,16	25,7437	1,592829
9	0,15	47,06	42,05541	220	3,666667	693,69	25,36035	1,675907
10	0,166667	51,29	41,25201	240	4	746,55	25,01843	1,766912
11	0,183333	55,07	40,26566	260	4,333333	799,48	24,73128	1,868509
12	0,2	59,2	39,67828	280	4,666667	853	24,50211	1,983852
13	0,216667	62,94	38,93999	300	5	902,2	24,18767	2,103204
14	0,233333	66,88	38,42206	322	5,366667	956,2	23,8839	2,251898
15	0,25	70,51	37,80697	340	5,666667	1000,4	23,66504	2,390217
16	0,266667	74,44	37,41957	360	6	1048,85	23,43275	2,562765
17	0,283333	78,26	37,02571	380	6,333333	1098,03	23,24037	2,765407
18	0,3	82,22	36,73816	400	6,666667	1144,76	23,01796	2,990056
19	0,316667	86,2	36,48935	420	7	1192,81	22,84201	3,262581
20	0,333333	89,63	36,04424	443	7,383333	1242,61	22,56023	3,602924
25	0,416667	108,25	34,82574	460	7,666667	1279,84	22,37743	3,90767
30	0,5	126,18	33,82842	480	8	1322,75	22,16404	4,329767
35	0,583333	143,87	33,0609	500	8,333333	1363,28	21,92944	4,821709
40	0,666667	161,4	32,45308	520	8,666667	1403,21	21,7036	5,429464
45	0,75	178,6	31,92136	540	9	1441,32	21,46738	6,171953
50	0,833333	195,06	31,37694	560	9,333333	1478,81	21,23913	7,131307
55	0,916667	212,95	31,14063	576	9,6	1505,69	21,02449	8,025757

Tabela 7. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 6,5 e 75°C/2 minutos (T7).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
1	0,016667	9,46	76,08579	60	1	266,22	35,68633	1,183123
2	0,033333	16,3	65,5496	80	1,333333	337,74	33,95509	1,244339
3	0,05	22,65	60,72386	100	1,666667	415,08	33,38445	1,318088
4	0,066667	28,54	57,38606	120	2	469,85	31,49129	1,375835
5	0,083333	33,37	53,67828	140	2,333333	532,4	30,58598	1,448299
6	0,1	39,39	52,80161	160	2,666667	593,16	29,81702	1,526392
7	0,116667	44,45	51,07239	180	3	650,5	29,06613	1,608228
8	0,133333	49,62	49,88606	200	3,333333	706,23	28,40067	1,696637
9	0,15	54,58	48,77569	220	3,666667	758,97	27,74689	1,789746
10	0,166667	59,74	48,04826	240	4	811,14	27,18298	1,892481
11	0,183333	64,79	47,37265	260	4,333333	864,06	26,72902	2,009487
12	0,2	69,85	46,81635	280	4,666667	921,13	26,45912	2,153041
				300	5	962,4	25,80161	2,270327
14	0,233333	79,39	45,60896	320	5,333333	1011,48	25,42259	2,427596
		84,2		340	5,666667	1056,86	25,00063	2,593721
16	0,266667	88,87	44,67326	360	6	1110,85	24,81792	2,823607
17	0,283333	93,64	44,30216	380	6,333333	1149,13	24,32193	3,012945
18	0,3	98,04	43,80697	400	6,666667	1194,17	24,01146	3,271019
19	0,316667	102,77	43,5036	420	7	1236,19	23,67273	3,555115
20	0,333333	106,89	42,98525	440	7,333333	1276,65	23,33628	3,879553
25	0,416667	133,2	42,85255	460	7,666667	1320,91	23,09552	4,309805
30	0,5	150,39	40,31903	480	8	1361,08	22,8063	4,792154
35	0,583333	170	39,06549	500	8,333333	1397,64	22,48214	5,33565
40	0,666667	191,41	38,48727	520	8,666667	1435,12	22,19715	6,03763
45	0,75	209,92	37,51921	540	9	1471,35	21,91466	6,917354
50	0,833333	228,54	36,76247	560	9,333333	1503,65	21,59589	7,950081
55	0,916667	247,79	36,23544	561	9,35	1505,17	21,57919	8,006331

Tabela 8. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 5,79 e 75°C/2 minutos (T8).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
1	0,016667	6,6	53,08311	120	2	412,7	27,66086	1,317877
2	0,033333	11,48	46,16622	140	2,333333	467,6	26,86327	1,376066
3	0,05	16,21	43,45845	160	2,666667	521	26,18968	1,437815
4	0,066667	21,14	42,5067	180	3	575	25,69258	1,506162
5	0,083333	25,29	40,68097	200	3,333333	623,8	25,08579	1,573767
6	0,1	29,62	39,70509	220	3,666667	668,54	24,4409	1,64131
7	0,116667	33,87	38,91612	240	4	713,67	23,91655	1,715581
8	0,133333	37,9	38,10322	260	4,333333	758,13	23,45216	1,795628
9	0,15	42,47	37,95353	280	4,666667	802,2	23,0429	1,882702
10	0,166667	46,51	37,40751	300	5	845,6	22,67024	1,97712
11	0,183333	50,47	36,90227	320	5,333333	889,61	22,3595	2,083054
12	0,2	55,38	37,11796	360	6	970,27	21,67717	2,309883
13	0,216667	59,03	36,52093	380	6,333333	1010	21,37717	2,440799
14	0,233333	62,83	36,09537	400	6,666667	1049	21,09249	2,584592
15	0,25	67,28	36,07507	420	7	1087,06	20,81693	2,742251
16	0,266667	71,72	36,05228	440	7,333333	1125	20,56422	2,919795
17	0,283333	75,33	35,63949	460	7,666667	1162,4	20,32405	3,118848
19	0,316667	83,53	35,35911	480	8	1199,99	20,10707	3,348271
20	0,333333	87,48	35,17962	500	8,333333	1235,4	19,87239	3,597561
25	0,416667	107,02	34,43003	520	8,666667	1269	19,62776	3,871041
30	0,5	126,06	33,79625	540	9	1303,4	19,41317	4,197743
35	0,583333	145,3	33,38951	560	9,333333	1337,1	19,20385	4,57609
40	0,666667	166,13	33,40416	580	9,666667	1367,4	18,96182	4,979627
45	0,75	182	32,52904	600	10	1398,58	18,74772	5,476602
50	0,833333	200,44	32,24236	620	10,33333	1427,68	18,52045	6,039108
55	0,916667	215,31	31,48574	640	10,66667	1457,5	18,31644	6,749507
60	1	232,12	31,11528	660	11	1485	18,09651	7,570796
80	1,333333	295,93	29,75168	676	11,26667	1507,63	17,93744	8,413237

Tabela 9. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 6,5 e 82°C/2 minutos (T9).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
1	0,016667	9,98	80,2681	100	1,666667	328,4	26,41287	1,237524
2	0,033333	16,11	64,78552	120	2	378,86	25,39276	1,2844
3	0,05	21,7	58,17694	140	2,333333	428,6	24,62275	1,334217
4	0,066667	26,28	52,84182	160	2,666667	477,28	23,99196	1,386862
5	0,083333	30,84	49,60858	180	3	535,71	23,937	1,455811
6	0,1	35,28	47,29223	200	3,333333	577,74	23,23351	1,509804
7	0,116667	39,49	45,37342	220	3,666667	615,12	22,48794	1,561302
8	0,133333	43,8	44,03485	240	4	657,59	22,0372	1,624249
9	0,15	47,67	42,60054	260	4,333333	699,24	21,63044	1,691113
10	0,166667	51,9	41,74263	280	4,666667	740,37	21,26685	1,762773
11	0,183333	55,56	40,62393	300	5	780,78	20,93244	1,83935
12	0,2	59,05	39,57775	320	5,333333	820,04	20,61092	1,9204
13	0,216667	62,92	38,92761	340	5,666667	872,34	20,6357	2,040159
14	0,233333	66,86	38,41057	360	6	912,4	20,38427	2,142499
15	0,25	70,81	37,96783	380	6,333333	950,57	20,1193	2,250043
16	0,266667	74,81	37,60556	400	6,666667	989,57	19,89752	2,371678
17	0,283333	79,19	37,4657	420	7	1031,49	19,75278	2,517991
18	0,3	82,06	36,66667	440	7,333333	1059,91	19,37442	2,627901
19	0,316667	86,03	36,41738	460	7,666667	1094,8	19,14209	2,776696
20	0,333333	89,6	36,03217	480	8	1128,2	18,90416	2,935827
25	0,416667	106,86	34,37855	500	8,333333	1190,22	19,14563	3,285456
30	0,5	124,04	33,25469	520	8,666667	1226,4	18,96886	3,530747
35	0,583333	142	32,63118	540	9	1262,85	18,8092	3,817918
40	0,666667	156,9	31,54826	560	9,333333	1298,39	18,64788	4,146773
45	0,75	172,13	30,76497	580	9,666667	1334,53	18,50601	4,544851
50	0,833333	187,7	30,19303	620	10,33333	1403,15	18,20224	5,557902
55	0,916667	202,45	29,60517	640	10,66667	1438,49	18,07754	6,278669
60	1	217,15	29,10858	660	11	1469,95	17,91311	7,098112
80	1,333333	274,4	27,58713	676	11,26667	1497,63	17,81846	8,018934

Tabela 10. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 7,21 e 75°C/2 minutos (T10).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc
				180	3	454,5	20,30831	1,359147
1	0,016667	8,4	67,56032	200	3,333333	479,71	19,29129	1,386772
2	0,033333	13,94	56,05898	220	3,666667	500,79	18,30819	1,41075
3	0,05	18,58	49,81233					
4	0,066667	23,13	46,50804	260	4,333333	534,29	16,52784	1,450608
5	0,083333	27,76	44,65416	280	4,666667	547,01	15,71266	1,466338
6	0,1	31,68	42,46649	300	5	559,1	14,98928	1,481609
7	0,116667	35,58	40,88089	322	5,366667	569,95	14,23617	1,495587
8	0,133333	39,45	39,66153	340	5,666667	579,36	13,70509	1,507925
9	0,15	43,55	38,91868					
10	0,166667	47	37,80161	380	6,333333	595,87	12,6119	1,530072
11	0,183333	50,95	37,25323	400	6,666667	603,07	12,12607	1,539935
12	0,2	54,43	36,48123	420	7	609,45	11,67082	1,548782
13	0,216667	57,8	35,75995	440	7,333333	615,25	11,24634	1,556913
14	0,233333	61,19	35,1532	460	7,666667	621,07	10,85913	1,565159
15	0,25	64,66	34,67024	480	8	626,19	10,49246	1,572485
16	0,266667	68,18	34,27279	500	8,333333	630,72	10,14563	1,579025
18	0,3	75,13	33,57015	540	9	638,5	9,509979	1,590384
19	0,316667	78,17	33,09017	560	9,333333	642,63	9,229653	1,59648
20	0,333333	81,34	32,71046					
25	0,416667	97,4	31,33512	600	10	650,74	8,723056	1,608589
30	0,5	112,94	30,27882	620	10,33333	655,32	8,501081	1,615509
35	0,583333	129,18	29,68518	640	10,66667	658,78	8,278904	1,620776
40	0,666667	144,38	29,03083	660	11	662,37	8,071777	1,626278
45	0,75	159,8	28,56122	680	11,33333	666,23	7,880027	1,632235
50	0,833333	174,18	28,01823	700	11,66667	670,04	7,69866	1,638158
55	0,916667	188,5	27,5652	720	12	673,7	7,525693	1,643888
60	1	202,92	27,20107	740	12,33333	677,2	7,360336	1,649405
80	1,333333	258,03	25,94135	760	12,66667	680,75	7,204212	1,65504
100	1,666667	308,58	24,81877	780	13	683,9	7,051969	1,660071
120	2	353,72	23,70777	800	13,33333	686,56	6,902413	1,664344
140	2,333333	393	22,57756	820	13,66667	689,67	6,764565	1,669368
160	2,666667	425,81	21,40466	840	14	692,98	6,635197	1,674748

Tabela 11. Fluxo de permeado obtido da ultrafiltração do soro pré-tratado à pH 6,5 e 68°C/2 minutos (T11).

Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Tempo (min.)	Tempo (hora)	Peso de Permeado (g)	Fluxo (kg/hm ²)	Fc g
1	0,016667	8,09	65,06702	80	1,333333	313,43	31,51106	1,224268
2	0,033333	15,81	63,57909	100	1,666667	375,17	30,17453	1,280852
3	0,05	21,64	58,01609	120	2	436,33	29,24464	1,342308
4	0,066667	26,99	54,26944	140	2,333333	494,25	28,39429	1,406205
5	0,083333	33,15	53,3244	160	2,666667	553,03	27,79977	1,477586
7	0,116667	42,34	48,64803	200	3,333333	666,52	26,80375	1,638136
8	0,133333	47,02	47,27212	220	3,666667	721,14	26,36388	1,728527
9	0,15	51,54	46,05898	240	4	779,82	26,13338	1,837454
10	0,166667	60,6	48,73995	260	4,333333	827,37	25,59404	1,936331
11	0,183333	65,05	47,56276	280	4,666667	878,66	25,23918	2,05565
12	0,2	69,42	46,52815	300	5	927,44	24,86434	2,183623
13	0,216667	73,63	45,55372	320	5,333333	976,44	24,54189	2,329286
14	0,233333	86,09	49,45806	340	5,666667	1035,1	24,48589	2,53144
15	0,25	90,28	48,40751	360	6	1072,25	23,95554	2,678669
16	0,266667	94,36	47,43298	380	6,333333	1117,99	23,66283	2,88528
17	0,283333	98,39	46,54944	400	6,666667	1162,58	23,37627	3,119872
25	0,416667	118,22	38,03324	420	7	1206,82	23,1103	3,393629
30	0,5	137,31	36,81233	440	7,333333	1251,48	22,87619	3,723451
35	0,583333	156,28	35,91268	460	7,666667	1335,45	23,34975	4,555985
40	0,666667	175,42	35,27212	480	8	1375,55	23,04876	5,100611
45	0,75	194,47	34,75782	520	8,666667	1414,08	21,87173	5,762495
50	0,833333	211,51	34,02306	540	9	1450,1	21,59815	6,558068
55	0,916667	229,39	33,54472	560	9,333333	1484,6	21,32229	7,55742
60	1	246,35	33,02279	572	9,533333	1504,71	21,15774	8,294149