

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Parcer

Este exemplar corresponde a relação  
final da tese defendida por Ângela  
maria Queiroz Pellegrino e aprovada  
pela Comissão Julgadora em 04.05.87.  
Campinas, 04 de maio de 1987.

Ângela Maria S. Petenate  
Presidente da Banca

ESTUDOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS  
NA PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO  
SORO DE QUEIJO COM AMIDO EM REATOR  
DE BATELADA

Ângela Maria Queiroz Pellegrino

04/87

ORIENTADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. M. Angela Almeida Meireles Petenate

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos  
da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do  
título de MESTRE em Engenharia de Alimentos

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

Nati non fummo per viver come bruti;  
ma per seguir virtute e conoscenza.

Dante

Aos que me são caros.

## AGRADECIMENTOS

- À Faculdade de Engenharia de Alimentos pela acolhida no curso de Mestrado.
- À Professora Maria Angela Almeida Meireles Petenate pela orientação e pela amizade com que sempre me distinguiu.
- Ao Professor Carl Frederick Strong III pela permissão do uso do Laboratório de Análises de Alimentos e pela atenção com que sempre me recebeu.
- Aos Professores Cesar Francisco Ciacco, José Sátiro de Oliveira e Salvador Massaguer Roig pelas sugestões e conhecimentos transmitidos.
- Aos funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos pela ajuda na montagem de equipamentos e execução dos experimentos.
- Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela prestimosa atenção.
- À Associação Brasileira de Engenharia de Alimentos (ABIA) pelas cópias do trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO .....	1
SUMMARY .....	11
NOMENCLATURA .....	111
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA .....	4
Soro de Queijo - Composição e Valor Nutricional .....	4
Processamento do Soro .....	8
<u>Concentração</u> .....	9
<u>Secagem</u> .....	9
<u>Cristalização da lactose</u> .....	10
<u>Demineralização</u> .....	10
<u>Osmose inversa/ultrafiltração</u> .....	11
<u>Filtração em gel</u> .....	11
<u>Precipitação de proteínas</u> .....	12
<u>Coprecipitantes</u> .....	13
Teoria da Coagulação e Floculação.....	13
<u>Sistemas coloidais</u> .....	14
<u>A dupla camada difusa</u> .....	16
<u>Potencial zeta</u> .....	17
<u>Coagulação e floculação</u> .....	21
<u>Cinética da floculação</u> .....	22
<u>Mecanismos de floculação</u> .....	28
<u>Floculantes poliméricos</u> .....	30
<u>Crescimento e ruptura de flocos</u> .....	37
Precipitação e Recuperação de Proteínas .....	44
<u>Química de proteínas</u> .....	44
<u>Aspectos físico-químicos da precipitação de</u> <u>proteínas</u> .....	46

<u>Recuperação com polímeros</u> .....	47
<u>Uso do amido como agente floculante</u> .....	52
3. CINÉTICA E PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	55
Nucleação .....	56
Crescimento .....	57
Ruptura .....	58
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	60
Obtenção do Soro de Queijo .....	60
<u>Preparo do queijo Minas tipo frescal</u> .....	60
Caracterização do Soro de Queijo .....	61
<u>Gordura</u> .....	61
<u>Proteína</u> .....	61
<u>Método do biureto</u> .....	61
<u>Método micro-Kjeldahl</u> .....	61
<u>Sólidos totais</u> .....	62
<u>Viscosidade</u> .....	63
Dispersões de Amido .....	63
Experimentos de Floculação .....	63
<u>Precipitação com carboximetilcelulose</u> .....	63
<u>Floculação das proteínas do soro com amido</u> .....	65
<u>Influência do pH e concentração das dispersões de amido</u> .....	65
<u>Experimentos de filtração</u> .....	68
<u>Eficiência de amidos de diversas fontes naturais..</u>	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
Floculação das Proteínas do Soro .....	76
<u>pH e concentração das dispersões de amido na floculação das proteínas do soro</u> .....	78
<u>Experimentos de filtração</u> .....	84
Eficiência de Amido de Diversas Fontes Naturais .....	88

Mecanismos de Agregação das Partículas de Amido, Proteínas e Sólidos do Soro .....	93
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100
8. APÊNDICES	
Apêndice A .....	111
<u>Bibliografia do Apêndice A</u> .....	115
Apêndice B .....	116

## RESUMO

A cinética da floculação das proteínas e sólidos do soro de queijo foi estudada em reator de batelada. Amido de milho ortofosfatado (grau de substituição  $\sim 0,1$ ) foi usado como agente precipitante para estudos da influência do pH e concentração de dispersões de amido na recuperação de proteína do soro de queijo, especialmente  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina. Amidos de fontes naturais, tais como amido de mandioca, amido de milho puro (Maizena) e, também, amidos de milho fosfatados, como ortofosfatado monosódico (grau de substituição  $\sim 0,1$ ) e tripolifosfatado (grau de substituição  $\sim 0,01$ ) foram empregados para estudo de suas eficiências na recuperação de proteínas e remoção de sólidos da solução. As experiências foram conduzidas em um reator especialmente construído para manter condições de mistura uniforme.

Experimentos de filtração foram feitos para que se tivesse melhor idéia do tamanho da partícula amido-proteína formada durante o processo de floculação e, também, dos mecanismos que promovem a agregação dos dois polímeros.

Dos resultados obtidos concluiu-se que as condições ótimas de precipitação das proteínas do soro de queijo se dão a um pH em torno de 2,0 e a uma concentração da dispersão de amido de milho ortofosfatado monosódico de 5,0 g/l. A agregação das partículas mostrou um caráter fortemente iônico com contribuição, na etapa de crescimento, dos mecanismos de adsorção e formação de pontes. A solubilidade do agente precipitante, seu poder de gelatinização e

grau de fosfatação influíram de maneira significativa na floculação das proteínas e sólidos do soro de queijo.

## SUMMARY

The kinetics of flocculation of proteins and solids from whey was studied in a stirred batch reactor. Orthophosphated corn starch (degree of substitution  $\sim 0,1$ ) was taken as a precipitant agent to investigate the influences of pH and concentration of starch in the reactor for the whey proteins recovery, specially  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. Starches from other natural sources such as tapioca starch, corn starch and also other phosphated corn starches like orthophosphated (degree of substitution  $\sim 0,1$ ) and tripolyphosphated (degree of substitution  $\sim 0,01$ ) were used in the analysis of their efficiency in the recovery of proteins and solids removal from the solution. The experiments were carried out in a reactor built to keep uniform mixing conditions.

Filtration experiments were performed in order to get an insight of the size of the protein-starch particle formed during the flocculation process, and of the particle aggregation mechanism.

From the data obtained we could conclude that the optimum conditions for protein precipitation occur at a pH around 2,0 and at a concentration of starch dispersion equal to 5,0 g/l. The particle aggregation was shown to have a strong ionic characteristic with a contribution of the adsorption and bridging mechanisms. The solubility of the precipitant agent, its degree of gelatinization and phosphorus contents influence in a significant way the flocculation of whey proteins and solids.

## NOMENCLATURA

A	dosagem de coagulante (eq (2.7))
B	coeficiente de difusão ( $m^2 s^{-1}$ ) (eq (2.1))
$B_M$	% de proteína recuperada calculada através de balanço de material
C	taxa de crescimento linear ( $m s^{-1}$ )
$C_A$	concentração de amido no reator ( $kg m^{-3}$ )
d	diâmetro do floco (m)
du/dz	gradiente de velocidade laminar ( $s^{-1}$ ) (eq (2.5))
G	gradiente médio de velocidade ( $s^{-1}$ )
I	força iônica da solução
K	constante de Boltzmann ( $kg m^2 s^{-2} K^{-1}$ ) (eq (2.1))
$K_0$	constante de crescimento
$K_r$	constante de ruptura
$K_s$	constante de Smoluchowski para reação de primeira ordem (eq (2.6))
L	diâmetro médio do floco (m)
N	número total de partículas/volume ( $m^{-3}$ )
$N_1$	número de núcleos ou partículas primárias/volume ( $m^{-3}$ )
$N_{força}$	número de força (eq (3.3))
$N_0$	número total de partículas originalmente presentes na solução ( $m^{-3}$ )
$N_t$	número total de partículas/volume ( $m^{-3}$ ) (eq (2.6))
$N_u$	taxa de nucleação

P	% de proteína recuperada, determinada pela quantidade de proteína precipitada
$r_i, r_j$	raio da partícula (m)
R	taxa de ruptura
S	concentração do coagulante (eq (2.7))
t	tempo de floculação (s)
T	temperatura (K)
v	velocidade de agitação ( $s^{-1}$ )
$\alpha$	fator empírico de efetividade de colisão (eq (2.8)) eficiência de colisão
$\alpha'$	fator empírico de efetividade de colisão, promovendo a quebra do floco (eq (2.8))
$\delta, \delta'$	parâmetro de ruptura
$\mu$	viscosidade ( $kg\ m^{-1}\ s^{-1}$ )
$\sigma$	tensão limite ( $kg\ m\ s^2$ )
$\tau$	tempo de residência ( $s^{-1}$ )
$\emptyset$	coeficiente de adesão de partículas do floco (eq (2.7))
$\emptyset_v$	fração de volume das partículas precipitadas (eq (2.8))

## 1. INTRODUÇÃO

A elevada carga orgânica associada a resíduos descartados por agroindústrias geram graves problemas de controle ambiental. Esses resíduos são, na grande maioria das vezes, totalmente perdidos ou aproveitados de forma pouco eficiente. Caso típico de tal situação é a indústria queijeira. As águas residuárias da indústria de laticínios têm grande poder poluidor, devido ao grande teor de matéria orgânica presente. Taxas elevadas de Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) indicam a necessidade de tratamento e recuperação desse tipo de efluente. Entretanto, o custo do tratamento desses resíduos geralmente incide sobre o custo do tratamento de efluentes da rede municipal.

A produção anual de soro no mundo é estimada em 74 milhões de toneladas, 95% das quais originadas de queijo, o restante provindo da manufatura de caseína e leite coagulado. O grande volume de soro e sua natureza perecível criam problemas práticos e econômicos. Ao mesmo tempo, o valor nutricional dos sólidos do soro é indiscutível. Este último ponto, somado ao alto custo do descarte do efluente, torna interessante a utilização do soro dentro da indústria de alimentos. Embora a matéria-prima não represente qualquer custo adicional, a tecnologia de reprocessamento destes efluentes pode ter custo proibitivo. No caso da indústria queijeira, o reprocessamento do soro para obtenção do produto seco (soro

desidratado), do produto proteico ou da lactose, requer tecnologia compatível com a tecnologia atualmente utilizada por essas indústrias, pois são, em geral, indústrias de pequeno e médio porte. A questão do controle ambiental pode, em alguns casos, ser resolvida através do desenvolvimento de tecnologia que torne atraente o reprocessamento desses efluentes.

Soro e produtos baseados na sua utilização geralmente melhoram o sabor e aroma, cor, textura e, em alguns casos, a vida de prateleira de produtos de panificação. Têm-se no soro de queijo proteínas de alta qualidade nutricional, comparadas com qualquer outro alimento. A forma de processamento para utilização do soro é obviamente crítica, não somente em relação ao aspecto econômico, mas também devido à influência no produto final. Globalmente o projeto de que faz parte o programa de trabalho proposto visa o estudo da precipitação das proteínas do soro de queijo e cristalização da lactose (a partir do soro concentrado por osmose inversa), objetivando o desenvolvimento de tecnologia apropriada à indústria queijeira de pequeno e médio porte. Deseja-se, portanto, transformar o soro em três produtos finais: 1) produto proteico, 2) lactose e 3) água purificada. No presente trabalho estudou-se a precipitação e recuperação das proteínas do soro de queijo.

A recuperação de proteínas do soro de queijo tem sido extensivamente estudada por diversos autores. Um fator importante nestes esquemas de recuperação de proteínas é a maior ou menor facilidade de separação da proteína do complexo precipitado. Propõe-se aqui o uso de amido como agente floculante na precipitação e

recuperação das proteínas do soro de queijo, especialmente  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina. Dessa maneira, o produto final proteína mais amido, poderá ser usado como complemento nutritivo em produtos farináceos, sem a necessidade de separação do polímero (amido) do complexo formado. Investigou-se a utilização e eficiência de amidos de diversas fontes naturais na recuperação de proteínas e clarificação de resíduos.

A influência das características de escoamento do reator foram mantidos sob controle através do uso de um reator de mistura ideal.

## 2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

O grande volume de resíduos atualmente descartado pelas indústrias tem sido alvo de constante preocupação de nossa sociedade. No que diz respeito a indústrias de alimentos, graves problemas de poluição podem ser gerados devido à grande carga orgânica descartada. Exemplo típico de tal situação é a indústria queijeira.

### Soro de Queijo - Composição e Valor Nutricional

O soro é um subproduto das indústrias de queijo e caseína, representando 85 a 90% em volume do leite utilizado. Estima-se a produção mundial anual de soro fresco líquido em cerca de 72-74 milhões de toneladas, o que representa 18% da produção de leite [HAAST, 1982]. Em relação ao Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, tem-se uma produção de soro líquido da ordem de 1,2 milhões de toneladas/ano [VIEIRA & NEVES, 1985; VITTI, 1981].

A carga poluidora do soro é muito grande. Resíduos descartados nas redes municipais constituem um dos maiores poluentes da indústria de laticínios, se não da indústria alimentícia, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Características dos resíduos de processamento de alimentos.

<u>Águas residuárias da indústria de alimentos</u>	DBO <sub>5</sub> (mg/ml)
Produtos de panificação	2500
Enlatamento de carne	1500
Processamento de aves	5000
<u>Águas residuárias de processamento de leite</u>	
Planta de leite	1000
Planta de sorvete	2500
Planta de queijo "cottage"	6000
Planta de leite em pó	40
<u>Resíduos não processados</u>	
Soro doce	35000
Soro ácido	45000
Água residuária de processamento de peixe	50000
Esgoto doméstico	300

Fonte: Jelen, 1979

Cem quilogramas de soro líquido, contendo aproximadamente 3,5 kg de Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e 6,8 kg de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DQO) tem força poluidora equivalente ao resíduo produzido por 45 pessoas. Esse resíduo (soro), no

entanto, contém 20% das proteínas e quase todo o açúcar, somando cerca de 50% de todos os nutrientes normalmente consumidos no leite [JELEN, 1979].

A composição típica do soro de queijo é mostrada na Tabela 2. O soro obtido da fabricação dos queijos Prato, Minas, Mozzarella e Parmesão é chamado soro doce, enquanto que aquele proveniente da fabricação do queijo "cottage" é classificado como soro ácido.

Tabela 2 - Composição aproximada do soro

Componente	Soro doce <sup>a</sup> %	Soro ácido <sup>b</sup> %
Sólidos totais	6,7	6,4
Proteína	0,9	0,9
Lactose	4,9	4,3
Cinzas	0,5	0,8
Lipídios	0,3-0,1 <sup>c</sup>	0,1
pH	6,6-5,8 <sup>d</sup>	4,6

a - queijo ou caseína obtidos da precipitação com renina

b - queijo "cottage", "quarg" ou caseína ácida

c - valores maiores para o soro de queijo

d - valores maiores para o soro de caseína obtido por precipitação com renina.

Fonte: Jelen, 1979

O valor nutricional do soro é indiscutível. Durante a fabricação do queijo, somente a caseína e a gordura do leite são removidas. Os sólidos restantes, lactose, sais, proteínas do soro, assumem um significado vital como alimentos. O soro é fonte de cálcio, fósforo e contém praticamente toda a albumina do leite. Em termos de composição aproximada, conteúdo de minerais e vitaminas, calorias, os sólidos de soro desidratado podem ser comparados com farinha de trigo integral, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação das composições aproximadas do soro desidratado e farinha de trigo integral.

Componente	Unidade por 100 g de produto	Soro desidratado	Farinha de trigo
Água	g	4,5	12,0
Proteína	g	12,9	13,3
Gordura	g	1,1	2,0
Carboidrato	g	73,5	71,0
Cinzas	g	8,0	1,7
Cálcio	mg	646,0	41,0
Tiamina	mg	0,5	0,6
Riboflavina	mg	2,5	0,1
Niacina	mg	0,8	4,3
Energia	cal	349,0	333,0

Fonte: Jelen, 1979

Do ponto de vista nutricional, as proteínas do soro têm sido apontadas como superiores à maioria das outras proteínas. EVANS [1980] cita que a necessidade diária de aminoácidos pode ser suprida por 14,5 g de lactalbumina, enquanto que, tomando-se a proteína de ovo e a proteína de leite de vaca, seriam necessárias 17,4 g e 28,4 g, respectivamente.

A versatilidade de emprego dos vários componentes do soro de queijo é muito grande. O soro pode ser utilizado em novas formulações para alimentos infantis; como aditivo a bebidas obtidas de frutas; em substituição a produtos lácteos usados em confeitaria e panificação; massas; produtos dietéticos, farmacêuticos e químicos; ração animal [DE VILBISS et alii, 1974; GUY et alii, 1974; HOLMES, 1979; HUGUNIN, 1980; METTLER, 1980; MORR, 1976; TOWLER, 1982; WEBB, 1938; WEBB, 1966].

Com o grande crescimento da produção de soro resultante da atual demanda de queijo, constitui-se um problema para a indústria de laticínios, a reutilização e conseqüente controle da poluição causada por esses resíduos.

No entanto, a recuperação industrial de nutrientes do soro para reaproveitamento humano depende da viabilidade técnica e econômica dos processos, visando produtos comercializáveis.

#### Processamento do Soro

Os métodos para processamento do soro podem ser subdivididos em métodos de utilização do soro integral e métodos de

fracionamento do soro para produção de proteínas ou produtos proteicos e lactose, ou das duas substâncias, simultaneamente. Entre eles destacam-se principalmente concentração, secagem, cristalização da lactose, demineralização, osmose inversa/ultrafiltração, filtração em gel, precipitação de proteínas.

Concentração, secagem e osmose inversa recuperam essencialmente todos os sólidos. Os outros sistemas são técnicas de fracionamento, expostas a seguir.

### Concentração

O soro, sendo um produto muito diluído, requer, por vezes, concentração; a fração proteica, se recuperada, necessita de concentração [JELEN, 1983]. Esse processo reduz os custos de transporte, melhora a qualidade de armazenamento e resulta em um produto com melhores características para uso direto em alimentos. Esse tipo de produto pode ser enriquecido com outros ingredientes provindos de resíduos de indústrias que processam batatas, bebidas, etc.. Uréia também pode ser adicionada, resultando em uma ração mais completa para alimentação animal [MC DONOUGH, 1977].

### Secagem

A secagem é operação importante para a produção de ingredientes lácteos; resulta em máxima concentração, aumenta a estabilidade durante a estocagem, dando um produto com boas qualidades para incorporação a alimentos. Secagem por atomização, liofilização e outras formas de secagem são empregadas para o

processamento do soro.

### Cristalização da lactose

Os métodos empregados para a recuperação da lactose do soro podem ser classificados em dois grandes grupos: recuperação da lactose cristalina sem remoção das proteínas do soro; e coagulação e remoção das proteínas do soro previamente à cristalização [WEBB & JOHNSON, 1965].

No processo de produção de lactose, o soro desproteïnizado ou não, é concentrado em evaporadores de múltiplos efeitos até cerca de 60% de sólidos totais. A cristalização é conduzida por resfriamento a 30°C. Esse processo, além de requerer um alto investimento inicial, apresenta um elevado consumo energético. Em processo alternativo, usa-se osmose inversa. O soro, geralmente desproteïnizado, é inicialmente concentrado por osmose inversa e a concentração final se faz em um evaporador de único efeito. O consumo energético é reduzido e, apesar do investimento inicial, o processo é economicamente viável [GILLES, 1974; MC DONOUGH, 1968].

A lactose é utilizada em inúmeros produtos de panificação com a propriedade de favorecer a reação de Maillard, importante para o desenvolvimento da cor da crosta [LEITE, 1978]. Os produtos formulados com lactose têm vida de prateleira mais longa e apresentam também maior maciez [HUGUNIN, 1980].

### Demineralização

Muitas vezes se deseja a redução do teor de sais no

soro, pois, contribuem negativamente para o sabor e afetam as propriedades físicas de alguns alimentos. Os principais processos de demineralização do soro são eletrodialise e troca iônica. Assim, reduz-se o teor de minerais de 25, 50 e 90%. O produto obtido é usado em panificação, onde se necessita de baixo teor de sódio, como em cremes ou em coberturas, uma vez que o sabor salgado é indesejável [HUGUNIN, 1980].

#### Osmose inversa/ultrafiltração

Os processos de osmose inversa e ultrafiltração são baseados na ação de uma pressão mais elevada que a pressão osmótica para separação de componentes com base no peso molecular. O processo da osmose inversa é usado para caracterizar operações em que as moléculas do soluto têm aproximadamente a mesma dimensão que as moléculas do solvente. Ultrafiltração é usada para separações em que os solutos têm dimensões moleculares dez ou mais vezes maiores que o solvente, mas inferiores a  $0,5 \mu\text{m}$  [PERRY & CHILTON, 1980]. Na osmose inversa todas as moléculas, exceto a água, são retidas pela membrana e todos os sólidos são concentrados. No processo de ultrafiltração, juntamente com a água, solutos menores, como sais e lactose, passam pela membrana e são recolhidos como permeado [MC DONOUGH, 1977].

#### Filtração em gel

A filtração em gel é um dos métodos de fracionamento amplamente utilizados comercialmente. Baseia-se na extração, em uma

coluna empacotada, de moléculas, em ordem de peso molecular decrescente. Separa-se, dessa maneira, a proteína do soro, dos outros componentes menores. As técnicas de separação, como ultrafiltração, filtração em gel, eletrodialise, ampliaram substancialmente o campo para manufatura de produtos modificados, combinados a outros materiais [JELEN, 1979].

### Precipitação de proteínas

Muita ênfase tem sido dada aos métodos de concentração e recuperação da fração proteica do soro. Sob o ponto de vista nutricional tem-se proteínas de excelente qualidade, com propriedades emulsificantes das mais efetivas, permitindo sua utilização como substituto do ovo e da gordura em bolos [HUGUNIN, 1980]. Além das importantes propriedades funcionais, as proteínas do soro apresentam um perfil de aminoácidos bem balanceado, ideal para o enriquecimento de outros produtos. Seu teor de lisina e triptofano as fazem excelentes para a complementação de produtos nos quais o trigo é a principal fonte de proteínas [HUGUNIN, 1980; TOWLER, 1982].

As técnicas normalmente empregadas para a recuperação de proteínas são de dois tipos: as que utilizam calor como meio de desnaturação e as que, ao contrário, evitam todo e qualquer tratamento térmico para conservar ao máximo as propriedades das proteínas, em especial, seu caráter de solubilidade [LEITE, 1978].

Para se conservar propriedades, como solubilidade, gelificação, emulsificação, a separação requer o uso de precipitantes químicos e/ou separação por membranas [MORR, 1978]. Os precipitantes químicos utilizados incluem polifosfatos, carboximetilcelulose,

ácido poliacrílico e álcoois.

### Coprecipitantes

As proteínas do soro podem ser coprecipitadas com caseína ou com outras proteínas, como proteína de sangue, ovo e soja [HILL, et alii, 1982]. Combinações de soro ácido e efluentes de curtume têm sido usadas em processos que espontaneamente coprecipitam as proteínas do soro e peptídeos com proteínas do efluente de curtimento de couro [TOWNEND, 1978]. Hexametáfosfato de sódio, ácido poliacrílico e ferripolifosfato foram também usados como agentes precipitantes na recuperação de proteínas no processo de coprecipitação, em que se usa farinha de sementes de colza e soro de queijo, com bons resultados [THOMPSON et alii, 1984].

### Teoria da Coagulação e Flocculação

Inúmeros estudos têm sido conduzidos no campo de tratamento de águas residuárias e reaproveitamento de efluentes. O crescente interesse voltado para o tratamento de resíduos e, especialmente reutilização de nutrientes, voltou a atenção de grande número de pesquisadores para os processos de precipitação química, flocculação e clarificação de águas. O processo de flocculação-sedimentação tem sido colocado como um dos principais para tratamento de águas com elevada turbidez.

Na maioria dos sistemas de separação por gravidade, a função do coagulante é condicionar a suspensão, de maneira que uma

partícula se ligue a outra. Isso é conseguido, reduzindo-se a barreira coulômbica entre as partículas, mudando-se as suas propriedades na superfície, possibilitando o contato entre elas, ou introduzindo-se um agente formador de pontes que ligue uma ou mais partículas, formando um agregado.

A maioria dos estudos de floculação se voltam para a química e a cinética do processo. Assim, um conhecimento do sistema, suas características e propriedades se faz necessário.

### Sistemas coloidais

Os fenômenos de coagulação e floculação, através dos quais partículas suspensas em líquidos ou gases formam agregados têm grande importância nos sistemas coloidais. Prática comum em tratamento de água consiste em tratar-se suspensões coloidais, operando primeiramente na sua química de superfície, a fim de induzir-se a coagulação e, então, quando os flocos apresentarem um tamanho apropriado, separá-los por sedimentação ou filtração.

Os sólidos que devem ser separados de líquidos ou gases variam em tamanho, morfologia e natureza química. Essas partículas, colóides, como são chamadas, são geralmente, menores que  $1 \mu\text{m}$  [HUGHES, 1981]. Os fatores que mais contribuem para a natureza de um sistema coloidal são: dimensões das partículas; forma e flexibilidade das partículas; propriedades superficiais (inclusive elétricas); interação partícula-partícula e interação partícula-solvente. As partículas presentes numa dispersão coloidal são suficientemente grandes para permitirem a existência de superfícies

de separação definidas entre elas e o meio no qual estão dispersas. Dispersões coloidais simples, são, portanto, sistemas de duas fases. Sóis e emulsões são os dois tipos mais importantes de soluções coloidais. O termo sol é usado para distinguir soluções coloidais de suspensões macroscópicas [SHAW, 1975].

Dispersões coloidais podem ser alteradas pelo tratamento sólido-líquido da interface, através da adição de eletrólitos ou agentes tenso-ativos; pelo ajustamento das condições físicas, levando ao crescimento de cristais ou a uma mudança no tamanho de partícula e na área interfacial [HUGHES, 1981].

As dispersões coloidais podem ser classificadas em liofílicas e liofóbicas. Soluções liofílicas são aquelas em que o sólido mostra afinidade pela água ou qualquer outro meio de dispersão. Dessa maneira, os sóis são formados espontaneamente por agitação. Os colóides liofóbicos exibem pouca afinidade pelo meio e sóis podem ser formados por meios químicos ou mecânicos. Este grupo de sóis é menos sensível à adição de eletrólitos e concentrações muito altas são necessárias. Exemplos de colóides liofóbicos são: argilas, óxidos hidratados, etc.. Colóides liofílicos são macrocélulas, como proteínas, ácidos húmicos, etc..

As partículas coloidais encontram-se em constante movimento browniano e, quanto menor a partícula maior a sua intensidade. Esse movimento caótico aproxima as partículas o suficiente para que sejam atraídas por forças de van der Waals. A não ser que as soluções estejam estabilizadas, partículas que se aproximam dentro de uma distância próxima ao seu diâmetro ligam-se umas às

outras e, então, coagulam. Quando as partículas se juntam devido a tal colisão, o processo é chamado de coagulação rápida.

As dispersões podem ser estabilizadas por:

1. camadas difusas de ions (parte exterior de uma dupla camada) que circundam partículas de sóis.
2. filmes protetores formados por camadas de fluidos.
3. cargas ou, possivelmente, dipolos na superfície de partículas de aerosol.

A presença de um estabilizante reduz consideravelmente o número de colisões de partículas que resultam em agregação. Quando fatores estabilizantes estão presentes, o processo é conhecido como coagulação lenta [KITCHENER, 1972; LEVICH, 1962].

#### A dupla camada difusa

A distribuição dos ions próximo à superfície da partícula, mais a tendência à mistura provocada pela agitação térmica, leva à formação de uma dupla camada elétrica, constituída por duas partes, uma superfície carregada e um meio polar em que se distribuem, de maneira difusa, os ions [SHAW, 1975].

A superfície negativa do colóide atrai uma camada de ions positivos que circundam a partícula e que provêm do líquido ou da superfície do colóide. Ions de carga oposta à partícula são arrastados para a superfície por atração eletrostática. A agitação térmica ou o movimento browniano tendem a distribuí-los mais uniformemente através da solução. Esse sistema carregado, formado pela superfície do colóide e dos contra-ions, é chamado de dupla

camada.

Se a carga negativa do colóide for grande, alguns contra-ions serão fortemente atraídos à superfície, formando uma camada compacta, geralmente chamada de camada de Stern. A camada de Stern parcialmente neutraliza a carga e a atração eletrostática do colóide, de maneira que os contra-ions remanescentes estejam longe, mas ainda mantidos na vizinhança da superfície do colóide. Esses formam a parte difusa da dupla camada, ou camada difusa.

A atração do colóide é maior perto da superfície devido à distância e, também, porque os contra-ions próximos a ela interpoem sua carga positiva, protegendo aqueles mais distantes. Assim, os contra-ions que têm ação neutralizadora estão concentrados perto do colóide e tornam-se gradualmente desprezíveis a distâncias maiores. Da mesma maneira, os ions negativos de quaisquer sais presentes tendem a ser repelidos da vizinhança imediata das partículas coloidais. A dimensão da espessura dessa camada difusa depende primeiramente da concentração de sais no líquido; se a concentração é grande, essa espessura pode ser reduzida a alguns angstrons [RIDDICK, 1961].

#### Potencial zeta

O potencial zeta é o potencial na superfície que separa a parte imóvel da dupla camada da parte difusa. É uma medida da carga da camada difusa e sua extensão, a partir da superfície do colóide. Está, portanto, relacionada à força e à distância em que as partículas repelem umas às outras, impedindo a floculação.

O potencial zeta é calculado a partir de medidas do potencial eletrocinético em suspensões muito diluídas de partículas. Observações indicam a existência de um valor de zeta abaixo do qual a suspensão não é mais defloculada. Esse valor é chamado de potencial zeta crítico.

O conceito de potencial zeta é útil nos estudos de floculação, quando se deseja saber a quantidade de eletrólito para se desestabilizar o sistema. Quando um eletrólito é adicionado a uma suspensão estável, a mobilidade eletroforética das partículas diminui, indicando um valor menor de zeta. Por outro lado, o valor máximo de zeta não indica as condições de maior estabilidade. Isso mostra que a repulsão depende, não somente do potencial da superfície, mas também da concentração de eletrólito e do potencial médio resultante da aproximação das partículas. Portanto, um conhecimento do potencial zeta em si não é suficiente para predizer efeitos que não a adição de eletrólitos, os quais limitam a estabilidade sob mecanismos de choque e cisalhamento [HUGHES, 1981; PACKHAM & SHEIHAM, 1977; RIDDICK, 1961; SHAW, 1975].

A Figura 1 ilustra a partícula coloidal, o conceito da dupla camada e o potencial zeta.

Qualitativamente, a coagulação de colóides por altas concentrações de eletrólitos adicionados deve-se à redução do potencial zeta, diminuindo a repulsão entre as partículas em colisão e permitindo que as forças atrativas as aproximem. Esse quadro qualitativo foi estudado por Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek e é chamado de teoria do DLVO para estabilidade coloidal [PACKHAM

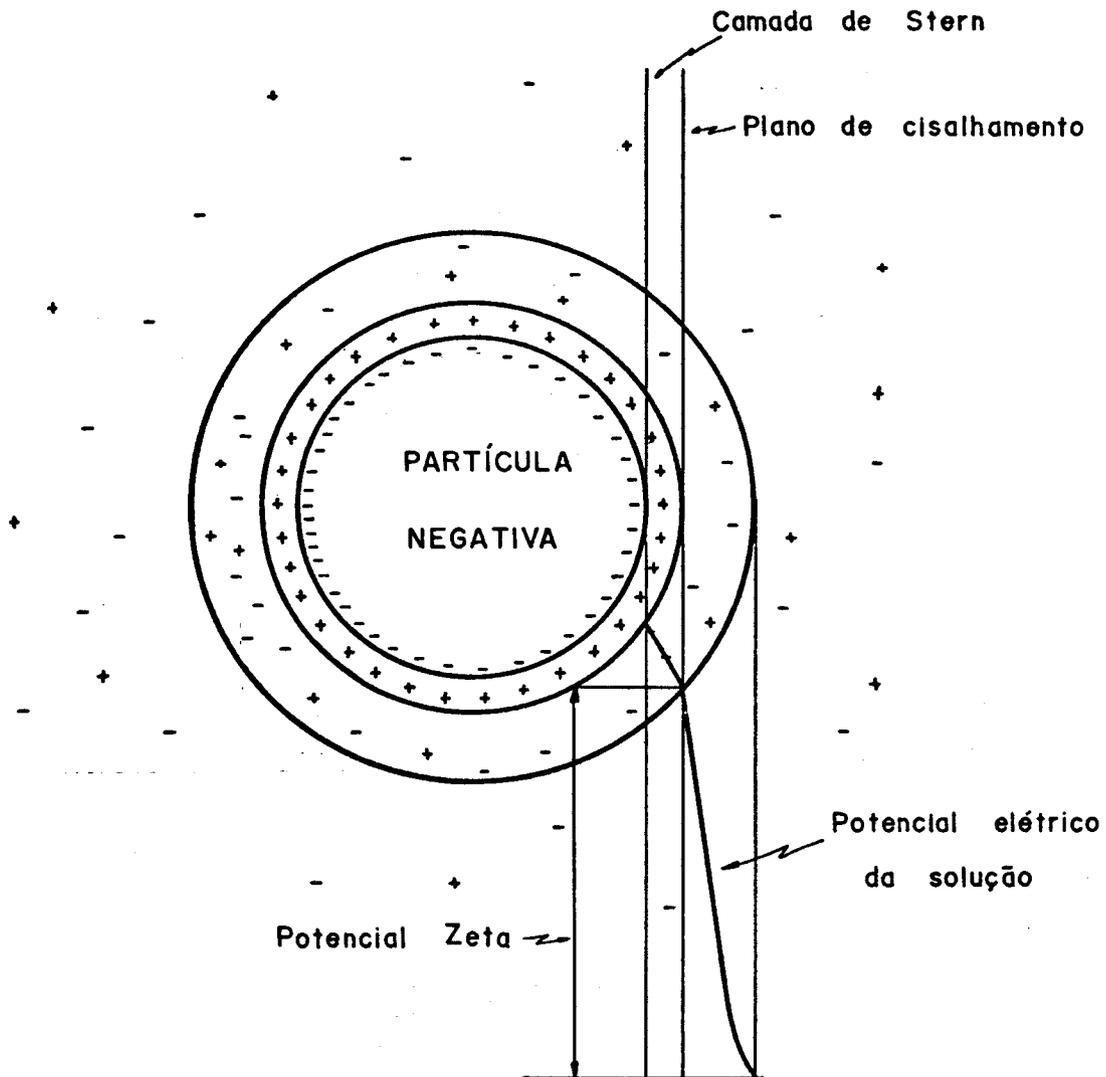


Figura 1 - Modelo coloidal

& SHEIHAM, 1977]. A teoria foi desenvolvida primeiramente, considerando a interação entre duas placas planas idênticas, obtendo-se uma expressão para a energia de interação. Foi, então, estendida para explicar a energia de interação entre esferas idênticas em colisão. Quando trazido à prática, esse modelo idealizado torna-se uma dispersão coloidal com esferas perfeitas de tamanho uniforme. Muito embora a teoria do DLVO seja amplamente aceita, um sistema experimental que a teste completamente, ainda não foi idealizado. Sabe-se, hoje, que a teoria é mais largamente empregada a forças de longo alcance e menos empregada a forças de curto alcance, pois, quanto menor a distância entre as partículas, maior é a diferença entre o sistema real e o modelo ideal, no qual a teoria se baseia [BELL et alii, 1982; KITCHENER, 1972; PACKHAM & SHEIHAM, 1977].

A teoria do DLVO não permite prever as propriedades dos agregados formados, mas prediz que a redispersão de colóides, depois da coagulação com sais, deveria ser praticamente impossível, o que na realidade não é verdadeiro [PACKHAM & SHEIHAM, 1977].

Relativamente a tratamento de água, a teoria tem sido estendida significativamente no campo da heterocoagulação, definida como coagulação de partículas dissimilares. Estudos experimentais da heterocoagulação têm sido feitos, usando-se partículas de látex de tamanhos diferentes [MATHEWS & RHODES, 1970].

## Coagulação e floculação

Coagulação e floculação são termos muitas vezes usados indiscriminadamente, causando confusão acerca de seus significados. La Mer e Healy, em 1963, propuseram uma diferenciação entre eles. Coagulação refere-se à desestabilização de partículas, devido a uma redução do potencial zeta da dupla camada elétrica, de acordo com o proposto por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek. Floculação denota a desestabilização, através da ação de materiais de alto peso molecular (amido de batata e polieletrólitos em geral), que agem como polímeros lineares, unindo, através de pontes, as partículas sólidas de uma solução em uma estrutura tridimensional, frouxa e porosa [BLACK et alii, 1965; LA MER, 1964; PACKHAM & SHEIHAM, 1977].

Nesse trabalho, o termo floculação será usado para se denotar a ação de materiais poliméricos sobre as proteínas do soro de queijo, causando a formação de agregados insolúveis que precipitam da solução.

O modelo clássico da floculação assume que partículas precipitam rapidamente com um tamanho submícron. Esse aglomerado cresce rapidamente a  $1 \mu\text{m}$ , através de agitação térmica e movimento browniano. O crescimento é resultado de colisões posteriores causadas pelo movimento do fluido.

A floculação causada por movimento do fluido é chamada ortocinética, para se diferenciar daquela causada por movimento browniano, chamada pericinética.

## Cinética da floculação

Em 1917, von Smoluchowski publicou uma teoria matemática para a cinética de coagulação de suspensões coloidais. Equações matemáticas foram apresentadas para descrever a mudança na concentração total de partículas devido à colisão. Smoluchowski desenvolveu duas equações cinéticas: a primeira descreve o processo, quando colisões entre partículas ocorrem através da difusão browniana de partículas individuais (floculação pericinetica); a segunda, quando um gradiente laminar de cisalhamento causa o transporte de partículas no fluido (floculação ortocinetica) [BIRKNER & MORGAN, 1968].

A taxa de colisão entre partículas primárias em agitação térmica é dada por [STEVENSON, 1972]:

$$\frac{dN}{dt} = -4\pi B d N^2 \quad (2.1)$$

$$B = \frac{2}{3} \frac{KT}{\pi \mu d}$$

onde

B - coeficiente de difusão ( $m^2 s^{-1}$ )

d - diâmetro do floco (m)

K - constante de Boltzmann ( $kg m^2 s^{-2} K^{-1}$ )

N - número total de partículas/volume ( $m^{-3}$ )

T - temperatura (K)

$\mu$  - viscosidade ( $kg m^{-1} s^{-1}$ )

Substituindo e rearranjando, temos:

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{8}{3} \frac{KT}{\mu} N^2$$

$$\frac{dN}{N^2} = -\frac{8}{3} \frac{KT}{\mu} dt \quad (2.2)$$

Integrando com a condição inicial,

$N(t = 0) = N_0$ , resulta

$$\left(\frac{1}{N} - \frac{1}{N_0}\right) = \frac{8}{3} \frac{KT}{\mu} t, \text{ ou} \quad (2.3)$$

$$t = \frac{3}{8} \frac{\mu}{KT} \left(\frac{1}{N} - \frac{1}{N_0}\right) \quad (2.4)$$

Essa relação define o desaparecimento de partículas primárias. Partículas secundárias daí produzidas colidirão, também, formando partículas terciárias e, assim, por diante. A reação é "bimolecular" e o tempo para que se complete, varia inversamente com a concentração de partículas.

Agitando-se a dispersão, pode-se causar um aumento na taxa de floculação (floculação ortocinética).

Se cada colisão leva à agregação de duas partículas, então, a equação da velocidade para floculação ortocinética torna-se [IVES, 1981]:

$$-\frac{dN}{dt} = \frac{4}{3} (du/dz)(r_i + r_j)^3 N_i N_j \quad (2.5)$$

$du/dz$  - gradiente de velocidade laminar ( $s^{-1}$ )

$r_i, r_j$  - raio da partícula (m)

$N_i, N_j$  - número de partículas/volume ( $m^{-3}$ )

Assim, pode-se afirmar que a taxa de floculação pode ser aumentada [IVES, 1981]:

1. aumentando-se o raio de colisão das partículas, pois, flocos maiores são produzidos.
2. aumentando-se o gradiente de velocidade; entretanto, há um limite para a tensão de cisalhamento que os

flocos podem suportar. A tensão limite que os agregados suportam resulta do balanço de forças que são responsáveis pela sua estrutura. O agregado pode ser quebrado, quando as forças hidrodinâmicas, agindo sobre ele, excedem a tensão limite. Assim, gradientes de velocidade excessivos podem causar quebra de flocos, particularmente quando os flocos crescem em tamanho [PETENATE & GLATZ, 1983a]. Isto pode ser evitado, diminuindo o gradiente de velocidade de um valor inicialmente alto, quando os flocos são pequenos, até valores mais baixos, à medida que os flocos crescem.

3. aumentando-se a concentração de partículas presentes, pois, a floculação diminui à medida que o número de partículas decresce, devido à agregação; o grande número de partículas, bem como o de flocos, é vantajoso.

Para uma suspensão diluída de partículas monodispersas, a taxa inicial de mudança na concentração total de partículas em um campo de cisalhamento laminar pode ser expressa por [BIRKNER & MORGAN, 1968]:

$$\frac{dN_t}{dt} = -K_s N_t \quad (2.6)$$

onde

$K_s$  - constante de Smoluchowski para a reação da primeira ordem

$N_t$  - número total de partículas presentes/volume ( $m^{-3}$ )

A equação (2.6) é válida somente durante a fase inicial da reação de floculação, quando se pode assumir que as colisões entre partículas ocorrem entre pares de partículas de mesmo tamanho. Com o desenvolvimento da reação de floculação a concentração total de partículas diminui e a distribuição de tamanhos de partículas é ampliada. Consequentemente, a suposição de colisões entre partículas de mesmo tamanho não é mais válida e a equação (2.6) não descreve mais o processo de floculação. Muller [MATTHEWS & RHODES, 1970], levando em conta esse fator, estendeu a teoria de Smoluchowski para partículas de diferentes tamanhos, usando as mesmas suposições básicas.

Camp [STEVENSON, 1972] mostrou que a densidade do floco diminui à medida que o floco cresce, indicando que o termo de concentração deve aumentar.

Lagvankar e Gemmel, e também Vold [STEVENSON, 1972] postularam que partículas primárias formam aglomerados primários, os quais formam aglomerados secundários e, assim, sucessivamente.

A floculação em um líquido em movimento envolve todas as partículas, não importando o tamanho, dependendo apenas da concentração e taxa de cisalhamento. Se uma grande faixa de tamanhos está envolvida, partículas pequenas colidirão com ambas, partículas pequenas e grandes e, vice-versa. Desde que o raio de colisão é definido pela soma dos raios das partículas, a frequência de colisão é ditada primariamente pelas partículas de dimensões maiores.

Além disso, o produto da colisão de uma partícula grande e outra pequena é uma partícula grande de dimensões similares. A distribuição do tamanho de partículas é melhorada com a agitação, tendendo ao tamanho limitado pela tensão de cisalhamento.

Smoluchowski [VAN DE VEN & MASON, 1977] tornou possível o conhecimento da frequência de colisão de duas esferas em um fluido em movimento, assumindo que no encontro, elas se aproximam por um caminho reto. Não há forças agindo nas esferas até que elas tenham contato físico, depois do qual se aderem.

Apesar das limitações da teoria de Smoluchowski, seu sucesso é notável, estando a principal razão em dois efeitos importantes, os quais ele negligenciou e que se contrabalançam: a resistência hidrodinâmica, impedindo que as esferas entrem em contato, e as forças de atração de van der Waals, que fazem com que as esferas se aproximem.

A teoria foi melhorada, introduzindo-se a eficiência de colisão, definida como a fração de partículas em contato após a colisão. O maior progresso na teoria foi feito por Curtis e Hocking [VAN DE VEN & MASON, 1977] que, levando em conta a interação hidrodinâmica e a atração de van der Waals, derivaram equações para as trajetórias entre duas esferas. Solucionando essas equações numericamente, iniciando com uma dada posição relativa entre duas esferas, eles consideraram como as esferas entram em contato ou se separam após a colisão, estabelecendo por tentativa e erro, quais posições relativas resultam em colisão ou não. Entretanto, os resultados não são exatos, pois, a definição de colisão não é

satisfatória. Os autores também assumem que, se duas esferas separaram-se após o encontro, uma subsequente agregação não ocorre [VAN DE VEN & MASON, 1977].

Swift e Friedlander [BIRKNER & MORGAN, 1968] verificaram experimentalmente a validade das equações cinéticas de primeira e segunda ordem, propostas por Smoluchowski. As constantes da equação da velocidade determinadas experimentalmente foram apenas 36-38% dos valores encontrados por Smoluchowski. A coagulação ortocinética e pericinetica foi estudada, usando-se partículas esféricas de látex em uma solução aquosa de alta concentração de eletrólito; assim, os efeitos de repulsão são desprezíveis. Dos resultados conclui-se que as taxas de coagulação pericinetica e ortocinetica são aditivas, como também independentes da taxa de cisalhamento, igualando-se à eficiência de agregação pericinetica. VAN DE VEN & MASON [1977], analisando os resultados obtidos por Swift e Friedlander, afirmam que a suposição da adição das taxas de coagulação orto e pericinetica não é válida.

Camp e Stein [HUDSON, 1965] derivaram uma relação matemática para descrever a cinética de floculação. A equação leva em conta o tempo e intensidade de floculação, dosagem de coagulante, volume e conteúdo de sólidos do floco. As experiências confirmaram a hipótese de que o volume do floco é proporcional à dosagem do coagulante e, também, de que o floco pode ser cerca de dez vezes mais compacto, aumentando a velocidade de agitação, sem danos às características de sedimentação.

A relação obtida por Camp e Stein é:

$$\ln \frac{N_0}{N_t} = \frac{\phi AG}{\pi S} t \quad (2.7)$$

onde

- $N_0$  - matéria suspensa originalmente presente na solução
- $N_t$  - matéria não floculada presente na solução depois do tempo  $t$
- $A$  - dosagem de coagulante
- $S$  - concentração do coagulante
- $G$  - gradiente médio de velocidade
- $t$  - tempo de floculação
- $\phi$  - coeficiente de adesão de partículas ao floco

### Mecanismos de floculação

Dois mecanismos podem ser usados para descrever o processo de floculação: neutralização da carga da superfície e formação de pontes. O primeiro mecanismo envolve a neutralização da carga superficial da proteína, quando o agente floculante e a partícula a ser retirada da solução têm cargas opostas. A desestabilização de suspensões coloidais com ions inorgânicos envolve a compressão da dupla camada que circunda as partículas. Uma vez reduzida a espessura da dupla camada, as partículas podem se aproximar, sendo a distância pequena o suficiente para que sofram o efeito das forças de van der Waals e se aglomerem [BIRKNER & EDZWALD, 1969]. Assim, para que o mecanismo de neutralização seja eficiente, deve-se escolher um polieletrólito ou ion cuja carga tenha sinal oposto à carga das partículas coloidais. A densidade

de carga do polímero será uma medida importante de sua capacidade de flocular [HUGHES, 1981].

O outro mecanismo envolve a formação de pontes entre as partículas, pelo agente floculante, sem necessariamente neutralizar ou remover a barreira de carga repulsiva [BELL et alii, 1982].

Segundo BLACK et alii [1965], a teoria da formação de pontes postula que as moléculas do polímero ligam-se à superfície das partículas suspensas em mais de um ponto de adsorção, deixando livre parte da cadeia que se estende para o meio da solução. Quando esses segmentos de cadeia fazem contato com sítios de adsorção "livres" de outras partículas suspensas, pontes são formadas entre elas.

As partículas, então, formam pequenos agregados que podem crescer em tamanho. Esse tamanho é limitado pelo gradiente de velocidade, pelo grau de agitação do sistema e pela quantidade de polímero inicialmente adsorvida pela superfície das partículas. Se muitos pontos de adsorção forem ocupados pelo polímero, a formação de pontes será impedida; se todos eles forem ocupados, será totalmente inibida. Por outro lado, se poucos sítios de adsorção são ocupados, as pontes podem ser tão fracas que serão facilmente destruídas pelas forças de cisalhamento do fluido e pelas condições de agitação do sistema.

BIRKNER & EDZWALD [1969] citam que polieletrólitos têm se mostrado bastante eficientes em promover a agregação de partículas, com dupla função na reação de desestabilização. Primeiramente, servem como coagulantes efetivos, comprimindo a dupla

camada que circunda os colóides carregados negativamente ou reduzindo o potencial de superfície negativa das partículas. Em segundo lugar, se as moléculas do polímero têm comprimento suficiente, elas servem como agentes formadores de pontes, ligando as partículas fisicamente. Polímeros aniônicos e não iônicos não exibem essas duas funções na desestabilização de colóides carregados negativamente. BLACK et alii [1965] postulam que polímeros aniônicos funcionam exclusivamente como formadores de pontes.

### Floculantes poliméricos

Um dos mais importantes desenvolvimentos na prática de tratamento de resíduos tem sido a utilização de polímeros naturais ou sintéticos para promover a floculação de partículas coloidais. Porque operam por um mecanismo distinto, merecem ser tratados como um tipo a parte de coagulação, muito embora a neutralização de cargas tenha papel importante na ação desses polímeros. Tais substâncias têm se mostrado grandemente eficientes como floculantes e, com poucas exceções, não podem ser aplicadas como coagulantes primários [PACKHAM & SHEIHAM, 1977]. O seu uso é particularmente interessante, pois demonstram grande eficiência em concentrações extremamente baixas [BLACK et alii, 1965].

Os floculantes poliméricos são colóides hidrofílicos típicos, com peso molecular variando de  $10^4$  a  $10^7$  e são espontaneamente solúveis e estáveis em água. São capazes de coagular colóides e influenciar no crescimento de flocos, agindo pelos dois mecanismos, que podem operar simultaneamente. Se o polímero é iônico

(amidos fosfatados, carboximetilcelulose, poliacrilamida, polietilenoimina) e sua carga é oposta à das partículas coloidais, a adsorção do polímero reduz a carga líquida da partícula, desestabilizando o colóide. Dessa maneira, o polímero age como um ion carregado, causando a coagulação.

BLACK et alii [1965] citam ser sugerido que polímeros catiônicos são adsorvidos por mecanismos de troca iônica. A adsorção de polímeros aniônicos por partículas de argila pode ocorrer por formação de pontes de hidrogênio. Tem sido também sugerido que anions presentes na solução podem competir com o polímero por sítios de adsorção nas partículas [BLACK et alii, 1965; BIRKNER & EDZWALD, 1969].

Indiferentemente à carga do polímero, a molécula pode ser adsorvida em partículas separadas, em pontos diferentes, formando uma ponte entre elas, causando a coagulação. Imediatamente após a introdução do polieletrólito à suspensão, o polímero adsorve em um ponto de ligação, enquanto o resto da cadeia estende-se livremente no meio da solução. Algum tempo depois, a cadeia liga outros pontos de sua extensão, até que a molécula esteja completamente enrolada ao redor da partícula. Os flocos formados dessa maneira são estáveis e não são redispersos no meio; tendem a ser maiores, mais frouxos e com uma estrutura mais aberta do que aqueles formados por neutralização de cargas [BLACK et alii, 1965; BIRKNER & EDZWALD, 1969; PACKHAM & SHEIHAM, 1977].

Quando pontes são formadas, o polieletrólito coagula o colóide, mas, se a partícula está coberta por moléculas de polímero não adsorvidas a outras partículas, então, cria-se uma ação protetora. KITCHENER [1972] cita que a ação protetora de colóides pode ocorrer ou com colóides de origem biológica já protegidos por outros colóides hidrofílicos e, portanto, insensíveis à coagulação, ou porque flocculantes poliméricos são empregados impropriamente, causando a proteção das partículas, ao invés da flocculação. A ação protetora dos colóides é explicada pela adsorção de um agente protetor pelo colóide hidrofóbico, formando uma camada com propriedades hidrofílicas. Uma escolha correta da ordem de adição dos reagentes evita que as partículas a serem coaguladas sejam protegidas.

Sabe-se que a flocculação por polímeros não está restrita a sistemas onde os polímeros e as partículas coloidais têm sinais opostos. A literatura cita muitos exemplos de interação entre polímeros aniônicos e colóides carregados negativamente. LA MER [1956b], em estudos sobre flocculação de lamas por amido de batata, sugeriu que, apesar de fortes interações iônicas locais contribuírem para a ligação das moléculas do polímero, não há dúvidas de que outros mecanismos, além da atração eletrostática, tenham participação ou até mesmo sejam predominantes.

Por outro lado, cita-se casos [BLACK et alii, 1965] em que polímeros catiônicos e aniônicos devem ser usados na presença de ions metálicos, a fim de remover a turbidez. BIRKNER & EDZWALD [1969] estudaram o efeito da adição de ions cálcio e sódio na

reação de desestabilização de suspensões de argila por um polímero não iônico. Os resultados indicam que ions sódio são mais efetivos, promovendo maior adsorção do polímero às partículas de argila, talvez devido à maior energia de ligação.

BLACK et alii [1965] sugerem que, embora o mecanismo de formação de pontes seja o principal modo de ação de polímeros aniônicos em suspensões diluídas de argila, uma concentração suficiente de contra-ions deve estar inicialmente presente ou ser adicionada à solução, a fim de reduzir as forças repulsivas partícula-partícula, polímero-partícula e polímero adsorvido-polímero.

Ions adicionados ao sistema podem afetá-lo pela compressão da dupla camada das partículas coloidais, reduzindo a força repulsiva entre elas; reduzindo as forças repulsivas entre o polímero e a partícula; reduzindo interações entre as moléculas de polímero adsorvido à superfície das partículas.

A dosagem do polímero é outro aspecto de grande importância na floculação de partículas coloidais. BIRKNER & MORGAN [1968] estudaram a reação de desestabilização envolvendo polietilenoimina e partículas de látex em reator agitado, sob condições turbulentas e apontam que a máxima remoção de turbidez da solução ocorre em uma faixa bastante limitada de dosagem do polímero. Como visto anteriormente, quando a dosagem ótima do flocculante é excedida, as superfícies das partículas em colisão tornam-se cobertas pelos segmentos de polímero, prejudicando a formação de pontes entre as partículas. Assim, a suspensão é restabilizada em dosagens de

polímeros superiores à ótima [BIRKNER & MORGAN, 1968; BIRKNER & EDZWALD, 1969; HUGHES, 1981; KITCHENER, 1972; PACKHAM & SHEIHAM, 1977]. Concentrações inferiores à ótima resultam na insuficiente formação de pontes pelo polímero, produzindo um agregado fracamente ligado e incapaz de suportar as tensões hidrodinâmicas presentes no reator.

LA MER et alii [1956b] enfatizaram o conceito da dosagem ótima de polímero com a qual um ótimo na formação de pontes pode ocorrer com cobertura parcial das superfícies adsorbentes. Esses autores detectaram um ponto ótimo pronunciado no gráfico de eficiência de floculação em função da dosagem do polímero. O efeito do peso molecular do polímero também é apontado por vários autores [HUGHES, 1981; KITCHENER, 1972; PACKHAM & SHEIHAM, 1977]. Linke e Booth [KITCHENER, 1972] mostraram que a dosagem ótima (massa de polímero/massa de sólidos suspensos) aumenta com o aumento do peso molecular, o que é compreensível, uma vez que as moléculas são mais longas e não se estendem planamente na superfície. Quanto mais alto o peso molecular, mais rápida a taxa de sedimentação dos flocos. Conseqüentemente, uma dosagem prática de polímero produz flocos maiores, quanto mais alto o peso molecular. Polímeros de cadeia curta são menos efetivos para o processo de formação de pontes.

Uma molécula de polímero pode estar fortemente adsorvida como um todo; no entanto, um grande número de "ligações" fracas podem estar presentes. Ainda assim, a desorção do polímero da superfície da partícula é geralmente muito lenta e difícil de

ocorrer, pois, para que uma molécula se torne desorvida, tem que se separar da superfície em vários pontos simultaneamente, o que é bastante improvável. Por outro lado, uma mudança nas condições do meio, como pH ou adição de uma alta concentração de uma substância competidora da superfície, como por exemplo, tripolifosfato de sódio, torna geralmente possível deslocar-se o flocculante. Outros fatores que podem contribuir para limitada desorção do polímero são condições de intensa agitação e forças hidrodinâmicas, agindo nas proximidades da superfície da partícula.

Resumindo-se o quadro exposto acima, os princípios básicos da floculação por agentes poliméricos são [KITCHENER, 1972]:

1. Para se flocular uma dada suspensão coloidal, o polímero deve ser solúvel no meio, mas fortemente adsorvido na superfície das partículas dispersas.
2. Sob condições práticas, a adsorção é um processo rápido, geralmente irreversível e completo (não há moléculas de polímero remanescentes na solução).
3. Uma floculação efetiva é conseguida com uma concentração de polímero abaixo daquela que o sólido é capaz de adsorver na saturação.
4. Existe uma dosagem ótima, para produção de flocos grandes, grandes volumes de sedimento e mínima turbidez residual.
5. Com concentrações de polímero mais altas que a ótima, a adsorção não é completa, restando alguma quantidade de polímero na solução. A adsorção, no entanto,

continua a aumentar devido ao rearranjo das cadeias de polímero. As ligações formadas dessa maneira são fracas e podem ser facilmente desfeitas.

6. Se uma concentração maior que a ótima for usada, a eficiência de floculação reduz, e com grande excesso, o sistema passa a uma condição estabilizada.
7. O método de adição do polímero é fator importante. Para que a floculação seja eficiente deve-se usar uma solução de polímero bastante diluída, com uma alta velocidade de agitação durante o período de adição da solução. Dessa maneira, tem-se uma melhor distribuição do polímero na suspensão, evitando que as moléculas tenham tempo de adsorver o polímero em excesso.
8. A agregação das partículas coloidais começa como resultado de colisões provocadas por movimento browniano, dependendo apenas da temperatura e concentração das partículas. O crescimento de flocos dependerá, sobretudo, de colisões hidrodinâmicas, o que é proporcional ao gradiente de velocidade utilizado. Assim, um período de condicionamento deve existir, com uma leve agitação do sistema, para promover colisões e manter os flocos em suspensão até que todas as partículas se agreguem.
9. Os flocos produzidos com polímeros são muito mais fortes que aqueles formados por coagulação com eletrólitos; as partículas mantêm-se unidas por ligações

elásticas e não somente por fraças ligações de van der Waals.

10. Os flocculantes de maior peso molecular são mais efetivos na formação de pontes mais resistentes.
11. Muitos fatores contribuem para a força de adsorção de polímeros;
  - a. forças eletrostáticas - qualquer polieletrólito será sempre mais fortemente adsorvido em uma superfície de carga oposta. Tenderá a ser repelido de uma superfície de mesma carga, mas pode ser retido por ligação química dos grupos funcionais.
  - b. pontes de hidrogênio entre grupos não iônicos.
  - c. ligações salinas através de contra-ions divalentes.

#### Crescimento e ruptura de flocos

Partículas primárias formam aglomerados de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  por meio de agitação térmica e movimento browniano. Esses pequenos aglomerados podem crescer como resultado de novas colisões e movimento do fluido. Assim, o crescimento de um floco se dá pela adição de partículas primárias a um pequeno agregado por movimento browniano e turbulento [STEVENSON, 1972].

O movimento turbulento do líquido tem, portanto, sido tomado como uma das maneiras de se promover o crescimento do floco. O floco, entretanto, possui um limite à tensão de cisalhamento que pode suportar e será quebrado por taxas excessivas.

O cisalhamento da superfície de partículas primárias é

promovido pelo movimento do fluido relativo ao floco e é uma função da escala de turbulência do movimento que o influencia. Movimento local do fluido relativo à partícula é desenvolvido por turbilhões, que parcialmente arrastam o floco. Turbilhões que são suficientemente grandes para arrastar o floco como um todo produzem uma velocidade relativa igual a zero, sem cisalhamento da superfície. Turbilhões que são muito menores que a superfície do floco, resultam em pequeno cisalhamento de superfície. Dessa maneira, em primeiro plano, seria de se esperar que turbilhões de escala aproximadamente igual ao diâmetro do floco provocariam a máxima velocidade relativa e a máxima tensão de cisalhamento [PARKER et alii, 1972].

A tensão de cisalhamento aumenta com a escala do turbilhão ou diâmetro da partícula. Como consequência, haverá um tamanho máximo estável do floco, no qual as tensões máximas a ele impostas igualarão a força de cisalhamento da superfície. Um floco de tamanho maior que o máximo tornar-se-á metaestável e suscetível à erosão de superfície, porque a máxima tensão por ele experimentada excederá a força de cisalhamento das ligações do polímero, ligando a partícula à superfície do floco.

Várias forças agem em uma partícula em suspensão, resultante das diferenças nas propriedades físicas entre o floco e o líquido circundante. As diferenças podem ocorrer em densidade, compressibilidade e deformabilidade. As forças associadas com essas diferenças são as forças de inércia, pressão hidrostática e tensão de superfície. Como os flocos são compostos na sua maior

parte de água, a sua estrutura é altamente porosa; assim, as diferenças em densidade e deformabilidade são os principais fatores que causam a ruptura do floco.

Quatro mecanismos têm sido propostos na literatura para explicar a desagregação do floco [GLASGOW & LUECKE, 1980; PETENATE, 1982; TWINEHAM et alii, 1984].

1. deformação e ruptura resultante de variação de pressão hidrodinâmica
2. erosão de partículas primárias por cisalhamento
3. fragmentação por colisão
4. fragmentação por cisalhamento

Nem todos esses mecanismos são plausíveis para as diferentes estruturas de flocos. Entretanto, associações físicas de partículas coloidais podem ser suscetíveis à erosão de partículas primárias, deformação dinâmica e ruptura. Por outro lado, agregados caracterizados por numerosas ligações interpartículas (pontes macromoleculares) devem ser muito mais resistentes à pressão dinâmica e mecanismos de erosão de partículas primárias.

A floculação em regime turbulento e ruptura têm sido estudadas por diversos autores. ARGAMAN & KAUFMAN [1970] apresentaram um modelo para floculação turbulenta baseado na hipótese de que o movimento aleatório de partículas em um fluido pode ser caracterizado por um coeficiente de difusão. O coeficiente de difusão foi expresso em termos do espectro de energia do campo turbulento, sendo empregado no desenvolvimento de uma equação para floculação em reatores contínuos. Esses autores sugeriram que o fator

principal de quebra de flocos era a erosão de partículas primárias por arraste turbulento. Propuseram que a taxa de erosão das partículas primárias deveria ser proporcional à área superficial do floco, cisalhamento da superfície, tamanho das partículas primárias e flutuações médias de velocidade.

PARKER et alii [1972], utilizando balanço de forças que agem sobre o floco, desenvolveram equações para o seu tamanho máximo estável e também para a taxa de erosão. Através de exames microscópicos do floco, os autores constataram a existência de uma rede filamentosa que se ligava à superfície da partícula. A quebra do filamento, resultando em dois fragmentos de flocos, foi estudada.

HINZE [1955] coloca que glóbulos de fluido podem dividir-se, devido a forças hidrodinâmicas, em diferentes maneiras, dependendo do escoamento a seu redor. Forças de deformação e quebra foram descritas por dois números adimensionais.

TAMBO & HOZUMI [1979] desenvolveram métodos teóricos e experimentais para avaliar o tamanho máximo do floco sob condições de agitação intensa. Para flocos de argila-alumínio o diâmetro máximo do floco diminui com o aumento da taxa de agitação. A adição de polímero, no entanto, aumenta consideravelmente a força do floco. Os dados mostraram que, a uma dada intensidade de agitação, o diâmetro máximo do floco aumenta linearmente com o aumento da dosagem do polímero.

MOLAG [1980] cita que o máximo diâmetro estável do floco é determinado pela taxa máxima de dissipação de energia que

ocorre perto do agitador. O sistema líquido-líquido investigado (benzeno/tetracloro de carbono como fase dispersa e água como fase contínua) mostrou que para diâmetros não muito grandes, as gotas do sistema agitado quebram em duas partes iguais. Funções que expressam a quebra das gotas também foram estudadas.

Em sistemas coagulantes por polímeros, onde a aglomeração resulta primariamente por pontes de polímeros, são formados flocos elásticos e mutuamente adesivos. A desagregação, no entanto, é um fenômeno crítico, desde que as pontes possivelmente não podem ser reformadas [GLASGOW & LUECKE, 1980; PELTON, 1981; SMITH & KITCHENER, 1978]. Quando a desagregação ocorre nesses sistemas, os segmentos livres de polímero tendem a ocupar superfícies de adsorção na mesma partícula. Dessa maneira, não somente há uma deficiência de superfícies de adsorção, como também a extensão restante das macromoléculas não é suficiente para ligar outras partículas. PELTON [1981], estudando um sistema de esferas monodispersas, cita que a floculação diminui com o tempo. Toda vez que uma esfera desorve da superfície de uma outra maior, uma fração da área não mais participa de ligações. Assim, quanto mais partículas se desprendem, uma fração maior da área total não participa de formação de ligações. Esse processo, talvez, envolva a quebra da ponte de polímero, deixando fragmentos em ambas as partículas ou, talvez, a transferência de uma molécula de polímero para a partícula de menor superfície. Isso estabilizaria a parte da superfície envolvida da pequena partícula, bem como destruiria a camada de polímero da esfera maior. Equações diferenciais foram

deduzidas, levando-se em conta parâmetros de agregação e desagregação de partículas.

A agregação das partículas começa a uma taxa controlada por colisões entre elas até atingir um estado quase-estacionário, no qual a taxa de crescimento se iguala à taxa de quebra, ao menos, por curtos períodos de tempo. A força do floco é, então, dada pelo tamanho médio do floco que persiste em uma suspensão agitada [PELTON, 1981; SMITH & KITCHENER, 1978]. FAIR & GEMMEL [1964] desenvolveram um modelo matemático para crescimento de flocos; impondo vários limites superiores para o tamanho de partícula e mecanismos de quebra de flocos baseados na equação de Smoluchowski, em um campo de cisalhamento laminar. Soluções dadas por computador indicaram que o crescimento da partícula aproximava-se de um estado estacionário independente do produto do gradiente médio de velocidade e tamanho da partícula, uma vez fixados o volume máximo da partícula e o mecanismo de quebra. A taxa de crescimento da partícula tornou-se oscilatória, à medida que o produto do gradiente médio de velocidade pelo número de partículas foi aumentado, provavelmente devido ao aumento na taxa de quebra e reforma de agregados.

O efeito do tempo é significativo no processo de crescimento e aumento da força de ligação dos flocos. Durante os períodos iniciais de agitação, os flocos podem sofrer dissociação devido à força de cisalhamento, pois, são estruturas frouxas. Os agregados tornam-se, então, mais resistentes à dissociação, à medida que o tempo de agitação aumenta, possivelmente, devido ao

rearranjo do polímero ou partículas dentro da estrutura do agregado [BLACK et alii, 1965]. SMITH & KITCHENER [1978] notaram que a força de adesão das partículas aumenta de 50 a 100% com o aumento do tempo de agitação. No entanto, quando os flocos foram deixados por 24 horas sob agitação, eles rapidamente se desintegraram na mesma taxa de cisalhamento em que foram formados. Os autores sugerem dois mecanismos para explicar essas observações. O aumento de ligações da molécula do polímero com o tempo, leva a uma maior cobertura da superfície e maior probabilidade de quebra da molécula do polímero durante a ruptura do floco. Segundo, durante o envelhecimento prolongado, alguns sítios, ainda disponíveis para uma re-formação de pontes, tornam-se ocupados. Possivelmente os dois mecanismos contribuem para o fenômeno.

Para a floculação por neutralização ácida, equações têm sido propostas para descrever a ruptura de agregados. TWINEHAM et alii [1984], em estudos sobre precipitação isoelétrica de proteína de soja, concluem que o mecanismo principal de quebra de agregados se dá preferencialmente devido à colisão entre partículas do que devido à quebra por cisalhamento hidrodinâmico. Assim, a equação proposta para ruptura fica:

$$\frac{d(d)}{dt} = \frac{4}{3\pi} \phi_v G d (\alpha - \alpha') \quad (2.8)$$

$d$  - diâmetro de esferas em colisão

$\phi_v$  - fração de volume de partículas precipitadas ( $= \frac{\pi}{6} N d^3$ )

$G$  - gradiente de velocidade média

$\alpha$  - fator empírico de efetividade de colisão

$\alpha'$  - fator empírico de efetividade de colisão promovendo a quebra do floco

## Precipitação e Recuperação de Proteínas

A precipitação de proteínas e sua recuperação da solução representam uma das mais importantes operações na recuperação e purificação de proteínas em escala de laboratório e industrial. Essas proteínas incluem proteínas vegetais, proteínas de plasma humano e animal e enzimas para aplicações analíticas e industriais.

A estrutura das proteínas é de grande importância no entendimento da função dos reagentes no processo de precipitação. Proteínas de interesse prático são misturas geralmente complexas e muitos dos componentes têm propriedades similares com respeito à precipitação. Quando o objetivo é a purificação de um dado componente e sua recuperação, precipitação fracionada é necessária.

Precipitação e recuperação de proteínas são processos que têm grande similaridade com coagulação e floculação de partículas coloidais.

### Química de proteínas

As proteínas podem ser caracterizadas como polímeros anfóteros com grande número não uniforme de grupos tituláveis. A interação entre esses grupos localizados na superfície, a proximidade dos resíduos hidrofóbicos, a presença de pontes de hidrogênio, tornam a previsão de propriedades de uma molécula de proteína um assunto complexo. As proteínas adquirem suas cargas principalmente através de ionização dos grupos carboxila e amino, formando  $\text{COO}^-$  e

$\text{NH}_3^+$ . A ionização desses grupos e, portanto, a carga elétrica total, depende em grau acentuado do pH da solução.

Como visto anteriormente, uma carga total negativa de uma molécula de proteína suspensa em um eletrólito atrai ions positivos da solução para formar uma camada (Stern) de contra-ions próxima à superfície da partícula. É essa camada que controla a aproximação das espécies que se agregarão à molécula de proteína. A camada de Stern indiretamente controla a estabilidade do colóide pelo controle do tamanho e magnitude das camadas difusas [BELL et alii, 1982].

A posição e estrutura da camada de Stern pode ser significativamente alterada pela presença de polímeros adsorvidos. Geralmente, se os polímeros adsorvem à superfície proteica, eles o farão em vários pontos, resultando em uma espécie fortemente ligada, que não desorverá com a diluição. O polímero adsorvido se estenderá por uma distância considerável, desde a superfície molecular, devido à presença de emaranhados, provocando uma barreira à agregação e, para alguns eletrólitos, um aumento na força de repulsão, devido a interações elétricas. Polímeros carregados ou não afetam: a camada de Stern, reduzindo a intensidade da carga; a camada difusa, devido ao rearranjo dos contra-ions, e o potencial zeta, devido à alteração do plano de cisalhamento entre a partícula e a solução.

Proteínas podem ter seus pontos isoelétricos em uma faixa de pH de 1 a 12, mas para muitas delas, como, por exemplo, soja, caseína, algumas albuminas, essa faixa é reduzida para pH de

4 a 6. Assim, em seu ambiente natural, essas proteínas tendem a ter uma carga global negativa.

As moléculas de proteínas não podem ser tratadas simplesmente como colóides hidrofóbicos. Elas são hidrofílicas, considerando-se que estão associadas com, até três vezes, o seu próprio peso em água. A água fracamente ligada forma uma barreira à agregação. Dez a cem camadas de água rodeiam a molécula de proteína provavelmente ligadas às cadeias iônicas laterais [BELL et alii, 1982].

#### Aspectos físico-químicos da precipitação de proteínas

Os métodos pelos quais as proteínas são precipitadas podem ser descritos, resumidamente, como [BELL et alii, 1982]:

1. A adição de altas concentrações de sais neutros geralmente diminui a solubilidade da proteína. Esse efeito é conhecido como dessalinização.
2. A ionização dos grupos ácidos e básicos da cadeia lateral é fortemente influenciada pelo pH. A solubilidade é uma função da carga líquida desses grupos e as proteínas têm carga zero no ponto isoelétrico, onde precipitam da solução (proteínas do soro, que são proteínas globulares de peso molecular de 16000 a 5 000 000, são solúveis a qualquer pH [MORR, 1974]).
3. Se a constante dielétrica do meio aquoso é diminuída, como, por exemplo, pela adição de solventes orgânicos tem-se a interação eletrostática entre as moléculas

de proteína, resultando na precipitação.

4. A precipitação pode ocorrer com o uso de polímeros não iônicos, provavelmente devido a uma redução na água disponível para sua solvatação.
5. Um grande número de polieletrólitos é capaz de precipitar proteínas, funcionando como agentes floculantes sob condições apropriadas de pH.
6. Muitos ions polivalentes interagem com as proteínas. Esses ions são vantajosos quando se deseja a reversibilidade do processo.

Muitos fatores afetam a escolha do método de precipitação e emprego de agentes precipitantes. Deve-se observar a estabilidade estrutural da proteína, pois, muitas substâncias usadas podem causar desnaturação. Muitos reagentes apresentam outras propriedades, como inflamabilidade, formação de produtos secundários, trazendo, assim, restrições operacionais. A obtenção de um produto final comercialmente viável e aceitável é outro fator que limita grandemente a escolha do agente precipitante.

#### Recuperação com polímeros

A precipitação de proteínas com outros polímeros tem recebido crescente interesse. Esse método apresenta grande vantagem, pois, envolve técnicas mais simples e grandes porcentagens de recuperação [HILL & ZADOW, 1978b]. A precipitação geralmente ocorre em concentrações de polímeros menores que 20% e o precipitante pode ser adicionado como uma solução aquosa e à temperatura ambiente

[BELL et alii, 1982].

A recuperação de proteínas de soro por polímeros iônicos e não iônicos tem sido amplamente estudada. HIDALGO et alii [1973] sob condições ótimas (pH 3), recuperaram 90% das proteínas do soro, adicionando 0,1 e 0,7% de hexametáfosfato de sódio (HMP) ao soro ácido e doce, respectivamente. A recuperação foi melhorada, demineralizando-se o soro previamente à precipitação. A concentração de HMP residual foi reduzida por troca iônica ou filtração em gel. O produto final continha apenas 9,9% de HMP residual, 88,3% de proteína e 1,8% de lactose. JONES et alii [1972] conseguiram 95% de recuperação, utilizando ferripolifosfato. No entanto, o isolado continha 39% de fosfato e 5% de cálcio.

HIDALGO & HANSEN [1969]; HILL & ZADOW [1974]; ROBINSON & TAMINE [1978] mostram que hidrocolóides carregados negativamente, como carboximetilcelulose, celulose sulfatada, carrageenan, formam complexos iônicos com  $\beta$ -lactoglobulina, que podem ser isolados da solução por precipitação isoelétrica. A reação com carboximetilcelulose (CMC) é sensível ao pH e força iônica. Peptização e solubilidade do complexo ocorrem, se quantidades de CMC maiores que a estequiométrica forem utilizadas.

HANSEN et alii [1971] usaram CMC para obter uma fração ácida (precipitada a pH 3,2), contendo mais de 90% das proteínas do soro e, subsequentemente, uma fração alcalina (precipitada a pH 7,5 - 8,0), contendo a maior parte da proteose-peptona. A primeira fração continha 63% de proteína, 30% de CMC e 1,5% de cinzas. A segunda fração não foi considerada utilizável, pois continha 54%

de cinzas.

HILL & ZADOW [1974] estudaram a complexação de proteínas do soro com CMC de diferentes graus de substituição. A eficiência de precipitação aumentou com o aumento no grau de substituição da CMC. O pH de máxima eficiência de precipitação independe do grau de substituição e da relação CMC:soro e encontra-se na faixa 3,2 a 3,6. A quantidade ótima de CMC requerida para a precipitação aumentou com o aumento do grau de substituição. Sob condições ótimas praticamente toda a CMC encontrava-se no precipitado. Com CMC de grau de substituição 1,47, 93% da proteína foram precipitados de soro não diluído e mais que 78% foram precipitados, quando a força iônica foi aumentada de 0,1.

HIDALGO & HANSEN [1969] obtiveram resultados que contrastam com HILL & ZADOW [1974]. Os primeiros autores dão altos valores para a eficiência de recuperação a baixos graus de substituição da CMC. Por outro lado, a razão ótima de CMC para  $\beta$ -lactoglobulina requerida para máxima eficiência de precipitação decresceu abruptamente com o aumento do grau de substituição. Os resultados concordam, em quantidade de proteína presente no complexo, com os diferentes graus de substituição utilizados.

Os procedimentos para recuperação da proteína colocados acima são geralmente limitados por vários fatores. A diluição do soro para que se alcance a força iônica necessária à precipitação ótima encarece o custo do equipamento e aumenta a demanda de água. Outro fator é a dificuldade da separação da proteína do complexo precipitado e a conseqüente comercialização do produto como uma

mistura CMC-proteína. Por último, o custo da CMC é maior que o retorno esperado das proteínas do soro. Assim, a porcentagem de CMC no produto aumenta o custo consideravelmente [HANSEN et alii, 1971]

HILL & ZADOW [1978a] recuperaram as proteínas do soro por complexação com CMC a pH 3,2. O complexo foi separado, lavado e redissolvido a pH 7. A CMC foi separada da proteína como sal de cálcio. Com esse método, 10 a 70% da proteína foram precipitados com cálcio-CMC, dependendo do pH e do excesso de cálcio presente. A capacidade de ligação da proteína com a CMC decresceu com a reutilização da CMC, devido à forte ligação de ambos, a proteína e o cálcio à CMC.

A precipitação de proteínas do soro com polímeros solúveis em água foi estudada por HILL & ZADOW [1978b], sob condições apropriadas de pH e força iônica. As proteínas do soro formaram complexos insolúveis com ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, polietilenoimina e poliestireno substituído com um sal de amônio

Cada um dos quatro polímeros formaram complexos com proteínas em soro com 50% de diluição. O pH ótimo para precipitação com CMC, ácido poliacrílico e ácido polimetacrílico foram 3,2; 2,8 e 3,0, respectivamente. Para polietilenoimina e para o sal de amônio o pH ótimo foi 9,4 e 10,4. O nível máximo de precipitação variou entre 85% para polietilenoimina e 98% para ácido polimetacrílico. Os complexos se mostraram muito estáveis à alta força iônica.

CMC modificada com substituintes de maior hidrofobicidade também foi usada para complexação das proteínas do soro [ZADOW

& HILL, 1978]. CMC contendo grupos acetil, metonil ou amida secundários de carboximetil com cadeias laterais de isopropil, isobutil, n-butil e ciclohexil apresentaram maior eficiência de precipitação de proteínas que CMC contendo um número similar de grupos carboxil. O efeito da introdução de grupos hidrofóbicos em CMC foi mais pronunciado nos últimos, ou seja, em CMC contendo grupos amida secundários. A introdução de grupos hidrofóbicos atinge dois objetivos: o complexo CMC-proteína formado é menos hidrofílico que aquele formado por CMC não modificada, resultando em um precipitado menos volumoso, com menor conteúdo de água e, também, mais estável em condições de alta força iônica, precipitando as proteínas do soro mais eficientemente. A eficiência de precipitação das proteínas do soro por derivados de celulose depende da força ácida e da natureza hidrofóbica do polímero. Um aumento na força ácida resulta em uma precipitação mais efetiva e um aumento na estabilidade, em valores altos de força iônica [HIDALGO & HANSEN, 1969]. Aumento na hidrofobicidade resulta em uma maior estabilidade do complexo formado, como constatado nos experimentos com CMC substituída com grupos amida secundários.

CERBULIS [1978] investigou o uso de bentonite e ligno-sulfonato para precipitar proteínas de soro de queijo "cottage". Quando usados separadamente ou em combinações, esses colóides precipitaram praticamente todo o nitrogênio proteico. O processo se dava em um único passo, pois a precipitação foi feita no pH do soro. Entretanto, os precipitados continham grande quantidade residual dos precipitantes, o que limitou o seu uso.

As proteínas do soro têm sido precipitadas com álcool, etanol preferencialmente, mas o precipitado contém muita cinza e pouco nitrogênio proteico é recuperado [MORR & LIN, 1979]. Sabe-se, no entanto, que a precipitação com álcool reduz o valor biológico da proteína do soro [HILL et alii, 1982].

Uso do amido como agente floculante Poucas publicações são encontradas no que se refere à floculação, empregando-se amido como principal agente floculante. Em um estudo extensivo sobre floculação, decantação e filtração de lamas fosfatadas feito por LA MER et alii [1956a,b,c; 1957a,b], verificou-se que o amido como agente floculante melhora consideravelmente a precipitação e filtração de lamas. Para esses autores o mecanismo de floculação ainda não é bem conhecido, pois partículas hidrofílicas contidas na lama são carregadas negativamente e as macromoléculas de amido são eletricamente neutras. Amido de batata foi tomado como sendo o mais efetivo, tanto na floculação como em melhora do tempo de filtração. Amidos de milho foram menos efetivos. A presença de cations que formam fosfatos insolúveis é, também, necessária para floculação completa.

A eficiência de floculação do amido de batata foi relacionada ac seu conteúdo de fosfato. É postulado que as moléculas de amido, adsorvidas em diferentes partículas sólidas através dos grupos  $\text{OH}^-$  da parte carboxílica (provavelmente por pontes de hidrogênio), são ligadas em um emaranhado tridimensional através da parte fosfatada das moléculas de amido por cations, como  $\text{Ca}^{++}$ ,

que formam fosfatos insolúveis. Experimentos anteriores mostraram que amido de milho e outros amidos que não continham fosfato eram ineficientes na floculação da lama em discussão.

CAMPOS et alii [1984] estudaram a eficiência de amido de diversas fontes naturais, quando empregado como auxiliar de floculação para águas de abastecimento. As conclusões deste estudo foram muito interessantes, demonstrando que existe a possibilidade de se empregar amido como auxiliar de floculação para águas de abastecimento, sob condições que o colocam em posição de competir em determinadas situações, com polímeros sintéticos de grande cadeia molecular usados para o mesmo fim.

Foram realizados ensaios de floculação empregando-se amido de milho, batata, araruta, cará e mandioca, com amostras de quatro grupos distintos de água, apresentando diferentes valores de cor, pH, turbidez e alcalinidade. Os autores verificaram que é possível a redução dos coagulantes primários, sulfato de alumínio e cal, em até 20% com bons resultados. Foram empregados amido pré-gelatinizado a frio (através da utilização de hidróxido de sódio) e amido pré-gelatinizado a quente (através de aquecimento da dispersão aquosa). As eficiências de floculação variam com o tipo de amido, procedimento seguido para se obter a gelatinização e características da água residuária. Amidos de cará e araruta mostraram-se os mais eficientes. Com relação à água, a eficiência está muito mais relacionada com os valores de turbidez do que com os valores de alcalinidade.

O gradiente de velocidade ótimo para floculação

empregando-se amido como auxiliar é aproximadamente igual ao gradiente ótimo para floculação, quando são utilizados apenas sulfato de alumínio e cal [CAMPOS et alii, 1984]. Isso permite concluir que em estações de tratamento de água não há necessidade de se efetuar qualquer alteração nos valores dos gradientes de velocidade, caso se deseje empregar o amido como auxiliar de floculação.

### 3. CINÉTICA E PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

A cinética de precipitação de proteínas tem sido estudada em reatores tubular e de mistura. Os parâmetros cinéticos para precipitação isoelétrica de proteínas de soja em reator contínuo de mistura ideal foram tomados por GRABENBAUER & GLATZ [1981]. HOARE [1982a, 1983] estudou a precipitação de caseína por dessalinização em reator contínuo de mistura ideal com agitador de hélice. BELL & DUNNILL [1982] estudaram a estabilidade de agregados em reator contínuo de mistura ideal. A cinética de crescimento e quebra de agregados de proteína de soja produzidos em um reator de mistura ideal foi estudada por PETENATE [1982].

A seleção do tipo de reator a ser usado dependerá da cinética da reação e dos requisitos particulares de cada sistema. Com reações de rápida precipitação o uso de reatores tubulares é vantajoso. Em sistemas contínuos de floculação, "backmixing" ou recirculação podem ser usados para que se mantenham as dimensões do equipamento a um mínimo [BELL et alii, 1982; STEVENSON, 1972].

Deve-se, também, observar as condições para que se tenha um agregado de tamanho e força máximos, como por exemplo: as condições de mistura, para que se garanta uma mínima quebra do floco, mantida a mistura do sistema; a taxa de cisalhamento deve ser controlada após a nucleação para se promover o crescimento ortocinético controlado; envelhecimento do agregado o tempo suficiente para maximizar-se a sua força; exposição a taxas de cisalhamento

excessivas devem ser minimizadas, evitando-se bombeamento da suspensão, alimentação de centrífugas, etc. [BELL et alii, 1982; HOARE et alii, 1982].

Em resumo, para descrição do processo de floculação das proteínas do soro com amido é necessária uma descrição da influência das variáveis de processo nas taxas de nucleação, crescimento e ruptura dos agregados.

### Nucleação

O aparecimento de núcleos, ou seja, a formação de partículas de dimensões próximas a uma partícula primária e que são pontos de partida para a agregação de novas partículas é ditada pela alteração da carga superficial das proteínas, movimento browniano das partículas e concentração. Um aumento nesta última influi diretamente no tamanho das partículas primárias e afeta em menor proporção o tamanho dos núcleos formados [NELSON & GLATZ, 1985].

A taxa de nucleação pode ser, então, expressa por:

$$N_u = K_{N_u} N_1 \quad K_{N_u} = f(\text{pH}, I, C_A, v) \quad (3.1)$$

onde  $K_{N_u}$ , constante de nucleação é função do pH (pela alteração da carga da superfície), força iônica (que influencia na sensibilidade da proteína e concentração).

pH - pH da mistura no reator

I - força iônica da mistura no reator

$C_A$  - concentração de amido no reator

- $N_u$  - taxa de nucleação  
 $N_1$  - número de núcleos formados ou partículas primárias/  
 volume  
 $v$  - velocidade de agitação

### Crescimento

À semelhança da precipitação de proteínas por neutralização ácida, o mecanismo estudado baseia-se na formação de pequenas partículas, devido à atração eletrostática com posterior crescimento, dado a colisões com adição de partículas primárias aos agregados, que assim crescem em tamanho.

Uma mudança no tamanho do agregado devido à adição de partículas primárias, é função da eficiência de colisão entre as partículas, número de partículas primárias presentes no reator, velocidade de agitação empregada, tempo de residência. A concentração de amido no reator deve também influenciar a taxa de crescimento dos agregados,

A taxa de crescimento,  $C$ , com base nos parâmetros descritos, tem a forma:

$$C = K_o L \quad K_o = f(\alpha, N_1, v, C_A, \text{pH}, \tau) \quad (3.2)$$

onde  $L$  é o diâmetro médio do agregado formado e  $K_o$  a constante de crescimento.

- $\alpha$  - eficiência de colisão  
 $N_1$  - número de partículas primárias/volume  
 $v$  - velocidade de agitação  
 $C_A$  - concentração de amido no reator  
 $\text{pH}$  - pH da mistura no reator  
 $\tau$  - tempo de residência

## Ruptura

Para o processo de ruptura de agregados, PETENATE [1982] define uma propriedade  $\sigma$ , tensão limite. Esta resistência da partícula resulta do balanço entre as forças responsáveis pela estrutura dos agregados. Um agregado se quebra quando as forças de ruptura (do fluido), agindo sobre ele, excedem à tensão limite. Pode-se, então, definir a quantidade adimensional (número de força):

$$N_{\text{força}} = \frac{\text{forças agindo sobre o agregado}}{\text{forças de ligação do agregado}}$$

A taxa de ruptura deve ser determinada pela quantidade  $N_{\text{força}}$ , frequência do aparecimento de  $N_{\text{força}}$  maior que a unidade e concentração de agregados. Então, [PETENATE & GLATZ, 1983b],

$$R = K_r N (N_{\text{força}})^{\delta} \quad (3.3)$$

$R$  - taxa de ruptura

$K_r$  - constante de ruptura

$N$  - concentração de partículas/volume

$\delta$  - parâmetro de ruptura

Considerando que as forças de ligação do agregado sejam inversamente proporcionais ao volume do floco e diretamente proporcionais ao tempo de residência, a equação (3.3) pode ser modificada:

$$R = K_r L^{\delta'} \quad K_r = f(\alpha, N_1, v, C_A, \text{pH}, \sigma, \tau) \quad (3.4)$$

onde  $L$  é o diâmetro médio do agregado sujeito a ruptura e  $\delta'$  o parâmetro de ruptura.

$\alpha$  - eficiência de colisão

$N_1$  - número de partículas primárias/volume

$v$  - velocidade de agitação

$C_A$  - concentração de amido no reator

pH - pH da mistura no reator

$\sigma$  - tensão limite

$\tau$  - tempo de residência

As equações (3.1), (3.2) e (3.4) sugerem que um estudo do processo de floculação das proteínas do soro pelo amido envolve tanto as características físico-químicas do sistema, quanto as características de escoamento do meio no qual se processa a reação. Assim, para a floculação de proteínas e sólidos do soro de queijo, deve-se notar características, como a presença de grupos iônicos na molécula do amido, influência do pH, solubilidade e grau de substituição do agente precipitante, para que se desencadeie a parte iônica do processo. Segue-se, então, a reação de adsorção na qual, através do controle de variáveis, como força iônica, velocidade de agitação, tempo de residência, pode-se otimizar o tamanho e a resistência a tensões hidrodinâmicas dos flocos. As características de escoamento foram mantidas sob controle, através de um equipamento que vem sendo utilizado com sucesso no estudo da precipitação de proteínas [GRABENBAUER & GLATZ, 1981].

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### Obtenção do Soro de Queijo

###### Preparo do queijo Minas tipo frescal

O leite Shefa, tipo B, pasteurizado, proveniente da Usina de Beneficiamento Agro-Pecuária Tuiuti Ltda., Amparo, São Paulo, foi aquecido até à temperatura de 38°C. O coalho (Coalho Líquido Estrela, fabricado por Ha-La do Brasil, Chr Hansen Indústria e Comércio Ltda.) foi adicionado, seguindo-se as medidas indicadas pelo fabricante. O leite foi, então, agitado com o uso de uma bague-ta de vidro por dois minutos para se garantir a mistura. A partir daí, deixou-se a mistura descansar à temperatura ambiente (27°-30°C), evitando-se qualquer agitação ou distúrbios mecânicos no leite. O corte do queijo foi feito 45 minutos após a adição do coalho e a mexedura iniciada 2 minutos após o corte.

Deixou-se descansar por 10 minutos e iniciou-se a dessoragem, feita em formas providas de pano dessorador e tampas. O queijo não foi prensado, nada foi adicionado à massa, sal ou qualquer cultura até a separação do soro. O soro foi escoado e coletado para uso nos experimentos de floculação.

## Caracterização do Soro de Queijo

### Gordura

As análises de gordura foram feitas pelo método de Gerber [SÁTIRO, 1982]. As leituras da porcentagem de gordura nas amostras foram feitas em butirômetros de leite.

### Proteína

Método do biureto O método do biureto para quantificação de proteínas foi usado segundo COLLOWICK & KAPLAN [1957]. A curva padrão para o reagente do biureto foi feita usando-se soluções de concentrações conhecidas de BSA (proteína de soro bovino). A concentração de proteína no sobrenadante foi quantificada, lendo-se a transmitância em espectrofotômetro Bausch Lomb - Spectronic 20, a 540 nm e reportando-se à curva padrão do reagente.

Método micro-Kjeldahl Determinou-se o teor de nitrogênio total no soro de queijo pelo método micro-Kjeldahl descrito pela AOAC [1970]. No entanto, o procedimento a ser seguido, para a etapa de digestão, demandava um tempo demasiadamente longo e devido ao grande número de amostras, a determinação de nitrogênio seria bastante demorada.

Pesquisas têm sido feitas na Faculdade de Engenharia de Alimentos, no Laboratório de Análise de Alimentos, pelo Prof. Dr. Carl Frederick Strong III, sobre o uso de peróxido de hidrogênio como catalisador na etapa de digestão no método micro-Kjeldahl,

O procedimento, utilizando-se de peróxido de hidrogênio, reduz grandemente o tempo gasto para digestão das amostras. Às amostras adicionou-se  $H_2SO_4$  concentrado, como descrito no procedimento da AOAC [1970]. Aqueceram-se as amostras e após resfriamento com água corrente adicionaram-se 12 ml de  $H_2O_2$  50%. Aqueceu-se novamente até a mistura ficar transparente; a partir daí seguiu-se o procedimento da AOAC [1970] para a destilação das amostras. Vários ensaios foram feitos para a determinação da quantidade de amostra necessária, do final da etapa de digestão e demais detalhes referentes às etapas de digestão e destilação. Assim, para a determinação de nitrogênio total adotou-se o procedimento descrito pela AOAC [1970], com adaptações. O fator empregado para a conversão de porcentagem de nitrogênio encontrada, em porcentagem de proteína, foi 6,38. Para a digestão e destilação das amostras utilizou-se um Digestor Ética Equipamentos Científicos S.A., e destilador de proteína.

#### Sólidos totais

A determinação de sólidos totais foi feita deixando-se as amostras de peso conhecido, em estufa a vácuo (Estufa retilínea a vácuo, Fanem, modelo 099), à temperatura de 35°C, até peso constante. As amostras foram resfriadas em dessecador, antes da pesagem em balança analítica (balança Mettler H34, capacidade máxima 160g, precisão 0,0001g). A porcentagem de resíduos foi reportada como porcentagem de sólidos totais.

## Viscosidade

As medidas de viscosidade das soluções (soluções de soro e amido; soro) foram feitas em viscosímetro Cannon-Fenske Nº 100 U 64Q, à temperatura ambiente, 22°C.

## Dispersões de Amido

As dispersões de amido empregadas para a precipitação das proteínas do soro de queijo foram preparadas com amido de milho ortofosfatado monosódico (grau de substituição 0,1), amido de milho tripolifosfatado (grau de substituição 0,01), amido puro de milho (Maizena) e amido de mandioca. Os amidos de milho fosfatados foram preparados no Laboratório de Cereais e Panificação da Faculdade de Engenharia de Alimentos. Os amidos de milho (Maizena) e mandioca são de grau comercial. As dispersões de amido de concentrações 0,1; 0,5; 2,0 e 5,0 g/l foram preparadas pela adição do polímero à água destilada, com agitação em agitador magnético (Agitador magnético Fanem, modelo 257). Às dispersões preparadas foi adicionado 0,01% (P/V) de timerosal, para que se evitasse deterioração por microorganismos, conservando-as sob refrigeração.

## Experimentos de Floculação

### Precipitação com carboximetilcelulose

As experiências foram iniciadas com a preparação do soro de queijo, por precipitação ácida e posterior precipitação das

proteínas do soro com carboximetilcelulose (CMC). Para tal, seguiu-se o procedimento descrito por HILL & ZADOW [1974].

O soro foi preparado gotejando-se HCl 5N ao leite (Shefa tipo B), aquecido à temperatura de 38°C. Depois de se ajustar o pH a 4,45 (pHmetro modelo E516 Titriskop-metrohm Herisau), a massa foi separada e o soro filtrado para remoção de partículas de caseína remanescentes.

Tentou-se escolher um papel de filtro de porosidade adequada para a filtração do soro. Devido ao alto teor de gordura, os poros do filtro se obstruíram e a operação de filtração demandou um tempo excessivo. Assim, o soro foi centrifugado a 1020g (Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC2-B), havendo separação da gordura e caseína, facilitando a filtração.

Filtrou-se o soro a vácuo, em papel faixa preta Ø15cm (Carl Schleicher & Schull - Marke Selecta), que se mostrou adequado, retendo a caseína que restava, após a separação da massa.

Ao soro, já filtrado, foi, então, adicionado igual volume de solução de CMC 3,0g/l. Assim, o soro diluído à metade, teve sua força iônica reduzida também à metade. A CMC usada era de baixa viscosidade (10 - 20 cp, solução 2% Catálogo Sigma, fev/85).

As misturas de soluções de CMC e soro tiveram o pH ajustado para 4,45; 4,0; 3,8; 3,5; 3,4 e 3,2 com HCl 1N. O soro obtido por precipitação ácida com HCl apresenta um pH na faixa 4,5 a 5,10. Cada uma das misturas foi agitada em agitador magnético por 30 min, à temperatura ambiente (27° - 30°C). Após a agitação, centrifugou-se as amostras por 15 min (Centrifugador Excelsa 2,

Fanem, mod 205N).

## Floculação das proteínas do soro com amido

### Influência do pH e concentração das dispersões de amido

Após o preparo e dessoragem do queijo Minas tipo frescal, o soro de queijo foi centrifugado a 16 320g (Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC2-B), por meia hora, à temperatura de 5°C, para separação da gordura e das partículas de caseína não retidas com a massa. O soro foi, então, filtrado em funil de vidro com papel de filtro faixa preta Ø15 cm (Carl Schleicher & Schull - Marke Selecta). Um volume de 250 ml de soro teve seu pH acertado (anteriormente à adição de solução de amido), de acordo com o pH a ser estudado em cada um dos ensaios com HCl 1N ou com NaOH 1N (pHmetro modelo E516 Titriskop - metrohm Herisau). Adicionaram-se ao soro 250 ml de solução de amido de milho ortofosfatado monossódico (amido solúvel), de concentração conhecida (0,1 g/l; 0,5 g/l; 2,0 g/l e 5,0 g/l), e o pH da mistura final sofreu pequena alteração, aproximadamente +0,35, com a adição da solução de amido. A mistura foi agitada (agitador mecânico Fanem com adaptação feita para rotação até 2000 rpm), em reator de batelada de 500 ml, por turbinas de palhetas inclinadas de 45° perpendicularmente ao eixo do agitador (Figura 2). Para que, em regime turbulento, fosse evitada a formação de vórtices e a sedimentação dos sólidos, os reatores foram providos de tubos concêntricos aletados (Figura 3). O dimensionamento do tubo concêntrico aletado e turbinas para agitação foi feito com similaridade a equipamentos industriais [GRABENBAUER & GLATZ, 1981].

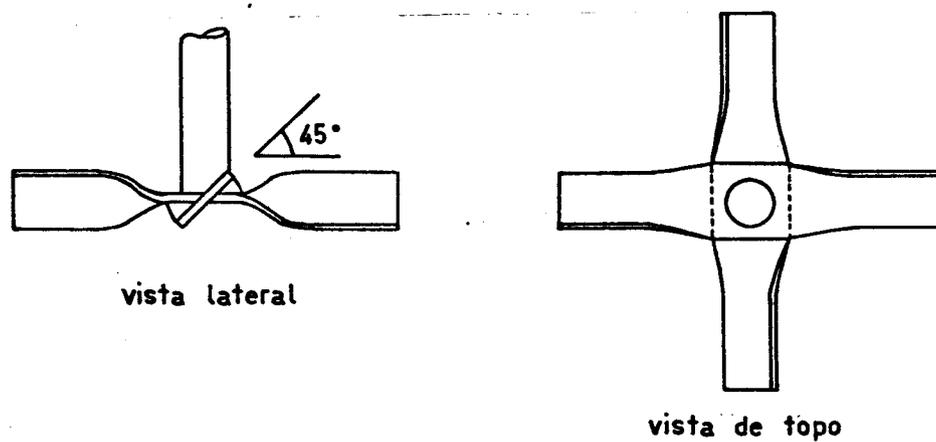


Figura 2 - Turbinas de palhetas inclinadas

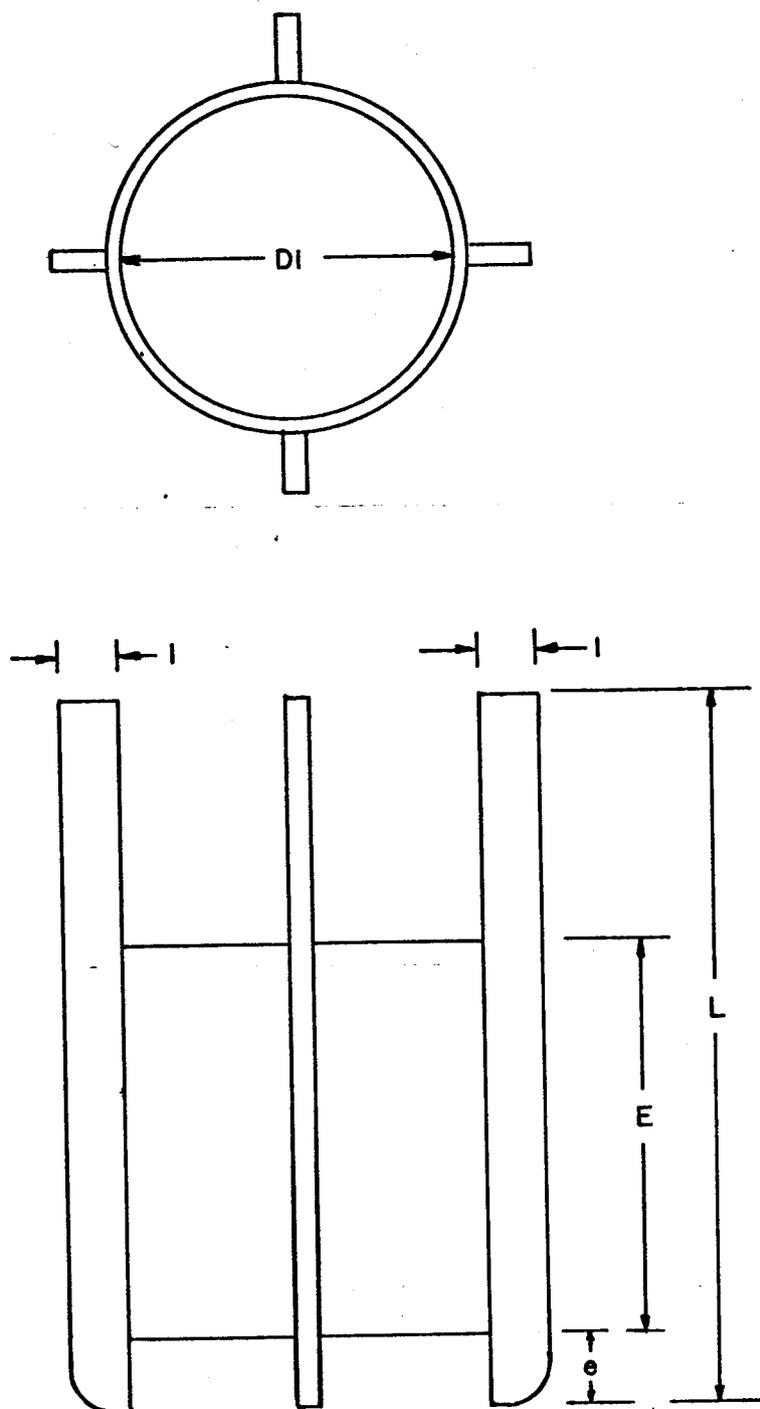


Figura 3 - Tubo concêntrico aletado

O esquema do conjunto reator, tubo aletado e turbina é mostrado na Figura 4. As dimensões do sistema são dadas na Tabela 4. O sistema foi agitado por uma hora com velocidade de agitação de 520 rpm, temperatura ambiente de 27° a 30°C. Amostras foram retiradas do reator, em agitação, com auxílio de uma pipeta graduada. Foram reservadas amostras para determinação da proteína total (3 amostras de 8 ml) e sólidos totais da mistura (4 amostras de 8 ml). As restantes (3 amostras de 8 ml) foram centrifugadas em centrífuga refrigerada MLW tipo VAC 25 a 5°C em tubos de 15 ml, por meia hora, a 5 250g. O sobrenadante foi separado do precipitado e filtrado a pressão, em suporte para filtração em membranas Millipore, com filtros de membrana de acetado de celulose de porosidade 0,2 µm (Carl Zeiss do Brasil S. A.). Procedeu-se às análises químicas do sobrenadante filtrado, precipitado e torta retida nos filtros de membranas.

O fluxograma da Figura 5 mostra as principais operações dos experimentos de floculação para o estudo da influência do pH e concentração de dispersões de amido.

#### Experimentos de filtração

Para tais experimentos, conduzidos para que se tivesse melhor idéia do tamanho de partícula formada e mecanismos envolvidos na floculação, escolheu-se a condição de trabalho: concentração da solução de amido de milho ortofosfatado monossódico: 5,0 g/l; pH do soro: 2,0. Os filtros usados tinham poros de 1,2 µm (filtros de fibra de vidro da Whatman), 0,45 µm e 0,2 µm (membranas de

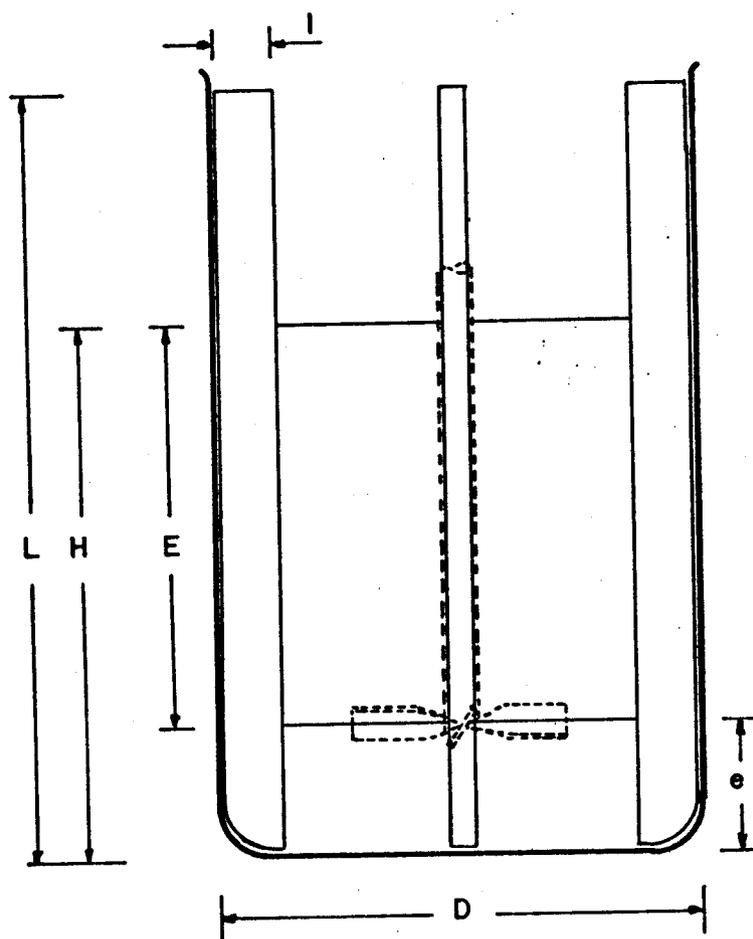


Figura 4 - Reator, tubo aletado e turbina

Tabela 4 - Dimensões dos reatores, tubos concêntricos, aletas e agitadores.

Volume do reator (v)	500 ml
Altura do reator (H)	8,5 cm
Diâmetro do reator (D)	8,6 cm
Diâmetro interno do tubo concêntrico (Di)	5,5 cm
Altura do tubo concêntrico (E)	6,3 cm
Altura da base do reator ao tubo concêntrico (e)	2,0 cm
Altura das aletas (L)	10,5 cm
Largura das aletas (l)	1,5 cm
Comprimento da hélice do agitador	3,7 cm

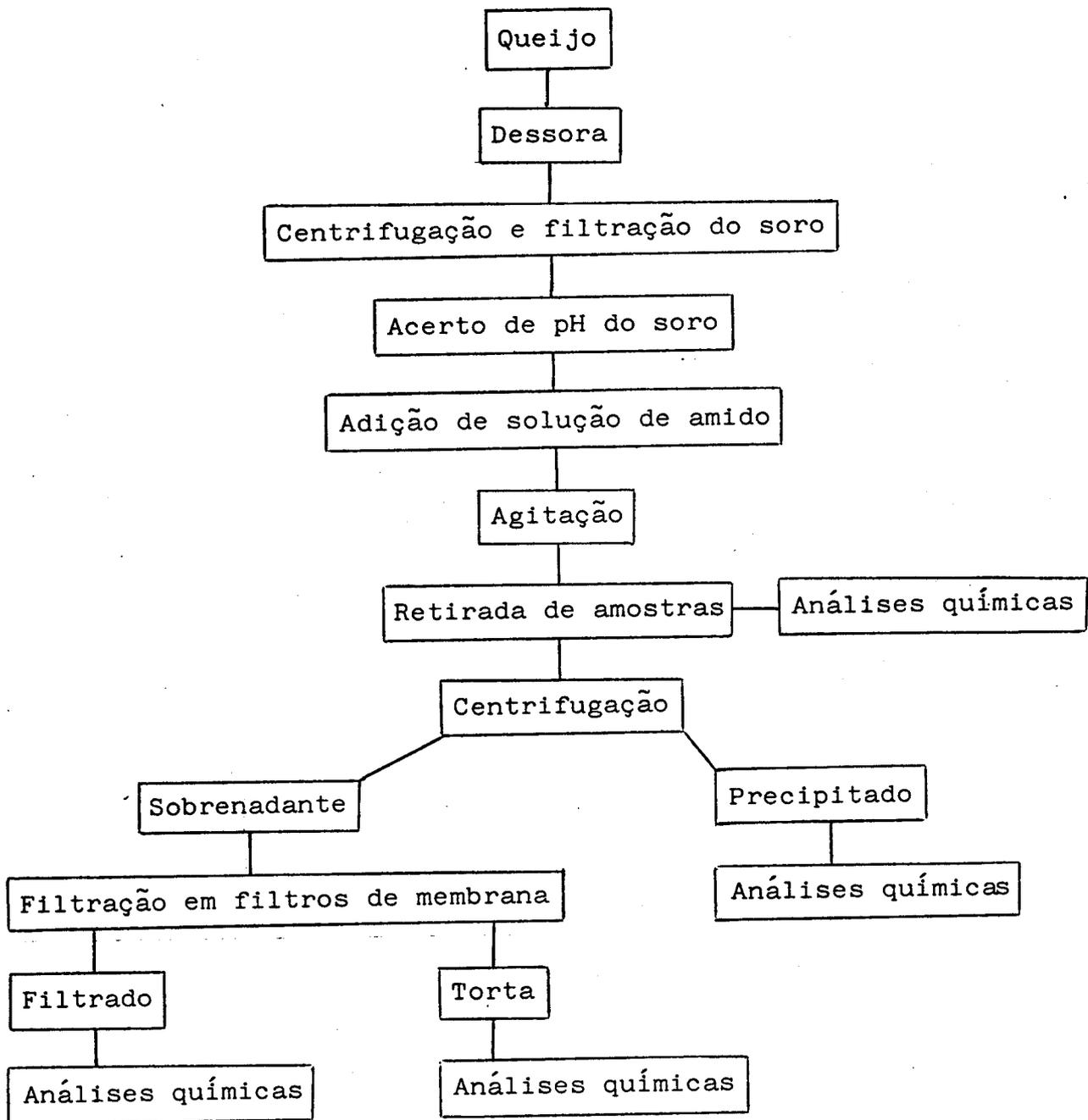


Figura 5 - Fluxograma das principais operações dos experimentos de floculação para estudo da influência do pH e concentrações de soluções de amido.

acetato de celulose Carl Zeiss do Brasil S. A.). Para se obter a massa de sólidos retidos em cada um dos filtros, foi feita análise gravimétrica do filtro e torta, como descrito no item Sólidos totais.

O procedimento seguido nos experimentos é dado no fluxograma da Figura 6. As sequências de filtração foram: 1) papel de 1,2  $\mu\text{m}$ , filtros de membrana de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e filtros de membrana de poros de 0,2  $\mu\text{m}$ ; 2) papel de 1,2  $\mu\text{m}$ , filtros de membrana de poros de 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### Eficiências de amidos de diversas fontes naturais

Para se testar a eficiência de diferentes tipos de amido na floculação das proteínas do soro, utilizou-se amido de milho ortofosfatado monossódico (amido solúvel), amido de milho tripoli-fosfatado (amido insolúvel), uma combinação entre os dois, amido puro de milho (Maizena) e amido de mandioca. O procedimento utilizado para os experimentos foi basicamente o mesmo do estudo da influência do pH do soro e concentração da dispersão de amido, com eliminação da etapa de filtração em membranas de acetato de celulose de 0,2  $\mu\text{m}$ .

O soro obtido da coagulação do leite com renina foi agitado durante dez minutos, em agitador magnético, para homogeneização da solução que continha, ainda, partículas de caseína, que não foram totalmente separadas na dessora. Tomou-se, então, 250 ml de soro, ajustando-se o pH para 2,0 com HCl 1N.

Adicionaram-se ao soro 250 ml das diferentes soluções de

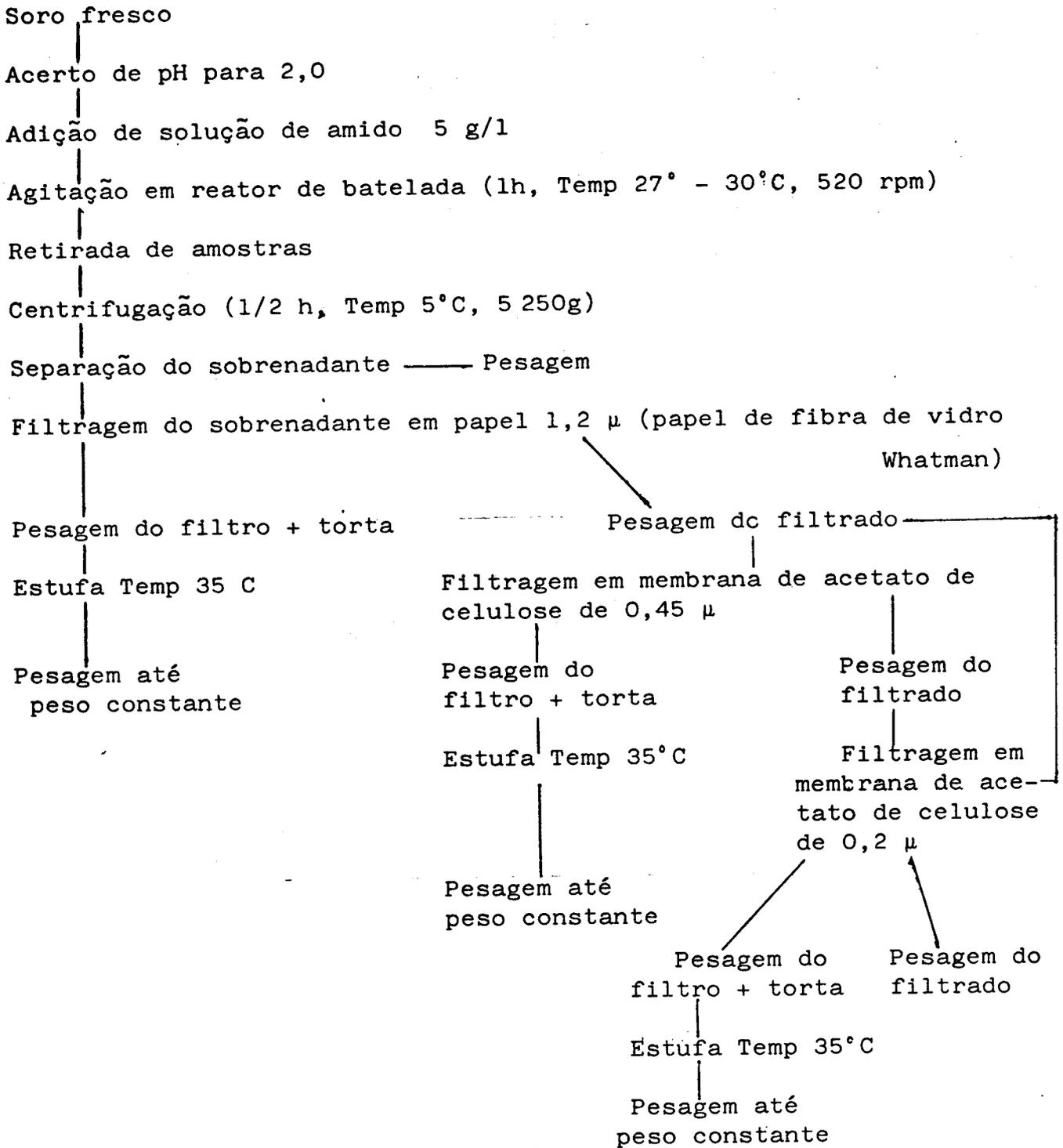


Figura 6 - Fluxograma do procedimento utilizado nos experimentos de filtração

amido. Nos experimentos em que foram utilizados amido de milho insolúvel, este foi adicionado diretamente a 250 ml de soro diluídos com 250 ml de água destilada, para que não se alterasse a força iônica em relação aos outros experimentos. Os reagentes foram misturados à temperatura ambiente (27° - 30°C).

A mistura foi agitada em reator de batelada de 500 ml (Figura 4) durante 1 h a 520 rpm, a temperatura ambiente de 27° a 30°C.

As amostras foram retiradas do reator, em agitação com auxílio de pipeta graduada. Reservaram-se amostras para determinação de proteína total (8 ml) e sólidos totais (8 ml). As restantes (8 ml) foram centrifugadas em centrífuga MLW refrigerada tipo VAC 25, a 5°C, em tubos de 15 ml, por meia hora, a 5 250g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado do precipitado, procedendo-se às análises químicas de ambas as partes.

O fluxograma da Figura 7 mostra as principais operações dos experimentos de floculação para estudo da eficiência de amido de diversas fontes naturais.

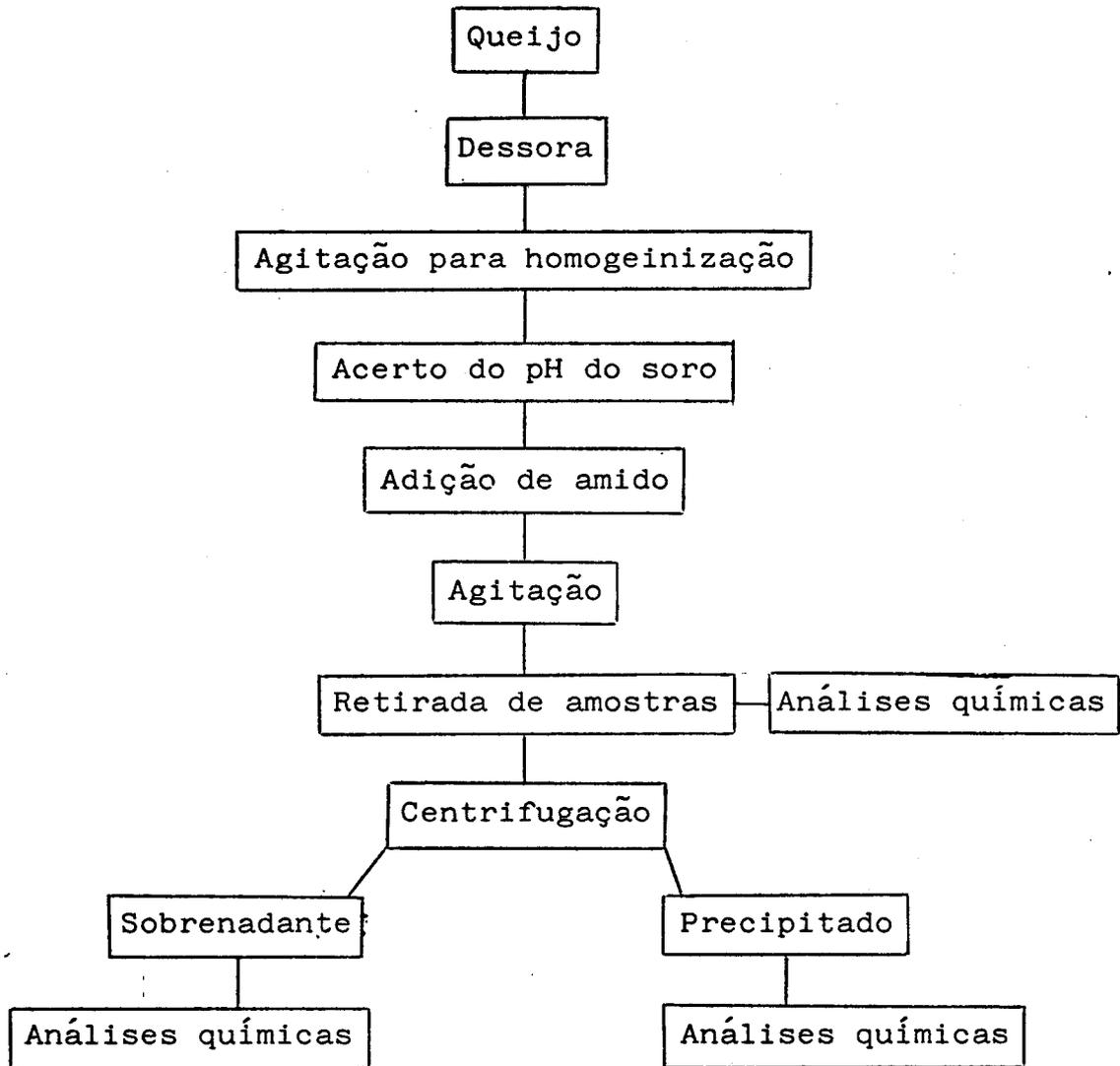


Figura 7 - Fluxograma das principais operações dos experimentos de floculação para estudo da eficiência de amido de diversas fontes naturais.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Floculação das Proteínas do Soro

Os ensaios preliminares de floculação foram feitos com carboximetilcelulose (CMC). Para tal, seguiu-se o procedimento descrito por HILL & ZADOW [1974]. Com uma solução de CMC, em água, de concentração 3,0 g/l observou-se visualmente maior formação de precipitado a um pH 3,4. Estes resultados estão de acordo com os observados por HILL & ZADOW [1974], que citam uma concentração ótima de CMC de 3,27 g/l e pH ótimo de precipitação na faixa 3,2 - 3,6. Soluções de concentrações diferentes foram utilizadas (acima e abaixo de 3,0 g/l), com eficiências de recuperação menores.

Para os experimentos de floculação feitos, com dispersões de amido como agente precipitante, tentou-se, primeiramente, remover o máximo possível de gordura presente no soro. Embora a maior parte da gordura do leite tenha ficado retida no queijo, aquela presente no soro chegou a influir no procedimento de maneira significativa. O soro, conforme resultados obtidos pelo método de Gerber [SÁTIRO, 1982], apresentou um teor de gordura de 0,4%. A gordura presente interferiu principalmente na filtração das amostras centrifugadas, para análise de proteína recuperada e na visualização do precipitado ao microscópio.

Tentou-se a centrifugação e a centrifugação seguida de filtração em uma variedade de meios filtrantes para eliminação da

gordura do soro. A filtração a vácuo mostrou-se pouco eficiente, havendo necessidade de constante troca de filtros. A filtração do soro a baixas temperaturas, o que torna os glóbulos de gordura mais sólidos, entupindo menos os poros do filtro, apresentou baixas taxas de filtração, tornando o processo extremamente demorado e ineficiente. Assim, para a filtração do soro a vácuo e a baixa temperatura ( $\sim 5^{\circ}\text{C}$ ) os papéis de filtro usados: papel de filtro comum faixa preta, papel de fibra de vidro da Whatman e filtros de membrana de acetato de celulose de diâmetro de poros variando de  $0,2\ \mu\text{m}$  a  $1,2\ \mu\text{m}$ , mostraram-se ineficientes.

No procedimento adotado, para estudo da eficiência de amidos de diversas fontes naturais, eliminou-se, dado às dificuldades experimentais, a etapa de filtração do soro anteriormente à adição de amido, já que pequena quantidade adicional de gordura era retirada com a adição da etapa de filtração após a centrifugação.

A determinação de proteína na mistura de soro e dispersão de amido, contida no reator, e no sobrenadante, para cálculo da eficiência de recuperação, havia sido feita preliminarmente pelo método do biureto. O método do biureto pareceu, pela sua simplicidade e rapidez e, também, devido ao grande número de amostras, adequado para a quantificação de proteína. Verificou-se, no entanto, não ser esse método apropriado para a determinação de proteína em subprodutos de leite (veja Apêndice A).

pH e concentração das dispersões de amido na floculação das proteínas do soro

Os dados obtidos para o estudo do pH e concentração de dispersões de amido usadas são apresentados na Tabela 5. Observa-se que, das condições analisadas, a máxima eficiência de recuperação deu-se a uma concentração da solução de amido de milho solúvel (ortofosfatado monossódico) de 5,0 g/l e a um pH da mistura igual a 2,0. As quantidades de proteína precipitada calculadas através do balanço material [= proteína total na amostra (método de Kjeldahl)-proteína total no sobrenadante (método de Kjeldahl)] e aquelas determinadas pela análise (método de Kjeldahl) do precipitado, apresentaram grandes discrepâncias. Muitos fatores podem ter contribuído para a diferença entre os dois resultados. Na determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, manuseou-se quantidades de amostra muito pequenas, as quais, após serem retiradas do reator, passaram pelas diversas etapas do procedimento, que exigiram sua transferência de um recipiente a outro, como filtração em membranas de acetato de celulose, transferência do precipitado para os balões de Kjeldahl. Nesta, pelo máximo cuidado que se tivesse, pode ter havido perdas, o que se nota pela tabela, onde os valores de P são menores que os de BM. Os valores obtidos para BM envolvem duas análises pelo método de Kjeldahl, acarretando maior erro, muito embora tenham sido usadas amostras de maior tamanho na alimentação e sobrenadante, comparadas com aquelas usadas na análise do precipitado. No entanto, a tendência seguida, para a porcentagem de proteína recuperada, é a mesma para ambas as

Tabela 5 - Eficiência de precipitação, variando-se a concentração da dispersão de amido usada e o pH do soro de queijo.

C <sub>A</sub>	pH	% de proteína recuperada	
		BM	P
0,1	2,0	0,98	0,67
	5,0	9,09	0,70
	12,0	7,28	3,02
0,5	2,0	12,9	6,44
	5,0	3,44	0,83
2,0	2,0	21,9	15,2
5,0	2,0	31,8	21,7
5,0	2,0	-	18,9

C<sub>A</sub> - concentração da dispersão de amido de milho solúvel (g/l)

pH - pH a que foi ajustado o soro

BM - % de proteína recuperada, calculada através de balanço material [(= proteína total na amostra (método de Kjeldahl) - proteína total no sobrenadante (método de Kjeldahl)/proteína total na amostra]

P - % de proteína recuperada, determinada pela quantidade de proteína precipitada (método de Kjeldahl), tomando-se a quantidade de proteína contida no soro como conteúdo total (método de Kjeldahl)

quantidades BM e P, à exceção da  $C_A = 0,1$  g/l. Não foram tomados dados de eficiência de recuperação de proteína em pH 2,0 sem adição de dispersão de amido, uma vez que as proteínas do soro são solúveis em toda faixa de pH. Mudanças nessa propriedade é indicativo de desnaturação das proteínas [MORR, 1974]. A separação de proteínas do soro com retenção de suas propriedades nativas requer o uso de precipitantes químicos e/ou separação por membrana.

Em relação à concentração da dispersão de amido, tentou-se trabalhar com concentrações mais elevadas; no entanto, o aumento da viscosidade das dispersões impediu uma boa mistura no reator e uma eficiente recuperação das partículas durante a centrifugação. A velocidade de agitação usada, em torno de 520 rpm, foi escolhida para se manter a turbulência no reator ( $Re_{5g} \approx 10\ 000$ , onde os sub-índices indicam a concentração da solução de amido usada na mistura do reator). Os dados de viscosidade da mistura (soro mais solução de amido) são apresentados na Tabela 6.

Para o sistema amido-proteína estudado esperava-se que dois mecanismos, o de neutralização e o de formação de pontes, ocorressem, com um maior predomínio do mecanismo de adsorção, no caso do amido insolúvel, onde os grãos, insolúveis, por possuírem a superfície carregada, reuniriam características propícias para tal. Assim, de acordo com o mecanismo de neutralização, uma maior eficiência de recuperação deveria ser obtida a pH's ácidos, pois a esses pH's as moléculas de amido estariam carregadas negativamente, atraindo moléculas de proteína que por estarem abaixo de seu ponto isoelétrico (pH 4,1 - 4,8 para  $\alpha$ -lactoalbumina e pH

5,18 para a  $\beta$ -lactoglobulina [BRUNNER, 1981]) apresentariam carga superficial positiva. Assim, para que haja floculação, supôs-se como primeira reação, que a molécula de amido fosfatado, tendo cargas negativas, pudesse atrair uma molécula de proteína com carga superficial positiva, com a formação de uma fase sólida que se precipitaria da solução.

Tabela 6. Dados de viscosidade das misturas de soro + dispersão de amido

$C_A$	$\mu \times 10^2$
0,1	1,17
0,5	1,17
2,0	1,23
5,0	1,30
10,0	1,70

$C_A$  - concentração da dispersão de amido usada na mistura soro + dispersão de amido (g/l)

$\mu$  - viscosidade da mistura soro + dispersão de amido (g/cm s)

A acidificação de soluções de proteína desestabiliza o sistema, comprimindo a camada difusa da dupla camada, como resultado da mudança de carga da superfície [PETENATE, 1982]. O potencial decresce e as partículas em solução podem aproximar-se. Esse sistema de neutralização isoelétrica, bem como a determinação da quantidade de proteínas precipitada, distribuição do tamanho de partículas, investigação do pH ótimo de precipitação isoelétrica, foi amplamente estudado em reatores tubular e de mistura [BELL &

DUNNIL, 1982; GRABENBAUER & GLATZ, 1981; PETENATE & GLATZ, 1982; VIRKAR et alii, 1982].

Acima do ponto isoelétrico das proteínas, essas, como as moléculas de amido, são carregadas negativamente, havendo pouca interação entre os dois polímeros [HOWLING, 1980; KOETS, 1936].

Uma reação ocorrendo em série à atração eletrostática, seria a adsorção de outras moléculas de proteína ao complexo amido-proteína formado, e que, por sua vez, atrairiam outras moléculas de amido, aumentando o tamanho do aglomerado.

Pelos dados apresentados na Tabela 5, com exceção das condições  $C_A$  0,1 g/l e pH 2,0, os resultados concordam com o exposto anteriormente, ou seja, a maior eficiência de recuperação se deu a um pH ácido onde moléculas de amido carregadas negativamente atraem as moléculas de proteína, que a esse pH têm carga positiva.

Não foi possível se obter dados dos três pH's para todas as concentrações estudadas. A pH 12,0, após o período de agitação no reator, a mistura de amido e soro tornava-se alaranjada e com odor muito forte. Poderia estar ocorrendo alguma reação propiciada pelo pH fortemente alcalino, mais provavelmente a reação de Maillard.

A presença de carboidratos em alimentos está intimamente ligada a reações de escurecimento. Na reação de Maillard, aminoácidos, peptídeos e proteínas condensam com o açúcar, se o meio não é muito diluído ou muito ácido, e funcionam como seus próprios catalisadores para a reação de enolização e desidratação [FENEMA, 1976; MEYER, 1975; ZADOW, 1979]. Reação competidora, que poderia

estar ocorrendo, seria a degradação alcalina devido a grupos OH redutores presentes tanto no amido (a pH 12,0), como na lactose. Tomaram-se ambas as partes separadamente, soro a pH 12,0 e dispersão de amido a pH 12,0. Somente o soro adquire a coloração alaranjada com formação de precipitado. Assim, as reações que ocorrem se devem à presença de aminoácidos e o açúcar redutor no soro.

Decidiu-se, então, estudar a influência do pH alcalino na precipitação das proteínas do soro, tomando-se para esse pH o pH 9,0. Tanto a pH 9,0 como a pH 5,0, não se conseguiu filtrar os sobrenadantes das amostras centrifugadas, em filtros de membrana de acetato de celulose de diâmetro de poros 0,2  $\mu\text{m}$ .

As observações acima levam-nos a concluir que a pH's 5,0 e 9,0 não ocorre considerável agregação das partículas de amido e proteína, resultando uma grande quantidade delas em suspensão no sobrenadante, obstruindo os poros dos filtros. O fato do soro de queijo, anteriormente à precipitação, não passar pelo filtro usado reforça a conclusão acima.

Por outro lado, a pH's básicos o amido solúvel forma um gel que obstrui totalmente os filtros de membrana, impedindo a filtração. A pH's ácidos, devido à reação de hidrólise, a filtração é facilitada [CIACCO & CRUZ, 1982; HAMILTON & PASCHALL, 1967].

Os resultados obtidos para a porcentagem de recuperação de proteína para as diversas concentrações de amido solúvel usadas, mantendo-se o pH da mistura igual a 2,0, são dados na Figura 8.

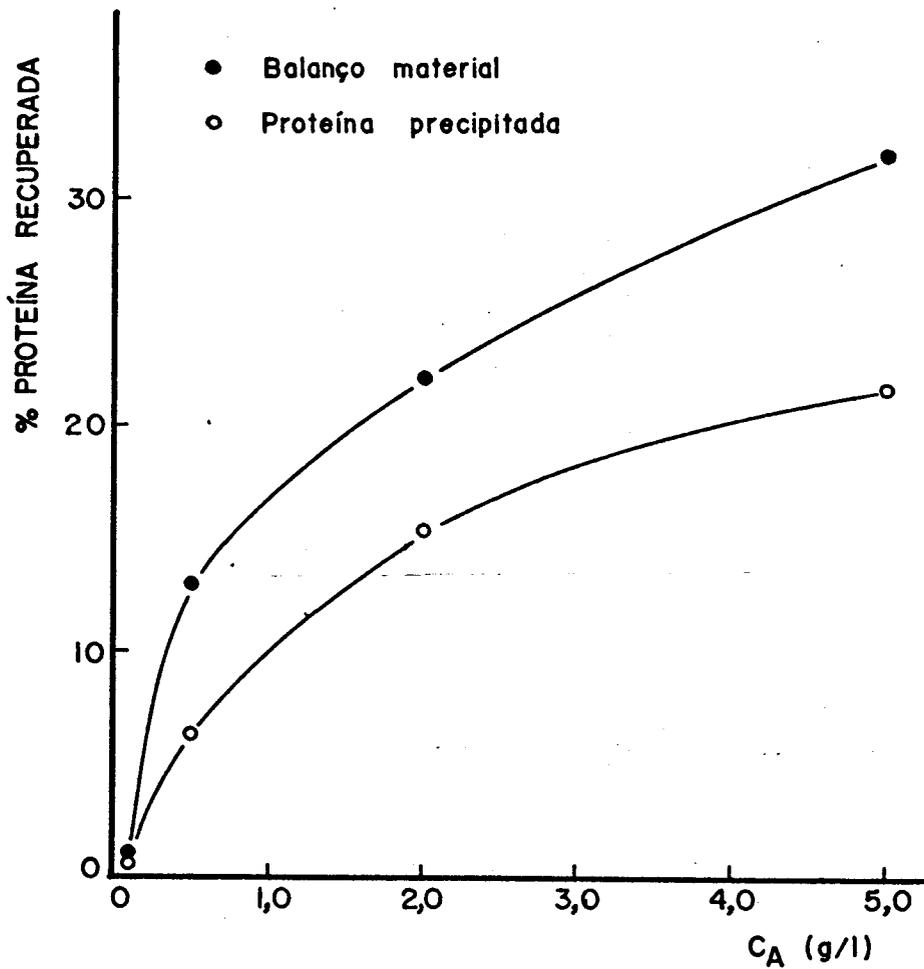


Figura 8. % de proteína recuperada, variando-se a concentração da dispersão de amido.

### Experimentos de filtração

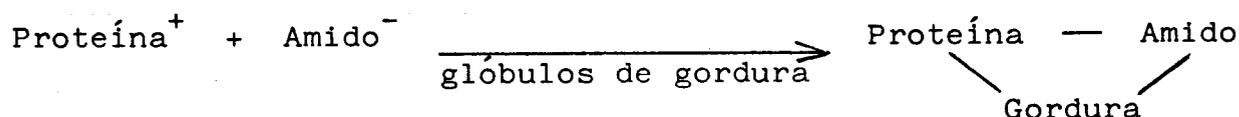
Para se verificar a importância da etapa de filtração no procedimento das experiências de floculação, decidiu-se filtrar o sobrenadante, após a centrifugação das amostras em filtros de porosidades diferentes. Dessa maneira, ter-se-ia uma idéia do tamanho das partículas formadas na floculação do soro de queijo e a quantidade ainda presente no sobrenadante, após a etapa de

centrifugação. Os experimentos de filtração poderiam, também, levar-nos a algumas conclusões sobre a estrutura do floco proteína-amido formado.

A sequência de filtração usada teve sempre a membrana de fibra de vidro como primeiro meio filtrante de diâmetro de poro conhecido. Tal fato, permitiu a retenção da gordura ainda presente no sobrenadante, possibilitando o uso posterior de filtros de membranas de acetato de celulose. O emprego exclusivo de tais membranas, impediu a filtração do sobrenadante.

Filtros de fibra de vidro e membranas de acetato de celulose de mesmo tamanho de poro, 1,2  $\mu\text{m}$ , não tiveram o mesmo desempenho na filtração do sobrenadante. A grande melhora nas taxas de filtração conseguida com o emprego dos filtros de fibra de vidro sugere que, de alguma maneira, o acetato de celulose promove a agregação de gorduras e outras partículas à sua superfície, impedindo a passagem de solução. Hipótese bastante provável seria a incorporação de glóbulos de gordura no agregado proteína-amido formado.

Poderíamos, então, esquematizar o processo (para as partículas ainda não sedimentadas com a centrifugação) como:



Pela presença de gordura, o complexo seria mais frágil, aumentando a probabilidade da ruptura do floco.

Sabe-se, também, que a filtração a vácuo não é indicada para materiais não rígidos ou deformáveis (lamas, flocos) [PERRY &

CHILTON, 1980]. Tentou-se construir um filtro, para filtração a pressão, que atendesse às necessidades de filtração do soro. Os resultados não foram satisfatórios, com baixa performance dos filtros construídos. Houve pequeno aumento na taxa de filtração com a pressão e em alguns casos até mesmo uma diminuição da taxa. O uso de filtros de fibra de vidro solucionou o problema, permitindo uma boa filtração a vácuo. Abandonou-se, assim, a construção dos filtros de pressão.

As massas de partículas retidas em cada um dos filtros de diferentes tamanhos de poros são dadas nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Partículas floculadas retidas nos filtros de diâmetro de poros de 1,2  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  e 0,2  $\mu\text{m}$  \*

nº amostra	Peso seco sobrenadante(g)	m 1,2 $\mu\text{m}$	m 0,45 $\mu\text{m}$	m 0,2 $\mu\text{m}$
		Peso seco sobr.	Peso seco sobr.	Peso seco sobr.
1	0,28	0,043	0,0089	0,0089
2	0,28	0,043	0,0043	0,0054
3	0,28	0,035	0,0067	0,0085
4	0,28	0,044	0,0046	0,0053
5	0,28	0,047	0,0082	0,0078

\* Sequência de filtração: papel de fibra de vidro de 1,2 $\mu\text{m}$ , filtro de membrana de acetato de celulose de 0,2 $\mu\text{m}$ .

m 1,2  $\mu\text{m}$  - massa de partículas retidas no filtro de fibra de vidro de diâmetro de poro de 1,2 $\mu\text{m}$

m 0,45  $\mu\text{m}$  - massa de partículas retidas em filtros de membranas de acetato de celulose de diâmetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$

m 0,2  $\mu\text{m}$  - massa de partículas retidas em filtros de membranas de acetato de celulose de diâmetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$

Tabela 8 - Partículas floculadas retidas nos filtros de diâmetro de poro de 1,2  $\mu\text{m}$  e 0,2  $\mu\text{m}$  \*

nº amostra	Peso seco sobrenadante(g)	$\frac{m\ 1,2\ \mu\text{m}}{\text{Peso seco sobr}}$	$\frac{m\ 0,2\ \mu\text{m}}{\text{Peso seco sobr}}$
7	0,28	0,029	0,0050
8	0,28	0,029	0,0092
9	0,28	0,035	0,0110
10	0,28	0,034	0,0067
11	0,28	0,042	0,0080

\* Sequência de filtração: papel de fibra de vidro de 1,2  $\mu\text{m}$ , filtro de membrana de acetato de celulose de 0,2  $\mu\text{m}$ .

m 1,2  $\mu\text{m}$  - massa de partículas retidas no filtro de fibra de vidro de diâmetro de poro de 1,2  $\mu\text{m}$

m 0,2  $\mu\text{m}$  - massa de partículas retidas no filtro de membrana de acetato de celulose de diâmetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$

Nota-se, pelas Tabelas 7 e 8, que a maior massa de partículas fica retida nos filtros de tamanho de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ . A grande parte das partículas que não sedimentaram durante a centrifugação são partículas de diâmetro maior ou igual a 1,2  $\mu\text{m}$ . A massa de partículas no precipitado é 0,0429, ou seja, cerca de quatro vezes maior que a retida nos filtros de poros de 1,2  $\mu\text{m}$ . Portanto, caso se deseje uma maior eficiência na remoção de sólidos do resíduo, poder-se-ia filtrar a solução sobrenadante, recuperando-se 28% a mais nos filtros de fibra de vidro. A filtragem em filtros de membrana de acetato de celulose de tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , além

de encarecer relativamente o procedimento não se mostra atrativa, pois retém uma quantidade pequena de partículas precipitadas, ou seja, cerca de 20% (~ 5,8% dos sólidos precipitados) a mais são recuperados nos filtros de poros de 0,2  $\mu\text{m}$ . Assim, para os experimentos de comparação da eficiência de precipitação com amidos de diversas fontes naturais, não se filtrou o sobrenadante resultante da centrifugação das amostras retiradas do reator.

#### Eficiência de Amidos de Diversas Fontes Naturais

As diversas características de diferentes tipos de amido, como porcentagens de amilose e amilopectina, diferentes tamanhos e estrutura dos grãos, poder de gelatinização, grau de fosfatação, poderiam influir de modo significativo na capacidade desse polímero em flocular as proteínas do soro de queijo, bem como na clarificação do resíduo, ou seja, remoção de sólidos da solução.

Os resultados para os diferentes tipos de amido utilizados e sua eficiência na remoção de sólidos e recuperação de proteína do soro, são apresentados na Tabela 9 (veja Apêndice B).

Tabela 9 - Ação de amido de diferentes fontes naturais no tratamento residuário do soro.

Tipo de amido	% sólidos totais na solução	% proteína na solução	% sólidos totais recuperados no ppt	% proteína recuperada no ppt <sup>a</sup>
Amido de milho OFMS (solúvel)	4,1	0,42	13,2	21,7
Amido de milho TPF (insolúvel)	4,0	0,44	8,9	9,5
Amido de milho OFMS + Amido de milho TPF <sup>b</sup>	3,9	0,46	8,8	15,9
Amido de milho (Maizena)	4,4	0,45	7,9	6,1
Amido de mandioca	4,0	0,44	8,4	8,7

Amido de milho OFMS - Amido de milho ortofosfatado monossódico

Amido de milho TPF - Amido de milho tripolifosfatado

a - % de proteína recuperada determinada pela quantidade de proteína precipitada, tomando-se a quantidade de proteína contida no soro como conteúdo total.

b - a proporção de amido de milho solúvel para amido de milho insolúvel foi 1:1.

De acordo com os resultados obtidos, o amido de milho solúvel mostrou-se o mais eficiente, tanto na remoção de sólidos da solução, como na recuperação das proteínas do soro. Talvez isso se deva à presença de grupos fosfato no amido, como sugerido por LAMER [1956a], KITCHENER [1972], tendo a reação, portanto, caráter iônico. HIDALGO & HANSEN [1969], em experimentos com CMC e proteínas de soro, sugerem que devido à forte dependência do pH e à sensibilidade a variações em concentração do tampão, a interação entre os dois polímeros deveria ser de natureza iônica. Outros polissacarídeos neutros, como goma guar, mostraram-se inertes, o que reafirma o requisito da existência de grupos iônicos no polímero interagente.

Por outro lado, o amido de milho insolúvel, mesmo apresentando grupos iônicos na molécula, não mostrou a mesma eficiência de recuperação que o amido de milho solúvel. Conforme resultados obtidos por HILL & ZADOW [1974] para CMC, a eficiência de precipitação das proteínas do soro aumentou com o aumento do grau de substituição da CMC. Os sais ortofosfatados produzem monoésteres de amido fosfatado de grau de substituição até 0,2. Tripolifosfato de sódio produz ésteres de amido de baixo grau de substituição (aproximadamente 0,02) [HAMILTON & PASCHALL, 1967].

O amido de milho ortofosfatado monosódico (solúvel), por ter um grau de substituição cerca de dez vezes maior que o tripolifosfatado (insolúvel), apresenta porcentagens de recuperação mais significativas.

As eficiências de recuperação mais baixas observadas para os amidos de milho (Maizena) e mandioca deve-se, portanto, à baixa

concentração de grupos iônicos na molécula, principalmente no amido de milho.

Como citado anteriormente, no capítulo de revisão bibliográfica, um dos requisitos para que um agente flocculante seja efetivo é sua solubilidade em água [KITCHENER, 1972; LA MER et alii, 1957a]. O caráter insolúvel do amido de milho tripolifosfatado, amido de milho (Maizena) e amido de mandioca, também pode ser responsável pelas baixas eficiências obtidas, cerca de 15% a menos que o amido de milho ortofosfatado monossódico. Por outro lado, esperava-se que, principalmente, o amido tripolifosfatado, por possuir partículas carregadas e de maior tamanho, reuniria características que poderiam favorecer o processo de floculação. A superfície carregada propiciaria a reação de neutralização, aproximando as partículas. Os grãos insolúveis poderiam funcionar como sementes, favorecendo a reação secundária de adsorção, à semelhança da floculação de partículas em tratamento de águas [BIRKNER & MORGAN, 1968; BIRKNER & EDZWALD, 1969; BLACK et alii, 1965; GLASGOW & LUECKE, 1980; LA MER et alii, 1956a, b, c; 1957a, b; RIDDICK, 1961; STUM & MORGAN, 1962]. Os dados experimentais obtidos levam-nos a concluir que tal situação não é verdadeira, mudando, assim, a visão do mecanismo que se esperava. A neutralização de carga é, portanto, o mecanismo preferencial de agregação das partículas com uma contribuição secundária do mecanismo de formação de pontes.

Dos tipos de amidos estudados, o amido de milho ortofosfatado monossódico apresenta características de solubilidade, presença de grupos iônicos e alto grau de substituição na molécula,

que propiciariam a floculação, através de mecanismos de neutralização e adsorção. A presença de amido de milho OFMS na combinação entre este e o amido de milho TPF aumentou a eficiência de recuperação de proteína, quando comparada com a eficiência obtida pelo amido de milho TPF somente. A ação conjunta dos dois diferentes tipos de amido, no entanto, não aumentou em muito a eficiência de clarificação do soro. Uma recuperação de proteínas em torno de 13,4% poderia ter sido atingida, usando-se a mesma quantidade de amido de milho solúvel, em comparação com os 16,0% obtidos da combinação entre os amidos. Na remoção de sólidos da solução não há diferença na ação individual do amido de milho insolúvel e de sua combinação com amido de milho solúvel.

CAMPOS et alii [1984] assinalam que propriedade importante no emprego de amido como auxiliar de floculação é a quebra da estrutura do grão, resultando na gelatinização do material. Dos amidos utilizados os amidos de milho solúvel e insolúvel são pré-gelatinizados, por extrusão. Os amidos de milho (Maizena) e amido de mandioca não são gelatinizados. Explica-se, talvez, aí a maior eficiência de floculação dos primeiros.

Em geral a utilização do amido como agente floculante mostrou baixas eficiências de recuperação. LA MER et alii [1956b] citam que o amido, na ausência de eletrólitos flocula preferencialmente partículas maiores. A adição de eletrólitos é desejável para reduzir a carga nas partículas menores do material suspenso. Para o caso do amido fosfatado, eletrólitos como hidróxido de cálcio, são preferíveis, devido à formação de fosfatos insolúveis.

Muitos autores discutem a ação protetora de colóides, onde a cobertura que protege a partícula impede a floculação. KITCHENER, [1972] cita que colóides de origem biológica, como aqueles existentes em culturas microbiológicas, soro de leite, efluentes de esgotos, são naturalmente "protegidos" por outros colóides e insensíveis à ação de agentes floclulantes. Acredita-se que, no caso estudado, não tenha havido proteção da superfície dos colóides, devido ao excesso de concentração do agente floclulante usado, uma vez que a eficiência de recuperação aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de amido no reator. A combinação de amido com outros tipos de polímeros, comumente usados para promover floculação e conseqüente clarificação de resíduos, como sulfatos, polifosfatos, poliacrilatos, talvez seja mais eficiente no tratamento de águas residuárias com melhoras no tamanho de partículas formadas, tempo de filtração, etc., embora haja a necessidade de separação dos dois polímeros.

#### Mecanismo de Agregação das Partículas de Amido, Proteínas e Sólidos do Soro

Pelos resultados experimentais obtidos concluiu-se que a eficiência do amido como agente floclulante para proteínas e sólidos do soro de queijo depende de fatores em grande parte de origem eletrostática.

Conforme analisado, fatores tais como presença de grupos

iônicos na molécula, maior ou menor grau de substituição do amido utilizado, interação com o solvente, gelatinização do material, têm papel decisivo na utilização do amido como agente flocculante. Destes, pelo que se observa, a presença de grupos fosfato e a solubilidade do amido têm maior importância no processo de flocculação.

A atração das partículas, devido à presença de cargas na superfície, tem também papel relevante, uma vez que a formação de agregados só foi possível a baixos pH's, onde se induz a presença de cargas positivas, devido à ionização dos grupos amino das proteínas.

A forte dependência do pH, presença de grupos iônicos na molécula, levaram-nos a concluir que a flocculação dos sólidos do soro pelo amido tem caráter fortemente iônico.

A reação de adsorção deve, no entanto, ocorrer em alguma extensão. A quantidade de proteínas e sólidos recuperados deve ser resultante, também, da adsorção de outras moléculas de amido e proteína à superfície das partículas primárias. NELSON & GLATZ [1985] em estudos sobre a formação de partículas primárias na precipitação de proteína de soja, citam valores em torno de 0,2  $\mu\text{m}$  para o diâmetro dos agregados primários formados. Os autores concluíram que esse valor independe de condições de pH, velocidade de agitação e força iônica, variando, no entanto, de acordo com o precipitante usado. Supondo-se que para a precipitação com amido, tem-se partículas primárias de diâmetro da mesma ordem de grandeza, então, moléculas de proteína e amido foram adsorvidas à superfície, conforme os

resultados obtidos nos experimentos de filtração. Nesses experimentos constatou-se que a grande porcentagem de partículas era retida no precipitado durante a centrifugação e outra porção, bem menor, retida nos filtros de  $1,2 \mu\text{m}$ . Uma quantidade cerca de 25 vezes menor ficou retida nos filtros de  $0,2 \mu\text{m}$ . Assim, o agregado aumentou de tamanho, devido à adição de novas partículas à sua superfície.

Pelo pequeno número de partículas menores que  $0,2 \mu\text{m}$  restantes em solução, após a passagem pelo filtro, o mecanismo que descreve a precipitação das proteínas do soro pelo amido deve ser a formação rápida de partículas, seguida do crescimento do agregado através da colisão e ligação de novas partículas à sua superfície.

O tipo de reator utilizado influi de maneira significativa no processo de floculação. A distribuição do tamanho de partícula, características do floco formado, seu volume, maior ou menor conteúdo de água, são parâmetros que dependem do tipo de reator e controle de variáveis de processo, como tempo de residência, velocidade de agitação [GRABENBAUER & GLATZ, 1981; PETENATE & GLATZ, 1982a]. VIRKAR et alii [1982], em estudos da cinética da precipitação ácida de proteína de soja, apresenta dados de tamanho de partículas para reatores de batelada e tubular, nas mesmas condições de pH e proteína utilizados. As curvas que relacionam a variação do tamanho de partícula com a mudança do pH do sistema, apresentam diferenças marcantes.

Assim, fatores, tais como, o tipo de reator, velocidade

de agitação empregada, aumento ou diminuição do tempo de residência, influem no crescimento e ruptura de flocos durante a precipitação.

## 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Pelos resultados de experimentos de filtração, de floculação em diferentes condições de pH, diferentes tipos de amido e combinação entre eles, pode-se concluir que:

1. A grande dependência do pH, presença de cargas superficiais, fatores necessários para a agregação das partículas, indicam que o processo tem caráter fortemente iônico.
2. O grau de substituição do amido utilizado e sua solubilização tem papel importante na agregação de partículas. Essas propriedades são fatores decisivos na utilização do amido como floculante, quando se trata de sua disponibilidade para interação com as proteínas do soro de queijo.
3. O crescimento do agregado proteína-amido deve-se à adsorção de outras moléculas de proteína e amido à superfície das partículas primárias. Este se dá devido à colisão e adição de novas partículas à superfície.
4. Da quantidade de partículas precipitadas pouco foi o que restou em solução, conforme os experimentos de filtração.
5. A ordem de grandeza das partículas retidas nos filtros é indicativo de que o processo se dá com formação

rápida de partículas, seguida de adsorção de outras á sua superfície.

6. O emprego do amido como agente floculante, embora apresente grandes vantagens pela não necessidade de sua separação das proteínas precipitadas, não apresentou grande eficiência de recuperação comparado a outros polímeros descritos na literatura.

O procedimento empregado, que foi de grande utilidade para o entendimento do mecanismo de agregação das partículas, não apresenta sofisticação alguma. Com um método simples e utilização apenas de materiais essenciais à execução de um ensaio de floculação foi possível enumerar-se os parâmetros básicos e sua influência no processo e comportamento das partículas envolvidas no sistema. O procedimento apresenta, no entanto, muitos pontos passíveis de modificação, sofisticação e novos estudos, que podem levar à obtenção de eficiências mais altas para o processo de recuperação de proteínas do soro de queijo e clarificação de águas residuárias de indústrias queijeiras. Assim, sugere-se, para tal, que novos experimentos e novas técnicas sejam propostos, para se estudar:

1. Influência da força iônica da solução na precipitação das proteínas, bem como emprego de diferentes ions para desestabilização das partículas a serem floculadas.
2. Influência da velocidade de agitação empregada para promover crescimento de flocos e o limite a partir do qual se inicia o processo de ruptura.

3. Emprego de outros agentes precipitantes, combinações entre os mesmos e com amido, e sua influência na recuperação de proteínas e sólidos do soro de queijo.
4. Influência do aumento e diminuição do tempo de residência na distribuição do tamanho da partícula.
5. Desenvolvimento de uma técnica apropriada para medida do tamanho do agregado e observação microscópica de suas características.
6. Elaboração de uma técnica para medida da taxa de crescimento e quebra de flocos durante a precipitação.
7. Execução de análises mais elaboradas para investigação da composição do sobrenadante e precipitado obtidos da centrifugação de amostras floculadas.
8. Utilização de outros tipos de reatores para a precipitação de partículas e sua influência nas constantes cinéticas de nucleação, crescimento e ruptura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 11. ed.  
Washington, D.C., AOAC, 1970.
2. ARGAMAN, Y. & KAUFMAN, W.J. — Turbulence and flocculation.  
J. Sanit. Eng. Div. Am. Soc. Civil Eng., 96:223-241, 1970.
3. BATES, R.L.; FONDY, P.L. & FENIC, J.G. — Impeller  
characteristics and power. In: Mixing. New York, Academic  
Press. V.W. Uhl and J.B. Gray, eds. 1966. v.1, p.111-178.
4. BELL, D.J. & DUNNILL, P. — Shear disruption of soya proteins  
precipitate particles and the effect of aging in a  
stirred tank. Biotechnology and Bioengineering, 24:1271-  
-1285, 1982.
5. BELL, D.J.; HOARE, M. & DUNNILL, P. — The formation of  
protein precipitates and their centrifugal recovery.  
Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 26:1-  
-72, 1982.
6. BIRKNER, F.B. & MORGAN, J.J. — Polymer flocculation kinetics  
of dilute colloidal suspensions. Journal of the American  
Water Works Association, 60:175-191, 1968.
7. BIRKNER, F.B. & EDZWALD, J.K. — Nonionic polymer flocculation  
of dilute clay suspension. Journal of the American Water  
Works Association, 61:645-651, 1969.
8. BLACK, A.P.; BIRKNER, F.B. & MORGAN, J.J. — Destabilization  
of dilute clay suspensions with labeled polymers,

57:1547-1560, 1965.

9. BRUNNER, J.R. — Cow milk proteins: twenty five years of progress. *Journal of Dairy Science*, 64:1038-1054, 1981.
10. CAMPOS, J.R.; VIEIRA, M.B.S. & VILLELA, L.M.O. — Comparação da eficiência de amido de diversas fontes naturais como auxiliar de floculação para águas de abastecimento. *Revista DAE*, 44(137):144-149, 1984.
11. CERBULIS, J. — Precipitation of protein from whey with bentonite and lignosulfonate. *J. Agri. Food Chem.*, 26(4):806-809, 1978.
12. CIACCO, C.F. & CRUZ, R. — Fabricação de amido e sua utilização. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia, 1982.
13. DE VILBISS, E.D.; HOLSINGER, V.H.; POSATI, L.P. & PALLANSCH, M.J. — Whey protein concentrate foams. *Food Technology*, 28(3):40-46, 48, 1974.
14. DONNAN, M.B.; HEALY, T.W. & NELSON, P.F. — An electrokinetic study of alum coagulation and polymer flocculation of cellulose pulp fine. *Colloids and Surfaces*, 2:133-143, 1981.
15. EVANS, E.W. — Whey research. *Journal of the Society of Dairy technology*. 33(3):95-100, 1980.
16. FAIR, G.M. & GEMMEL, R.S. — A mathematical model of coagulation. *Journal of Colloid Science*, 19:360-372, 1964.
17. FENNEMA, O.R. — Principles of food science. In: *Food Science - a series of monographs*. New York, Marcel Dekker. 1976.

p.83-87.

18. GILLES, M.T. — Whey processing and utilization: economic and technical aspects. Park Ridge, Noyes Data Corporation, 1974.
19. GLASGOW, L.A, & LUECKE, R.H. — Mechanisms of deaggregation for clay - polymer flocs in turbulent systems. Ind. Eng. Chem. Fund., 19:148-156, 1980.
20. GRABENBAUER, G.S. & GLATZ, C.E. — Protein precipitation analysis of particle size distribution and kinetics. Chemical Engineering Communications, 12:203-209, 1981.
21. GUY, E.J.; VITTEL, H.E. & PALLANSCH, M.S. — Effect of cheese whey protein on the baking quality and rheological characteristics of sponge dough made from hard red spring wheat flour. Cereal Science Today, 19:551-556, 1974.
22. HAAST, J. — Whey utilization versus pollution. South African J. Dairy Technology, 14(3):97-99, 1982.
23. HAMILTON, R.M. & PASCHALL, E.F. — Production and uses of starch phosphates. In: Starch Chemistry and Technology: Industrial aspects. New York, Academic Press. R.L. Whistler and E.F. Paschall, eds. 1967, v.2, p.351-366, 1967.
24. HANSEN, P.M.T.; HIDALGO, J. & GOULD, I.A. — Reclamation of whey protein with CMC. Journal of Dairy Science, 54(6): 830-834, 1971.
25. HIDALGO, J. & HANSEN, P.M.T. — Interactions between food stabilizers and  $\beta$ -lactoglobulin. Journal of Agricultural food Chemistry, 17(5):1089-1092, 1969.

26. HIDALGO, J.; KRUSEMAN, J. & BOHREN, H.V. — Recovery of whey proteins with sodium hexametaphosphate. *Journal of Dairy Science*, 56(8):988-993, 1973.
27. HILL, R.D. & ZADOW, J.G. — The precipitation of whey proteins by carboxymethylcellulose of differing degrees of substitution. *Journal of Dairy Research*, 41:373-380, 1974.
28. HILL, R.D. & ZADOW, J.G. — Recovery of whey proteins from precipitated complex of carboxymethylcellulose and protein. *Journal of Dairy Research*, 45:77-83, 1978a.
29. HILL, R.D. & ZADOW, J.G. — The precipitation of whey proteins with water soluble polymers. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 13:61-64, 1978b.
30. HILL, A.R.; IRVINE, D.M. & BULLOCK, D.H. — Precipitation and recovery of whey proteins, a review. *Can. Inst. Food Sci. Techn.*, 15(3):155-160, 1982.
31. HINZE, J.O. — Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion process. *AICHE Journal*, 1(3): 289-295, 1955.
32. HOARE, M. — Protein precipitation and precipitating ageing: I. Salting-out and ageing of casein precipitates. *Trans. Int. Chem. Eng.*, 60:79-87, 1982.
33. HOARE, M.; NARENDRANATHAM, T.J.; FLINT, J.R.; WADDINGTON, D.H.; BELL, S.J. & DUNNIL, P. — Desruption of protein precipitates during shear in couette flow and in pumps. *Ind. Eng. Chem.*, 21:402-406, 1982.
34. HOARE, M. — Protein precipitation and precipitate ageing:

- II. Growth of protein precipitates during hindered settling or exposure to shear. *Trans. Int. Chem. Eng.*, 60:157-163, 1983.
35. HOLMES, D.J. — Whey products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 14(2):202-211, 1979.
36. HOWLING, D. — The influence of the structure of starch and its rheological properties. *Food Chemistry*, 6:51-61, 1980.
37. HUDSON, H.E.Jr. — Physical aspects of flocculation. *Journal of the American Water Works Association*, 57:885-892, 1965.
38. HUGHES, M.A. — Coagulation and flocculation — Part I. In: *Solid-liquid separation*, 2.ed. London, Butterworths. L. Svarovsky, ed. 1981. p.65-85.
39. HUGUNIN, A.G. — Whey, an opportunity for the baking industry. *Baker's Digest*, 54(4):8-14, 1980.
40. IVES, K.J. — Coagulation and flocculation. Part II: Orthokinetic flocculation. In: *Solid-liquid separation*, 2.ed. London, Butterworths. L. Svarovsky, ed. 1981, p.86-119.
41. JELEN, P. — Industrial whey processing technology, and overview. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 27(4):656-661, 1979.
42. JELEN, P. — Reprocessing of whey and other dairy wastes for use as food ingredients. *Food Technology*, 37(2):81-84, 1983.
43. JONES, S.B.; KALAN, E.B.; JONES, I.C. & HAZEL, F.J. — Ferrypolyphosphate as whey protein precipitant. *Journal*

Agr. Food Chem., 20(2):229-234, 1972.

44. KITCHENER, J.A. — Principles of action of polymeric flocculant. *British Polymer Journal*, 4:217-229, 1972.
45. KOETS, P. — Coacervation of amylophosphoric acid and protein. *Journal Phys. Chem.*, 40:1191-1200, 1936.
46. LA MER, V.K. & SMELLIE, R.H.Jr. — Flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes. I. General. *Journal of Colloid Science*, 11 :704-709, 1956a.
47. LA MER, V.K. & SMELLIE, R.H.Jr. — Flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes. II. Starches as agents for improving flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes. *Journal of Colloid Science*, 11:710-719, 1956b.
48. LA MER, V.K. & SMELLIE, R.H.Jr. — Flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes. III. Subsidence behavior. *Journal of Colloid Science*, 11:720-731, 1956c.
49. LA MER, V.K.; SMELLIE, R.H.Jr. & PUI-KUM LEE — Flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes. IV. Flocculation by gums and influence on filtration rate. *Journal of Colloid Science*, 12:230-239, 1957a.
50. LA MER, V.K.; SMELLIE, R.H.Jr. & PUI-KUM LEE — Flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes. V. The optimum filtration rate as a function of solid content and specific area. *Journal of Colloid Science*, 12 :566-574, 1957b.
51. LA MER, V.K. — Coagulation symposium. *Journal of Colloid*

- Science. 12:291-293, 1964.
52. LEITE, E.A. — Proteínas do soro na fabricação de queijo Minas. Campinas, UNICAMP, 1978 (tese de Mestrado).
53. LEVICH, V. — Physicochemical hydrodynamics. New Jersey, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1962.
54. MATTHEWS, B.A. & RHODES, C.T. — Studies of coagulation kinetics of mixed suspensions. Journal of Colloid and Interface Science, 32(2):332-338, 1970.
55. MASON, S.G. — Orthokinetic phenomena in disperse systems. Journal of Colloid and Interface Science, 58(2):275-285, 1977.
56. MC CABE, W.L. & SMITH, J.C. — Unit Operations of Chemical Engineering. 3.ed. Tokio, Mc Graw Hill, 1976.
57. MC DONOUGH, F.E. — Whey concentration by reverse osmosis. Food Engineering, 40(3):124-127, 1968.
58. MC DONOUGH, F.E. — Whey solids utilization and salvage systems. Cultured Dairy Products Journal, 12(1):8-11, 1977.
59. METTLER, A.E. — Utilization of whey by-products for infant feeding. Journal of the Society of Dairy Technology, 33(2):67-72, 1980.
60. MEYER, L.H. — Food Chemistry. Westport, Connecticut, AVI Publishing, 1975. p.109-113.
61. MOLAG, M.; JOOSTEN, G.E.H. & DRINKENBURG, A.A.H. — Droplet breakup and distribution in stirred immiscible two-liquid systems. Ind. Eng. Chem. Fund., 19:275-281, 1980.
62. MORR, C.V. & LIN, S.H.C. — Preparation and properties of an

- alcohol-precipitated whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 53(9):1162-1170, 1970.
63. MORR, C.V. — Symposium: milk proteins in dairy and food processing. *Journal of Dairy Science*, 58(7):977-984, 1974.
64. MORR, C.V. — Whey protein concentrates, an update. *Food Technology*, 30(3):18-22, 42, 1976.
65. MORR, C.V. — Functionality of whey protein products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 14(2): 185-194, 1978.
66. NELSON, C.D. & GLATZ, C.E. — Primary particle formation in protein precipitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1434-1444, 1985.
67. PACKHAM, R. & SHEIHAM, I. — Developments in the theory of coagulation and flocculation. *Journal Institute of Water and Engineering Science*, 31:96-108, 1977.
68. PARKER, D.S.; KAUFMAN, W.J. & JENKINS, D. — Flocc breakup in turbulent flocculation processes. *J. Sanitary Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eng.*, 98:79-99, 1972.
69. PELTON, R.H. — A model for flocculation in turbulent flow. *Colloids and Surfaces*, 2:277-285, 1981.
70. PETENATE, M.A.A.M. — Kinetics of protein aggregate growth and breakage during isoelectric precipitation. Iowa, 1982. Thesis (PhD in Chemical Engineering). Iowa State University, USA.
71. PETENATE, A.M. & GLATZ, C.E. — Isoelectric precipitation of soy

- protein. I - Factors affecting particle size distribution. *Biotechnology and Bioengineering*, 25:3049-3058, 1983a.
72. PETENATE, A.M. & GLATZ, C.E. — Isoelectric precipitation of soy protein. II - Kinetics of protein aggregate growth and breakage. *Biotechnology and Bioengineering*, 25:3050-3078, 1983b.
73. PERRY, R.H. & CHILTON, C.H. — *Manual de Engenharia Química*. 5.ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Dois S.A., 1980.
74. RANDOLPH, A.D.; LARSON, M.A. — *Theory of particulate processes*. New York and London, Academic Press, 1971.
75. RIDDICK, T.M. — Zeta potential and its application to difficult waters. *Journal of the American Water Works Association*, 53:1007-1030, 1961.
76. ROBINSON, R.K. & TAMINE, A.Y. — Some aspects of the utilization of whey. *Dairy Industries International*, March:14-25, 1978.
77. SATIRO, J.O. — *Queijo: Fundamentos tecnológicos*. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia. F.T.P.T., 1982.
78. SHAW, D.J. — *Introdução à química dos colóides e de superfícies*. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1975.
79. SMITH, D.K.W. & KITCHENER, J. A. — The strength of aggregates formed in flocculation. *Chemical Engineering Science*, 33:1631-1636, 1978.
80. STEVENSON, D.G. — Flocculation and floc behavior. *Journal of Water Engineers*, 26:155-169, 1972.

81. STRONG III, C.F. — Comunicação verbal, 1985.
82. STUMM, W. & MORGAN, J. — Chemical Aspects of Coagulation.  
Journal of the American Water Works Association, 54:971-  
-992, 1962.
83. TAMBO, M. & HOZUMI, H. — Physical characteristics of flocs.  
II. Strength of floc. Water Res. 13:421-427, 1979.
84. THOMPSON, L.U.; CHU, P.; LO, M.; MARKOVITCH, D. & SIU, M. —  
Effluent proteins from rapeseed cheese whey protein  
coprecipitation process. Can. Inst. Food Sci. Techn.,  
17(3):137-142, 1984.
85. TOWLER, C. — Utilization of whey protein products in pasta.  
New Zealand Journal of Dairy Science and Technology,  
17:229-236, 1982.
86. TOWNEND, R.E. — Coprecipitation of acid cheese whey and  
tannery waste and recovery of protein. Biotechnology  
and Bioengineering, 20:589-599, 1978.
87. TWINEHAM, M.; HOARE, M. & BELL, D.J. — The effects on the  
breakup of protein precipitate by exposure to shear.  
Chemical Engineering Science, 39:509-513, 1984.
88. VAN DE VEN, T.G. & MASON, S.G. — The microrheology of  
colloidal dispersions. VII. Orthokinetic doublet  
formation of spheres. Colloid and Polymer Science,  
25:468-479, 1977.
89. VIEIRA, S.D. & NEVES, B.S. — Elaboração de bebidas ácidas e  
achocolatadas a partir de soro de queijo ultrafiltrado.  
Alimentação, julho/agosto:21-25, 1985.

90. VIRKAR, P.D.; HOARE, M.; CAAN, M.Y.Y. & DUNNIL, P. — Kinetics of the acid precipitation of soya protein in a continuous flow tubular reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 24:871-887, 1982.
91. VITTI, P. — Soro de leite e seu uso em panificação. *Bol. Ital*, 18(2):155-166, 1981.
92. WEBB, B.H. — Utilization of whey in foods. *Food Research*, 3:233-238, 1938.
93. WEBB, B.H. — Whey, a low cost dairy product for use in candy. *Journal of Dairy Science*, 49(10):1310-1314, 1966.
94. WEBB, B.H. & JOHNSON, A.H. — Fundamentals of dairy chemistry. Westport, Connecticut, AVI Publishing, 1965.
95. ZADOW, G. — Modification of whey and whey components. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 14(2): 131-138, 1979.
96. ZADOW, G.; HILL, R.D. — The formation of complexes between whey proteins and carboximethylcellulose modified with substituents of increased hydrofobicity. *Journal of Dairy Research*, 45:85-92, 1978.

## APÊNDICE A

Método do biureto para quantificação de proteína

Foram testados os métodos de Folin-Ciocalteu e o do reagente do biureto para quantificação de proteína e, pela facilidade da preparação do reagente do biureto [COLLOWICK & KAPLAN, 1957], seu tempo de vida, simplicidade da reação e faixa de concentração abrangida, decidiu-se tomá-lo como o método a ser utilizado para a determinação quantitativa de proteína no sobrenadante.

No decorrer dos experimentos notou-se que, durante a quantificação de proteína, os resultados não eram coerentes, sendo as leituras no espectrofotômetro bastante irregulares e não estáveis.

POMERANZ & MELOAN [1982] citam não haver praticamente substâncias que possam interferir no método. EL GAZAR [1981], durante investigação da precipitação de proteínas do soro, utilizou a reação do biureto para determinação de proteínas do soro, uma vez que o método de Kjeldahl oficial é inconveniente para um grande número de amostras. Comparações mostraram que os métodos do biureto e de Kjeldahl deram resultados similares, sendo o desvio padrão das diferenças (15 amostras) de 0,0822% de proteína, o que não foi estatisticamente significativo.

As amostras retiradas após a floculação das proteínas do soro com amido, quando analisadas quanto à quantidade de proteína pelo método do biureto, apresentavam constantemente um precipitado

vermelho, que se acreditou ser óxido de cobre.

Um dos principais métodos para a determinação quantitativa de açúcares utiliza a ação redutora desses açúcares em soluções alcalinas de sais de certos metais. Embora muitos sais metálicos, como os de cobre, prata, mercúrio e bismuto, sofram esse tipo de reação, o cobre tem sido usado mais extensivamente na análise de açúcares [PIGMAN & HORTON, 1970].

O reagente mais conhecido, baseado na redução de cobre, é a solução de Fehling. Ela é preparada, misturando-se antes de seu uso, duas soluções, uma contendo sulfato de cobre e outra, contendo tartarato de sódio e potássio, e hidróxido de sódio. Dependendo da concentração de açúcares na solução, o aquecimento com a solução de Fehling resulta um precipitado alaranjado ou vermelho. Alguns monossacarídeos reagem a frio [POMERAN & MELOAN, 1982].

O método do biureto baseia-se no fato de que substâncias, contendo duas ou mais ligações peptídicas, formam um complexo violeta com sais de cobre em soluções alcalinas. O reagente de biureto é preparado misturando-se sulfato de cobre penta-hidratado, tartarato de sódio e potássio e hidróxido de sódio, ou seja, similar ao reagente de Fehling.

Acreditou-se, então, que houve redução da lactose do soro pelo cobre, com formação de um precipitado vermelho. Este, pela sua dispersão na solução com posterior sedimentação, interfere nas leituras de transmitância, inviabilizando o método.

O método do biureto é comumente usado para a determinação de proteína no sangue. No sangue, entretanto, a concentração de

açúcar (glicose) varia de 0,6 mg/ml a 1,1 mg/ml [VILLELA et alii 1973], quantidade essa muito pequena, quando comparada com a concentração de lactose no soro, 49 mg/ml.

Alternativas são encontradas para utilização do método do biureto. SCHOBER et alii [1964] e SOBER et alii [1965] apontam que a ação da lactose em soluções alcalinas de sulfato de cobre pode ser diminuída pela adição de solução de tetraborato de sódio, o que permite a utilização da reação do biureto para a determinação de proteínas de produtos lácteos, sem a separação das mesmas ou remoção completa da lactose.

Antes da utilização do método do biureto com adição de tetraborato de sódio, decidiu-se estudar o efeito da temperatura na reação, ou seja, se a formação do precipitado vermelho poderia ser retardada, abaixando-se a temperatura durante o tempo necessário para a reação.

Os testes foram feitos colocando-se amostras para reagirem a 6°C e a 25°C. As amostras mantidas a 6°C tinha a cor violeta natural da reação, mas apresentavam partículas suspensas que poderiam ser os flocos que, devido à baixa temperatura ou novas colisões entre partículas, continuaram a crescer, ou mais provavelmente glóbulos de gordura que se solidificaram. Nota-se, no entanto, que à baixa temperatura houve retardamento da formação do precipitado vermelho, como indica a Tabela 1.

Tabela 1. Influência da temperatura na reação do biureto

Tempo (min)	Temperatura	
	6° C	25° C
30	sem ppt	sem ppt
40	sem ppt	com ppt
50	sem ppt	

As amostras permaneceram a 6° C por 14 hs. Após esse intervalo de tempo o precipitado vermelho já havia se formado.

Tentou-se seguir o procedimento descrito por SCHÖBER et alii [1964], com o uso de tetraborato de sódio, encontrando-se, no entanto, dificuldades na total remoção da gordura para clarificação das amostras e manuseio seguro de reagentes utilizados no método. Assim, as modificações no método, não satisfizeram o requisito de simplicidade e, dada a impossibilidade do uso do método do biureto simples, adotou-se a determinação de proteína pelo método micro-Kjeldahl, com as adaptações, como descrito no item Método micro-Kjeldahl, em MATERIAIS E MÉTODOS.

## BIBLIOGRAFIA DO APÊNDICE A

1. COLLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. — Methods in Enzimology. New York, Academic Press, 1957. v.3, p,450-451.
2. EL GAZAR — Rapid determination of whey proteins by means of the biuret reaction. Agricultural Research Review, 56 (6):171-173, 1981.
3. PIGMAN, W. & HORTON, D. — The carbohydrates chemistry and biochemistry. 2.ed. London and New York, Academic Press, 1970. v.2B.
4. POMERANZ, Y. & MELOAN, R.E. — Food Analysis. Theory and Practice. 3.ed. Westport, Connecticut, AVI Publishing Company, 1982.
5. SCHOBBER, R.; NICLAUS, W & CHRIST, W. — Uber die Anwendbarkeit der Biuret-Reaktion zur Proteinbestimmung in Milch. Milchwissenschaft, 19:75-78, 1964.
6. SOBER, H.A.; HARTLEY, R.W.; CARROLL, W.R. & PETERSON, E.A. — Fractionation of proteins. In: The proteins, composition structure and function. New York, Academic Press. H. Neurath ed. 1965.
7. VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. — Técnicas e experimentos de Bioquímica. 1.ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1973. p.446.

## APÊNDICE B

Exemplo de cálculo dos valores obtidos para análise da eficiência de amido de diversas fontes naturais (Tabela 9).

Amido de milho OFMS (amido solúvel)

Base de cálculo 7,98 g de solução de soro + dispersão de amido

% de sólidos totais na amostra = 4,06%

Sólidos na amostra = 7,98 g x 0,0406 = 0,324 g = 324,41 mg

% de proteína na amostra = 0,42% (método de Kjeldahl)

Proteína na amostra = 324,41 mg x 0,042 = 1,36 mg

Peso do precipitado seco = 42,7 mg

% de proteína no precipitado seco = 22,0% (método de Kjeldahl)

Proteína no precipitado = 1,36 mg x 0,22 = 0,30 mg

Sólido não proteico no precipitado = 42,7 mg - 0,30 mg = 42,4 mg

% de sólido proteico no precipitado =  $\frac{0,30}{42,7} = 0,70\%$

% de sólidos totais recuperados =  $\frac{42,4}{324,41} = 13,2\%$