



UNICAMP

MARIANO MICHELON

**SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS POR NANOFILTRAÇÃO**

CAMPINAS

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANO MICHELON

SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE GALACTO- OLIGOSSACARÍDEOS POR NANOFILTRAÇÃO

Orientação: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Co-orientação: Profa. Dra. Andrea Limoeiro Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO MARIANO MICHELON E ORIENTADO
PELO PROF. DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO
Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Michelon, Mariano, 1986-.

M582s Separação e purificação de galacto-oligosacarídeos
por nanofiltração / Mariano Michelon. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

Orientador: Francisco Maugeri Filho.

Coorientador: Andrea Limoeiro Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Nanofiltração. 2. Galactooligosacarídeos. 3.
Diafiltração. 4. Membranas. 5. Incrustação.
I. Maugeri Filho, Francisco, 1952- II. Carvalho, Andrea
Limoeiro. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Separation and purification of galactoolisaccharides by
nanofiltration

Palavras-chave em inglês:

Nanofiltration

Galactooligosaccharides

Diafiltration

Membranes

Fouling

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Francisco Maugeri Filho [Orientador]

Raquel Cristine Kuhn

Telma Teixeira Franco

Data da defesa: 08-03-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho – Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

Profa. Dra. Raquel Cristine Kuhn – Membro Titular

Departamento de Engenharia Química – UFSM/RS

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco – Membro Titular

Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP/SP

Dra. Fernanda Yumi Ushikubo – Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto – Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

“Não adianta olhar para o céu com muita fé e pouca luta”.

Gabriel o Pensador

Este trabalho é dedicado a(os):

meus pais,
que me deram a vida, o dom mais precioso, e me ensinaram a vivê-la com dignidade.

Susan,
*que se eu pudesse escrever além desta dissertação a história das minhas horas, uma a uma
seria ao lado dela.*

AGRADECIMENTOS

A Deus – a quem ofereço essa conquista e peço força para sempre agir com eficiência em meu trabalho e acertos em minhas decisões;

Pai, Mãe, Guto, Lucas e Fabio – minha família, pessoas que compreenderam minha ausência, sempre apoiaram os meus objetivos de vida, sofreram com meus fracassos e vibraram com minhas conquistas. Sem o apoio de vocês este sonho não seria possível;

Susan – pela dedicação e empenho na realização dos nossos sonhos, pelo amor e por tornar meus dias mais felizes;

Família Hartwig Duarte – que me acolheu como um filho, pelo apoio incondicional e pelo carinho;

Amigos – amigos que fiz em Campinas, amigos de infância e amigos da faculdade, agradeço pelo companherismo e pelo apoio;

Colegas de Pós-Graduação – especialmente a Renata, Giovani, Janaína, Moyses, Philipe, Emilio e Luiz, pelo convívio diário, pela ajuda e pelos ensinamentos;

Família LEB – Fifa, Marquinhos, Rosana, Zama, Cris, Dani, Susan, Karla, Phelipe, Laís, Priscila, Andrea, Raquel e Ana Paula, profissionais brilhantes, pessoas que acreditaram e participaram da realização deste trabalho.

Prof. Francisco – pela última oportunidade de orientação em sua carreira profissional, pela confiança, pelos ensinamentos e pelo exemplo de vida.

Profa. Andrea – pela disponibilidade de co-orientação, pela amizade e pelos ensinamentos.

FEA/UNICAMP – pela oportunidade de convivência junto a uma importante instituição de ensino e pesquisa, que me faz acreditar, acima de tudo na opção por espaços públicos, gratuitos e de qualidade.

CAPES – pelo financiamento deste trabalho.

Corn Products International e Microdyn-Nadir – pela doação de materiais imprescindíveis para realização deste trabalho

A todos que de alguma forma tornaram possível a realização desse trabalho.

RESUMO GERAL

Galacto-oligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos não digeríveis que apresentam propriedades prebióticas, pois auxiliam na proliferação de bifidobactérias no cólon. Os GOS podem ser obtidos pela reação de transgalactosilação da galactose catalisada pela enzima β -galactosidase a partir de substratos ricos em lactose. Neste processo, as misturas de açúcares obtidas após a síntese contêm além dos GOS, mono- e dissacarídeos residuais. Portanto, uma alternativa interessante para aumentar a participação dos GOS no mercado de alimentos funcionais e também incrementar seu valor comercial é sua separação dos demais açúcares. Para tal finalidade, os processos de separação por membranas de nanofiltração podem ser empregados. Estes apresentam vantagens em relação aos processos cromatográficos como a economia de energia e a simplicidade de operação e de ampliação de escala. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para purificação de GOS utilizando membranas de nanofiltração. A partir de uma solução modelo contendo GOS, lactose, glicose e galactose, as membranas de nanofiltração NP010 e NP030 constituídas de polietersulfonas com massa molecular de corte de 1000 e 400 Da, respectivamente, e as membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL ambas constituídas de poliamidas aromáticas com massa molecular de corte de 150-300 Da foram utilizadas em um sistema de escala laboratorial que simula um processo de filtração tangencial na pressão de 3 MPa a 30°C. A membrana NP030 foi selecionada, pois apresentou nestas condições o maior fator de purificação (*FP*) de $1,68 \pm 0,06$, diferindo-se estatisticamente das demais membranas testadas. Após a etapa de seleção, foi conduzido um delineamento composto 2^2 , com faces centradas e réplicas nos pontos centrais, totalizando 11 ensaios, variando a pressão de operação do sistema (2 a 4 MPa) e a temperatura do processo (15 a 55°C). A pressão de 3 MPa e a temperatura de 35°C resultaram nos maiores valores de *FP* ($>1,77$). Em seguida, um processo de diafiltração descontínua foi realizado com a finalidade de aumentar a pureza da solução retida e verificou-se que após a 1ª etapa de diafiltração o valor de *FP* ($\sim 1,87$) manteve-se constante até o 4º ciclo de diafiltração. As análises das micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostram que a membrana NP030 apresenta deposições de solutos e adesão de micro-organismos na superfície filtrante após sua utilização e lavagem

com água, indicando a necessidade de um controle das incrustações e do *biofouling* para sua reutilização. As micrografias obtidas através de MEV do suporte da membrana indicaram uma possível compactação física. Como etapa subsequente, foi realizada uma validação industrial do processo, utilizando uma unidade piloto de filtração de fluxo tangencial com um módulo espiral da membrana NP030. Foi possível observar que a solução final retida apresentou após 3900 s um valor de *FP* de 2,55 e uma recuperação de GOS de 97,82%. Foi possível identificar os mecanismos de incrustações dos poros através dos valores dos coeficientes cinéticos de adsorção e pode-se concluir que as incrustações da galactose e da glicose correspondem a um modelo padrão de bloqueio dos poros, enquanto que para os GOS e a lactose a um modelo de bloqueio parcial. Foi estimado o tamanho médio dos poros de permeação da membrana NP030, sendo possível afirmar que a probabilidade dos poros de permeação da membrana estarem contidos no intervalo entre 1,94-3,47 nm é de 68,2%. Com estes resultados, pode-se afirmar que as membranas de nanofiltração podem ser utilizadas como uma etapa inicial na purificação dos GOS obtidos através de síntese enzimática. Para obtenção de uma solução com pureza comercial, outras técnicas de purificação deveram ser aplicadas após a nanofiltração.

Palavras-chave: prebióticos, incrustações, lactose, diafiltração, galacto-oligossacarídeos e nanofiltração.

ABSTRACT

Galactooligosaccharides (GOS) are oligosaccharides that present non-digestible prebiotic properties because they assist in the proliferation of bifidobacteria in the human colon. GOS may be obtained by the transgalactosylation reaction of galactose catalyzed by the β -galactosidase enzyme from substrates rich in lactose. In this process the mixtures of sugars obtained after synthesis contain not only GOS, but also mono- and disaccharide residues. Thus, an interesting alternative to increase the participation of GOS in the functional foods market and also enhance its commercial value is its separation from other sugars. For this purpose, separation processes utilizing nanofiltration membranes may be employed. These processes have advantages over chromatographic processes including energy saving and simplicity of operation and scale increase. The objective of this study was therefore to develop a methodology for purification of GOS using nanofiltration membranes. From a solution containing GOS, lactose, glucose and galactose, the nanofiltration membranes NP010 and NP030, composed of polyethersulfones with molecular weight cut-offs of 1000 Da and 400, respectively, as well as the membranes Desal 5-DK, Desal 5-DL and Desal 5-HL made of aromatic polyamides with molecular mass cut-offs of 150-300 Da were used in a system that simulates a laboratory scale cross-flow filtration process at a pressure of 3 MPa at 30°C. The NP030 membrane was selected because at these conditions it presented the highest purification factor (*PF*) of 1.68 ± 0.06 , statistically different from the other membranes tested. After the selection step, a compound 2^2 design was conducted with centered faces and triplicate of the central points, totaling 11 assays, varying the operating pressure of the system (2 to 4 MPa) and the process temperature (15 to 55°C). The pressure of 3 MPa and temperature of 35°C resulted in the highest *PF* values (>1.77). Then a discontinuous diafiltration process was carried out in order to increase the purity of the retained solution, where it was found that after the 1st diafiltration step the *PF* (~ 1.87) remained constant until the 4th diafiltration step. Analyses of the micrographs obtained by scanning electron microscopy (SEM) showed that membrane NP030 presents deposits of solutes and adhesion of microorganisms on the filter surface after use and washing with water, indicating the need for control of fouling and biofouling for reuse. The SEM micrographs of the membrane support indicated a possible physical compaction. In a

subsequent step, an industrial validation of the process was performed using a pilot tangential flow filtration unit with a model NP030 spiral membrane. It was observed that the final solution retained after 3900 s presented a *PF* value of 2.55 and a recovery of 97.82% GOS. It was possible to identify the fouling mechanisms of the pores using values of the kinetic adsorption coefficients and it could be concluded that galactose and glucose fouling corresponded to a standard blocking model of the pores, while for lactose and GOS a partial blocking model. The average pore size of the NP030 membrane was estimated, thus it was possible to affirm the probability of the membrane permeation pores in the interval between 1.94-3.47 nm, which was 68.2%. Based on these results, nanofiltration membranes may be used as an initial step in purification of GOS obtained by enzymatic synthesis. To obtain a solution with commercial purity, other purification techniques should be applied after nanofiltration.

Keywords: prebiotic, fouling, lactose, diafiltration, galactooligosaccharides and nanofiltration.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO GERAL | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| SUMÁRIO..... | xvii |
| ÍNDICE DE TABELAS | xxi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xxii |
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES..... | xxv |
| CAPÍTULO I | 1 |
| 1.1 INTRODUÇÃO GERAL | 3 |
| 1.2 OBJETIVOS..... | 5 |
| 1.2.1 Geral..... | 5 |
| 1.2.2 Específicos | 5 |
| 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 6 |
| 1.3.1 Prebióticos..... | 6 |
| 1.3.2 Galacto-oligossacarídeos (GOS)..... | 7 |
| 1.3.2.1 Propriedades e Aplicações dos GOS..... | 10 |
| 1.3.2.2 Purificação de GOS..... | 12 |
| 1.3.3 Processos de Separação por Membranas (PSM)..... | 14 |
| 1.3.3.1 Fundamentos Gerais dos PSM | 15 |
| 1.3.3.2 Nanofiltração..... | 22 |
| 1.3.3.3 Purificação de GOS por Nanofiltração..... | 25 |
| 1.3.3.4 Fatores Operacionais que Influenciam na Nanofiltração | 27 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO II | 41 |
| RESUMO..... | 43 |
| 2.1 INTRODUÇÃO..... | 44 |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 46 |
| 2.2.1 Solução GOS-modelo | 46 |
| 2.2.2 Membranas..... | 47 |
| 2.2.3 Sistema de Filtração..... | 47 |
| 2.2.4 Ensaio de Nanofiltração | 49 |
| 2.2.4.1 Seleção da Membrana | 49 |
| 2.2.4.2 Delineamento Composto de Faces Centradas (DCFC)..... | 50 |
| 2.2.4.3 Diafiltração Descontínua..... | 51 |
| 2.2.5 Considerações Matemáticas..... | 52 |
| 2.2.6 Determinações Analíticas | 56 |
| 2.2.6.1 Concentração de Açúcares | 56 |
| 2.2.6.2 Viscosidade | 56 |
| 2.2.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 57 |
| 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 57 |
| 2.3.1 Seleção da Membrana de Nanofiltração | 57 |
| 2.3.2 Delineamento Composto de Faces Centradas (DCFC)..... | 64 |
| 2.3.2.1 Fator de Purificação | 65 |
| 2.3.2.2 Fluxos de Permeado e Solutos | 71 |
| 2.3.3 Diafiltração Descontínua | 74 |
| 2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura | 76 |

| | |
|---|-----|
| 2.4 CONCLUSÃO..... | 82 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |
| CAPÍTULO III | 89 |
| RESUMO..... | 91 |
| 3.1 INTRODUÇÃO..... | 92 |
| 3.2 TEORIA..... | 94 |
| 3.2.1 Considerações Gerais..... | 94 |
| 3.2.2 Coeficientes Cinéticos de Adsorção ($k_{ads,i}$)..... | 95 |
| 3.2.3 Concentração da Polarização ($C_{m,i}$) | 98 |
| 3.2.4 Distribuição de Tamanho dos Poros | 99 |
| 3.3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 101 |
| 3.3.1 Solução GOS-modelo | 101 |
| 3.3.2 Membrana | 102 |
| 3.3.3 Unidade Piloto de Filtração de Fluxo Tangencial..... | 102 |
| 3.3.4 Processo de Purificação – Diafiltração | 104 |
| 3.3.5 Quantificação dos Açúcares..... | 105 |
| 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 106 |
| 3.4.1 Processo de Purificação | 106 |
| 3.4.2 Mecanismos de Incrustação dos Poros | 113 |
| 3.4.3 Distribuição dos Tamanhos dos Poros..... | 120 |
| 3.5 CONCLUSÃO..... | 123 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 124 |
| CAPÍTULO IV | 129 |

| | |
|----------------------------|-----|
| 4.1 CONCLUSÕES GERAIS..... | 131 |
|----------------------------|-----|

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 Principais propriedades das membranas de nanofiltração. | 47 |
| Tabela 2.2 Médias (\pm desvios padrões) das respostas avaliadas para a seleção da membrana de nanofiltração. | 59 |
| Tabela 2.3 Matriz do DCFC 2 ² de faces centradas e tréplicas nos pontos centrais com os ensaios em valores codificados e valores reais (entre parênteses) e respostas observadas. . | 65 |
| Tabela 2.4 Coeficientes de regressão estimados para a resposta <i>FP</i> | 66 |
| Tabela 2.5 ANOVA para a resposta <i>FP</i> | 67 |
| Tabela 2.6 Valores de <i>FP</i> experimentais e preditos através do modelo. | 67 |
| Tabela 2.7 Valores <i>FP</i> e fluxos de permeado durante a diafiltração descontínua. | 76 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|-----|
| Tabela 3.1 Resultados experimentais da diafiltração realizada na unidade piloto de nanofiltração de fluxo tangencial. | 111 |
| Tabela 3.2 Propriedades dos açúcares e números adimensionais do processo. | 114 |
| Tabela 3.3 Diâmetros de permeação dos poros da membranas NP030 e diâmetro de Stokes dos açúcares. | 122 |

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.1** Principais rotas enzimáticas de conversão da lactose pela enzima β -galactosidase. Fonte: Martins e Burkert, (2009)..... 8
- Figura 1.2** Diferentes configurações hidrodinâmicas dos PSM, (a) filtração convencional e (b) filtração tangencial. Fonte: Adaptado de Habert, Borges e Nobrega (2006)..... 15
- Figura 1.3** Perfil de concentração de solutos na fase fluida adjacente à superfície da membrana no estado estacionário, onde $C_{f,i}$, $C_{m,i}$ e $C_{p,i}$ são as concentrações de solutos, na alimentação, na superfície da membrana e no permeado, respectivamente, J_p é o fluxo de permeado e δ é a espessura da camada sub-laminar. Fonte: Adaptado de González-Muñoz e Parajó (2010). 19
- Figura 1.4** Principais configurações industriais dos módulos de membranas, (a) fibra-oca, (b) espiral e (c) tubular. Fonte: GEA Filtration (2013). 22

CAPÍTULO II

- Figura 2.1** (a) Digrama esquemático do sistema de filtração, onde (1) entrada e saída da camisa de aquecimento, (2) entrada de gás nitrogênio para pressurização da célula, (3) suporte do bastão magnético, (4) suporte do disco de membrana, (5) saída de permeado e (6) agitador magnético. (b) Ilustração do sistema de filtração. 48
- Figura 2.2** Diagrama de fluxo das etapas da diafiltração descontínua. 52
- Figura 2.3** (a) Superfície de resposta e (b) curva de contorno para a resposta FP em função da pressão (MPa) e da temperatura ($^{\circ}$ C)..... 68

| | |
|--|----|
| Figura 2.4 (a) Influência da pressão no fluxo volumétrico de permeado e (b) nos fluxos mássicos de solutos, ambos na temperatura fixa de 35° C. | 72 |
| Figura 2.5 (a) Influência da temperatura no fluxo de permeado e (b) nos fluxos mássicos de solutos, ambas na pressão fixa de 3 MPa. | 73 |
| Figura 2.6 Fluxos de permeado em função da <i>RVR</i> durante as etapas de diafiltração descontínua realizados a 3 MPa e 35° C com a membrana NP030. | 75 |
| Figura 2.7 Micrografias da superfície filtrante da membrana NP030: (a) antes e (b) após a nanofiltração a 3 MPa e 35° C e aumento na magnitude de (1) 2 k, (2) 5 k e (3) 10 k. | 78 |
| Figura 2.8 Micrografias do suporte da membrana NP030 (a) antes e (b) depois da nanofiltração a 3 MPa e 35° C e aumento na magnitude de (1) 0,25 k, (2) 0,4 k e (3) 0,8 k. | 81 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|-----|
| Figura 3.1 Ilustração da unidade piloto de nanofiltração de fluxo tangencial. | 103 |
| Figura 3.2 Diagrama de fluxo da diafiltração na unidade piloto de nanofiltração de fluxo tangencial. | 105 |
| Figura 3.3 Pureza dos açúcares na solução retida e fluxo de permeado em função do tempo das etapas de diafiltração e concentração. | 107 |
| Figura 3.4 Concentrações de açúcares na solução retida em função do tempo de diafiltração. | 108 |
| Figura 3.5 Coeficientes de retenção observados dos açúcares em função do tempo de diafiltração. | 109 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3.6 Ajuste do modelo (Equação 3.9) para obtenção das constantes cinéticas de adsorção dos açúcares..... | 115 |
| Figura 3.7 Constantes cinéticas de adsorção dos açúcares em função da massa molecular e mecanismos de incrustação propostos..... | 116 |
| Figura 3.8 Ajuste linear para obtenção da permeabilidade hidráulica da membrana NP030. | 118 |
| Figura 3.9 Resistências intrínseca da membrana e devido às incrustações dos poros e suas contribuições na resistência total do sistema..... | 119 |
| Figura 3.10 Ajuste do modelo (Equação 3.18) para obtenção do diâmetro do poro de permeação de cada açúcar. | 121 |
| Figura 3.11 Distribuição Gaussiana dos poros de permeação da membrana NP030... | 121 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Símbolos

| | |
|-----------------------|--|
| A | Parâmetro do modelo (adimensional) |
| A_m | Área de permeação da membrana (m^2) |
| B | Parâmetro do modelo (nm) |
| C | Parâmetro do modelo (adimensional) |
| $C_{f,i}$ | Concentração do soluto i na solução de alimentação (g/L) |
| $C_{m,i}$ | Concentração do soluto i adsorvida e/ou depositada na membrana (g/L) |
| $C_{p,i}$ | Concentração do soluto i no permeado (g/L) |
| $C_{r,i}$ | Concentração do soluto i no retido (g/L) |
| C_i | Concentração do soluto i (g/L) |
| d_h | Diâmetro hidráulico do canal de permeação da membrana (m) |
| $d_{p,i}$ | Diâmetro do poro de permeação do soluto i (nm) |
| $d_{s,i}$ | Diâmetro de Stokes do soluto i (nm) |
| $\langle d_p \rangle$ | Diâmetro médio dos poros de permeação (nm) |
| ΔP | Pressão transmembrana (Pa) |
| $\Delta \Pi$ | Diferença de pressão osmótica (Pa) |
| FC | Fator de concentração (adimensional) |
| FP | Fator de purificação (adimensional) |
| J_p | Fluxo volumétrico de permeado (L/m^2h ; m^3/m^2s) |
| $J_{s,i}$ | Fluxo mássico do soluto i (g/m^2h) |
| J_w | Fluxo de água pura antes da utilização da membrana (L/m^2h ; m^3/m^2s) |
| J_w' | Fluxo de água pura após a utilização da membrana (L/m^2h ; m^3/m^2s) |

| | |
|-------------|--|
| $J_{w,t}$ | Fluxo de água pura através dos poros de retenção (L/m^2h ; m^3/m^2s) |
| $k_{ads,i}$ | Constante cinética de adsorção do soluto i (m^3/s) |
| K_R | Constante de proporcionalidade (adimensional) |
| $K_{m,i}$ | Coefficiente externo de transferência de massa do soluto i (m/s) |
| L_P | Permeabilidade hidráulica (m/Pas) |
| $M_{w,i}$ | Massa molar do soluto i (Da; $g/gmol$) |
| $M_{w,w}$ | Massa molar da água (Da; $g/gmol$) |
| $m_{ads,i}$ | Massa do soluto i adsorvida e/ou depositada na membrana (g) |
| $m_{0,i}$ | Massa do soluto i adsorvida e/ou depositada na membrana em $t=0$ (g) |
| $m_{f,i}$ | Massa do soluto i na solução de alimentação (g) |
| $m_{p,i}$ | Massa do soluto i no permeado (g) |
| $m_{r,i}$ | Massa do soluto i no retido (g) |
| $m_{r,T}$ | Massa total de solutos no retido (g) |
| N_A | Número de Avogrado ($6,02 \times 10^{23}$) |
| $Pu_{r,i}$ | Pureza do soluto i na solução retida (%) |
| $Pu_{p,i}$ | Pureza do soluto i na solução permeada (%) |
| $Pu_{f,i}$ | Pureza do soluto i na solução alimentada (%) |
| Q_0 | Vazão da solução de alimentação (m^3/s) |
| Q_p | Vazão da solução permeada (m^3/s) |
| R | Constante dos gases ideais ($8,314 J/gmolK$) |
| Re | Número de Reynolds do processo (adimensional) |
| $R_{obs,i}$ | Coefficiente de retenção observado do soluto i (adimensional) |
| $R_{obs,j}$ | Coefficiente de retenção observado do soluto j (adimensional) |

| | |
|-----------|--|
| R_i | Coeficiente de retenção intrínseco ou real (adimensional) |
| R_T | Resistência total do sistema de nanofiltração (m^{-1}) |
| R_f | Resistência devido à incrustação dos poros (m^{-1}) |
| R_p | Resistência devido à formação da camada polarizada (m^{-1}) |
| R_m | Resistência intrínseca da membrana (m^{-1}) |
| RVR | Razão de volume reduzido (adimensional) |
| $S_{i,j}$ | Seletividade do soluto i em relação ao soluto j (adimensional) |
| Sh_i | Número de Sherwood do soluto i (adimensional) |
| Sc_i | Número de Schmidt do soluto i (adimensional) |
| t | Tempo (s) |
| D_i | Coeficiente de difusão do soluto i (m^2/s) |
| T | Temperatura absoluta ($^{\circ}C$; K) |
| v | Velocidade tangencial de escoamento na superfície da membrana (m/s) |
| $v_{m,i}$ | Volume molar do soluto i no ponto normal de ebulição ($m^3/kgmol$) |
| V_f | Volume da solução alimentada (mL; L) |
| V_p | Volume da solução permeada (mL; L) |
| V_r | Volume da solução retida (mL; L) |

Símbolos Gregos

| | |
|----------|--|
| α | Parâmetro do modelo (adimensional) |
| β | Parâmetro do modelo (adimensional) |
| σ | Desvio-padrão (nm) |
| μ_p | Viscosidade dinâmica do permeado (kg/ms) |

| | |
|-------------|---|
| μ_s | Viscosidade dinâmica da solução (kg/ms) |
| μ_w | Viscosidade dinâmica da água pura (kg/ms) |
| δ | Espessura da camada sub-laminar do perfil de concentração (m) |
| φ_w | Fator de associação da água (adimensional) |
| ρ_s | Massa específica da solução (kg/m ³) |
| ρ_i | Massa específica do soluto <i>i</i> (kg/m ³) |

Abreviações

| | |
|-------|--|
| AFM | Microscopia de Força Atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>) |
| ANOVA | Análise de Variância |
| DCFC | Delineamento Composto de Faces Centradas |
| GOS | Galacto-oligossacarídeos |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| PA | Poliamidas Aromáticas |
| PAD | Detecção Amperométrica Pulsada (<i>Pulsed Amperometric Detection</i>) |
| PES | Polietersulfonas |
| PSM | Processos de Separação por Membranas |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MWCO | Massa Molar de Corte (<i>Molecular Weight Cut-Off</i>) |

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o rápido avanço tecnológico, novos processos vêm sendo desenvolvidos para a promoção da qualidade dos produtos e atendimento satisfatório de consumidores cada vez mais exigentes, que além de vantagens nutricionais, procuram por alimentos com características de qualidade que aportem em ganhos fisiológicos para melhoria da sua saúde. Devido à crescente demanda por alimentos funcionais, esses produtos constituem a nova fronteira de expansão do mercado de alimentos processados no Brasil.

São vários os fatores que vêm estimulando o desenvolvimento de alimentos funcionais ao longo dos últimos anos. Dentre eles, destacam-se principalmente o aumento da expectativa de vida em países desenvolvidos cujas populações necessitam de cuidados hospitalares por maior período de tempo, o elevado custo dos serviços de saúde, os avanços na tecnologia de alimentos e ingredientes e a maior cobertura dos diferentes tipos de mídia dada a essas descobertas e às questões de saúde (ARVANITTOYANNIS e HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, 2005; KOMATSU, BURITI e SAAD, 2008).

Dentre os oligossacarídeos, os galacto-oligossacarídeos (GOS) possuem propriedades funcionais e são considerados ingredientes prebióticos, pois quando ingeridos estimulam a proliferação de bifidobactérias no intestino humano. Dentre seus benefícios para saúde humana reportados pela literatura, destacam-se, entre outros, a proteção contra infecções nos tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital, efeitos anticariogênicos, prevenção do câncer de cólon, aumento na absorção de alguns minerais presentes na dieta e a redução dos níveis de colesterol. Além disso, a estabilidade dos GOS sob condições

ácidas durante o processamento de alimentos torna-os potencialmente aplicáveis como ingredientes para uma ampla variedade de produtos alimentícios.

Misturas comerciais de GOS são obtidas através da reação de transgalactosilação da galactose pela ação de enzimas β -galactosidase. O sítio ativo da β -galactosidase possui habilidade similar tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose (MARTINS e BURKERT, 2009). Dessa forma, são obtidas misturas contendo GOS e outros açúcares de menor massa molar como a glicose, a galactose e a lactose residuais. Estes açúcares quando ingeridos não apresentam efeitos na melhoria da saúde humana como os GOS. Portanto uma alternativa interessante para aumentar o valor comercial dos GOS obtidos através de síntese enzimática e também aumentar sua participação no mercado de alimentos funcionais é a sua separação dos demais açúcares através de técnicas aplicáveis em larga escala.

Dentre as técnicas empregadas atualmente para separação de açúcares, destacam-se os métodos cromatográficos, como as colunas de leito fixo com utilização de resinas de troca iônica ou carvão ativado. Uma alternativa a essas técnicas dispendiosas são os processos de separação através de membranas de nanofiltração. Esses processos apresentam algumas vantagens em relação aos métodos convencionais como o baixo consumo energético, a simplicidade de operação e de ampliação de escala, e também a possibilidade de separação de compostos termolábeis. Além disso, as faixas de separação dessas membranas são ideais para separar os GOS dos demais açúcares, devido ao tamanho de sua molécula (CHERYAN, 1998).

Nos últimos anos, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA/FEA/UNICAMP) têm sido pesquisados processos de produção de fruto-

oligossacarídeos através de síntese enzimática (HERNALSTEENS e MAUGERI-FILHO, 2008; HERNALSTEENS e MAUGERI-FILHO, 2010), sua purificação em colunas de leito fixo através de zeólitas e carvão ativado (KUHN e MAUGERI-FILHO, 2010a; KUHN e MAUGERI-FILHO, 2010b) e também através de membranas de nanofiltração (KUHN *et al.*, 2010; KUHN *et al.*, 2011). Impulsionados com os resultados obtidos até então, a produção de GOS, outro oligossacarídeo prebiótico, passou a ser investigada através de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus* (MANERA *et al.*, 2010; MANERA *et al.*, 2012). Todos estes estudos foram motivados pela diversidade de aplicação dos oligossacarídeos em indústrias de alimentos devido à sua funcionalidade e sua obtenção através de síntese enzimática. Portanto, este trabalho tem como interesse principal ampliar o conhecimento adquirido nos últimos anos nesta linha de pesquisa, dando ênfase à purificação dos GOS através de membranas de nanofiltração.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Desenvolver uma metodologia para a separação e purificação de GOS através da nanofiltração.

1.2.2 Específicos

- Selecionar dentre diferentes membranas comerciais de nanofiltração aquela que apresentar o melhor desempenho na purificação dos GOS;

- Avaliar a influência da pressão e da temperatura no fator de purificação de GOS e nos fluxos de permeado e solutos através de um Delineamento Composto de Faces Centradas;
- Realizar um processo de diafiltração descontínua nas condições previamente otimizadas e verificar a influência de diafiltrações sucessivas na pureza da solução retida;
- Analisar morfológicamente através de microscopia eletrônica de varredura as superfícies da membrana selecionada antes e depois de sua utilização na condição otimizada;
- Validar industrialmente a nanofiltração como uma técnica de purificação parcial de GOS em uma unidade piloto de fluxo tangencial;
- Identificar os mecanismos de incrustação que ocorrem durante o processo de nanofiltração na unidade piloto e determinar o diâmetro médio dos poros de permeação da membrana.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Prebióticos

Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimularem seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon, contribuindo assim para melhoria da saúde do hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Os critérios utilizados para a classificação de um ingrediente alimentar como prebiótico incluem a resistência à digestão, a fermentação seletiva por bactérias benéficas no cólon, a alteração da composição da

microflora intestinal além da indução aos efeitos que são benéficos para a saúde do hospedeiro (FOOKS, FULLER e GIBSON, 1999).

Alguns autores citam exemplos de oligossacarídeos com propriedades prebióticas, como a lactulose, os GOS, os fruto-oligossacarídeos, os isomalto-oligossacarídeos, os malto-oligossacarídeos, o lactitol, a lactossacarose, a rafinose, além de polissacarídeos como a inulina e o amido resistente (ZIEMER e GIBSON, 1998; FOOKS, FULLER e GIBSON, 1999). Porém, segundo Gibson e Roberfroid, (1995) somente os GOS e os fruto-oligossacarídeos, dentre os oligossacarídeos, possuem propriedades prebióticas cientificamente comprovadas.

1.3.2 Galacto-oligossacarídeos (GOS)

Os GOS são oligossacarídeos compostos de uma cadeia contendo de 2 a 9 unidades de galactose e uma unidade terminal de glicose (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; CARDELLE-COBAS *et al.*, 2011). Estes oligossacarídeos são componentes naturais do leite humano, bem como de alguns vegetais, incluindo a cebola, o alho, a banana, a soja e a chicória (MAHONEY, 1998). Podem ser obtidos também através da reação de transgalactosilação por ação da enzima β -galactosidase empregando substratos ricos em lactose (KIMURA *et al.*, 1995; SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999). A enzima β -galactosidase é igualmente responsável pela reação de hidrólise da lactose, formando galactose e glicose. O sítio ativo da β -galactosidase possui habilidade similar tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose (JURADO *et al.*, 2002). Na Figura 1.1 são apresentadas as duas principais rotas enzimáticas de conversão da lactose pela enzima β -galactosidase.

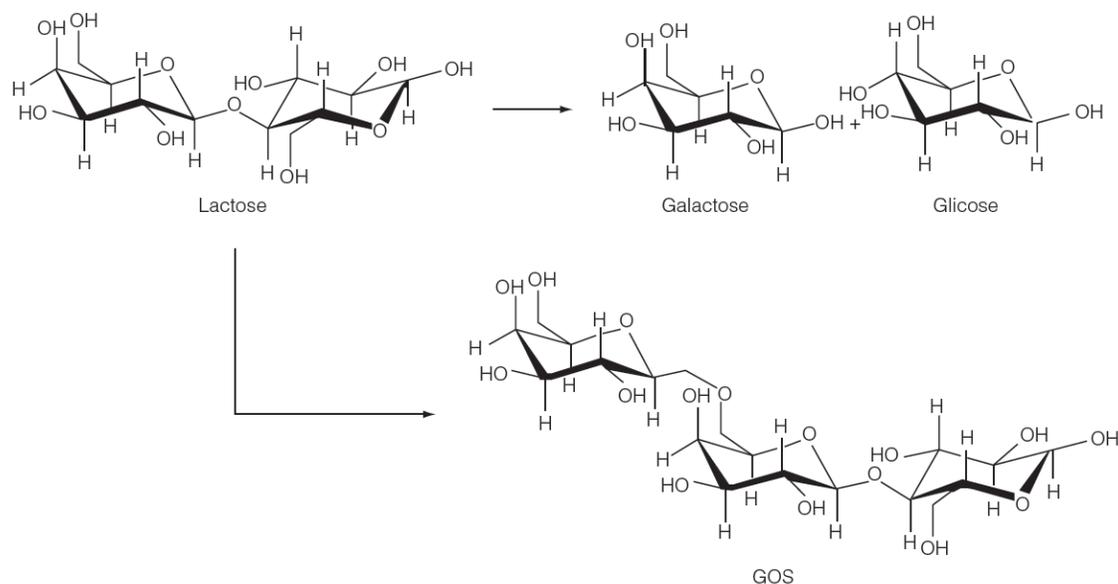


Figura 1.1 Principais rotas enzimáticas de conversão da lactose pela enzima β -galactosidase. Fonte: Martins e Burkert, (2009).

A eficiência da reação de transgalactosilação é caracterizada pelas ligações entre os monômeros de galactose, sendo a natureza dos compostos que estarão presentes no produto final da reação dependentes da origem da enzima e das condições do processo (GU, 1999). A cinética de conversão da lactose segue um modelo de inibição enzimática competitiva (MARTINS e BURKERT, 2009). Desde o princípio da reação, a galactose irá competir com a lactose pelo sítio ativo da enzima. A cinética da reação de transgalactosilação de galactose irá aumentar com a redução da lactose no meio reacional (SANTOS, LADERO e GARCÍA-OCHOA, 1998).

A mistura de GOS obtida após a síntese enzimática pela β -galactosidase pode ser formada por dissacarídeos até hexassacarídeos. A baixa efetividade da enzima em produzir oligossacarídeos de maior massa molecular pode ser explicada pela competitividade da

transgalactosilação da galactose com a hidrólise da lactose. A reação de transgalactosilação será menos efetiva quanto maior a massa molar dos oligossacarídeos aceptores, o que explica a maior formação de dissacarídeos, trissacarídeos e tetrassacarídeos em comparação com oligômeros maiores (MAHONEY, 1998).

Existem duas rotas industriais para obtenção de GOS através da reação enzimática de transgalactosilação uma formando preferencialmente ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e a outra formando ligações β -1,6 (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999). Na hipótese das ligações serem do tipo β -1,4, o trissacarídeo formado é chamado de β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose, e quando forem do tipo β -1,6 o trissacarídeo será o β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose. As ligações do tipo β -1,2 e β -1,3 também podem ocorrer, porém em menor incidência que as β -1,4 e β -1,6 (MARTINS e BURKERT, 2009).

É comum encontrar dissacarídeos transgalactosilados que consistem apenas em uma unidade de galactose e outra de glicose, com ligações β -glicosídicas diferentes da lactose ou ainda dissacarídeos formados somente por galactose (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999). Alguns tipos de GOS formados apenas por unidades de galactose são a galactobiose, galactotriose e galactotetraose (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008). Estes dissacarídeos podem ser considerados prebióticos desde que tenham características fisiológicas similares as dos GOS de maior massa molar (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999). Outros dissacarídeos, como a lactulose e a allolactose, também podem sofrer transgalactosilação (TUNGLAND e MEYER, 2002).

1.3.2.1 Propriedades e Aplicações dos GOS

A ingestão de GOS aumenta a proliferação de bactérias probióticas no trato intestinal e, por efeito antagônico, a supressão da atividade de bactérias putrefativas e a redução da formação de metabólitos tóxicos. Os efeitos benéficos à saúde dos consumidores, em função da proliferação das bifidobactérias incluem o favorecimento da absorção de cálcio, magnésio e fósforo presente na dieta, a redução dos níveis séricos de colesterol, a redução da pressão arterial e o aumento da imunidade celular (PÉREZ-CONESA, LÓPEZ e ROS, 2007). No entanto, a única alegação de benefício funcional admitida pela legislação brasileira para prebióticos é a de contribuição para a motilidade intestinal (BRASIL, 1999).

Os oligossacarídeos prebióticos possuem baixo teor calórico e não servem de substrato para a bactéria *Streptococcus mutans*, responsável pelo aparecimento das cáries dentárias (SAAD, 2006). Os GOS são ainda considerados promotores dos efeitos bifidogênicos pois servem de substrato para bactérias do gênero *Bifidobacterium*, estimulando seu metabolismo e seu crescimento na microbiota intestinal humana (MARTINS e BURKERT, 2009). Os efeitos bifidogênicos dos oligossacarídeos prebióticos permitem que estes carboidratos resistam à ação das enzimas do trato digestivo e possam ser fermentados pelas bifidobactérias. Além dessas vantagens, agregam ao alimento uma leve sensação de dulçor e modificam algumas propriedades físicas dos alimentos (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999), como por exemplo a textura.

Dentre os micro-organismos do trato intestinal humano, os que mais se beneficiam com a presença de oligossacarídeos são as bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e

Lactobacillus. Diversos oligossacarídeos não são digeríveis pelo organismo humano porque esses não possuem as enzimas necessárias para romper as ligações do tipo β formadas entre unidades de monossacarídeos. Outros oligossacarídeos são parcialmente hidrolisados no trato gastrointestinal e podem resultar na formação de carboidratos essenciais para a saúde, os quais servem de substratos e reguladores para a maioria das rotas metabólicas (MACFARLANE, MACFARLANE e CUMMINGS, 2006; MACFARLANE, STEED e MACFARLANE, 2008).

Do ponto de vista industrial, algumas características dos GOS devem ser consideradas, já que estes apresentam solubilidade maior que a sacarose, não cristalizam, não precipitam e não deixam a sensação de secura na boca (BORNET, 1994). São estáveis em condições adversas de pH e temperatura, resistem a 160°C por 10 min em pH neutro ou a 120°C por 10 min em pH 3,0. Nestas mesmas condições a degradação da sacarose seria superior a 50%. Em condições ácidas na temperatura ambiente, os GOS tendem a ser estáveis durante o armazenamento a longo prazo (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999).

Devido a essas características, os GOS podem ser empregados em formulações de sobremesas lácteas, leites fermentados, pães, geleias, bebidas e produtos de confeitaria. Alimentos infantis e alimentos especiais para idosos e hospitalizados são campos promissores para aplicação de GOS, pois esses grupos são mais susceptíveis a mudanças na microflora intestinal (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999; RIVERO-URGELL e SANTAMARIA-ORLEANS, 2001). Além disso, os GOS apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, podendo ser usados de modo seguro por diabéticos (MANERA, 2010).

1.3.2.2 Purificação de GOS

Na última década diversos trabalhos foram publicados com a finalidade de desenvolver um processo de purificação de GOS aplicável em escala industrial, dentre eles, a adsorção com carvão ativado, que é um método convencional de purificação de oligossacarídeos. Neste método, a solução de GOS passa através de uma coluna de carvão que adsorve todos os carboidratos presentes na solução alimentada. Monossacarídeos e lactose são removidos da coluna utilizando água ou uma solução com baixa concentração de etanol, enquanto os GOS são eluídos com altas concentrações de etanol (MATSUMOTO, NATSUKO e TSUNEKAZU, 1998). Este processo apresenta uma separação ineficiente dos açúcares e rendimentos inferiores quando comparados a outras técnicas de purificação.

A técnica de leito móvel simulado foi utilizada para separar uma mistura de oligossacarídeos, glicose e frutose utilizando uma resina de troca catiônica como adsorvente e água como eluente (MASUDA *et al.*, 1993). Este método não foi eficiente para separar os oligossacarídeos dos monossacarídeos. Em outro estudo proposto, o fracionamento da lactose de uma mistura de oligossacarídeos presentes no leite humano foi estudado em duas fases estacionárias, uma de gel por exclusão de tamanho e outra de gel de troca iônica, onde a cromatografia de exclusão de tamanho com partículas de 50 e 100 μm e porosidade de 50 Å, removeu a lactose quase na totalidade, mas os rendimentos obtidos, 24-28 g/dia (GEISSER *et al.*, 2005) foram considerados baixos. Além disso, a filtração em gel não é um processo adequado para implementação em grande escala devido à vida útil limitada do meio filtrante (SARNEY *et al.*, 2000).

Em outra alternativa proposta para separar os GOS dos mono- e dissacarídeos, a lactose foi oxidada a ácido lactobiônico utilizando a enzima de origem fúngica celobiose desidrogenase e, posteriormente, o ácido e os monossacarídeos foram removidos por troca iônica e cromatografia de exclusão de tamanho. Os GOS recuperados através desta técnica, em uma taxa de 60%, apresentavam menos de 0,3% de lactose e monossacarídeos (MAISCHBERGER *et al.*, 2008).

Outro processo para promover a purificação dos GOS obtidos por síntese enzimática foi realizado utilizando a técnica de precipitação com etanol. A melhor separação foi alcançada utilizando altas concentrações (90% v/v) na temperatura de 40° C. A solução final obtida (28 g/L de açúcares totais) continha cerca de 48% (m/m) de monossacarídeos (SEN *et al.*, 2011). Tendo em vista estes resultados, as oscilações no preço do etanol e os elevados custos com a sua recuperação e implementação industrial comprometem a potencialidade de aplicação em larga escala desta técnica.

A tecnologia de extração supercrítica também foi utilizada como alternativa para realizar o fracionamento de uma mistura de açúcares. O dióxido de carbono no estado supercrítico combinado com diferentes mistura de etanol e água como co-solventes foram testados para recuperação de GOS (MONTAÑÉS *et al.*, 2009). A seleção apropriada do co-solvente utilizado em conjunto com as condições adequadas de processo permitiram a remoção quase completa dos mono- e dissacarídeos a partir da mistura inicial. Neste processo cerca de 75% (m/m) dos GOS foram recuperados com um rendimento global de 94%. Apesar de mostrar-se como uma técnica alternativa para o fracionamento GOS, a tecnologia supercrítica apresenta elevados custos de implementação em escala industrial quando comparadas com outras técnicas.

A maioria dos GOS comerciais disponíveis são purificados através de técnicas cromatográficas e membranas de ultrafiltração (GOULAS, GRANDISON e RASTALL, 2003). Entretanto, a possibilidade de utilização de membranas de nanofiltração passou a ser investigada na última década. A filtração por membranas de nanofiltração é normalmente utilizada para separar e/ou concentrar componentes de baixa massa molar, tais como os oligossacarídeos, através da utilização de baixas pressões (1 a 4 MPa). Os resultados experimentais obtidos e publicados até o presente momento são promissores e apontam a nanofiltração como processo alternativo para purificação de GOS em escala industrial.

1.3.3 Processos de Separação por Membranas (PSM)

Os PSM surgiram na década de 60, contudo o seu desenvolvimento em escala comercial emergiu na década de 80 nos Estados Unidos e na Noruega. Estes processos surgiram como uma alternativa ou complemento à maioria dos processos convencionais de separação e estão sendo cada vez mais utilizados nas indústrias de alimentos substituindo processos clássicos como pasteurização, centrifugação e extração sólido-líquido (PONTALIER, ISMAIL e GHOUL, 1999; FERSI, GZARA e DHAHBI, 2005). Os PSM atingiram o nível comercial devido às vantagens inerentes a esta tecnologia como a economia de energia, alta seletividade, separações de compostos termolábeis e a simplicidade de operação e escalonamento (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

1.3.3.1 Fundamentos Gerais dos PSM

Na sua forma mais simples, o PSM consiste no bombeamento de uma solução através da superfície de uma membrana, existindo duas configurações hidrodinâmicas para o processo: o método estático, denominado filtração convencional (*dead-end filtration*) e a filtração tangencial (*cross-flow filtration*) (CHERYAN, 1998). Na primeira configuração a alimentação ocorre perpendicularmente à superfície da membrana. Dessa forma, os solutos e/ou os materiais em suspensão retidos ficam acumulados na superfície. Na segunda configuração, o volume de alimentação escoia paralelamente à superfície da membrana. Assim, as partículas depositadas são constantemente arrastadas pela corrente tangencial de alimentação (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006), conforme ilustra a Figura 1.2.

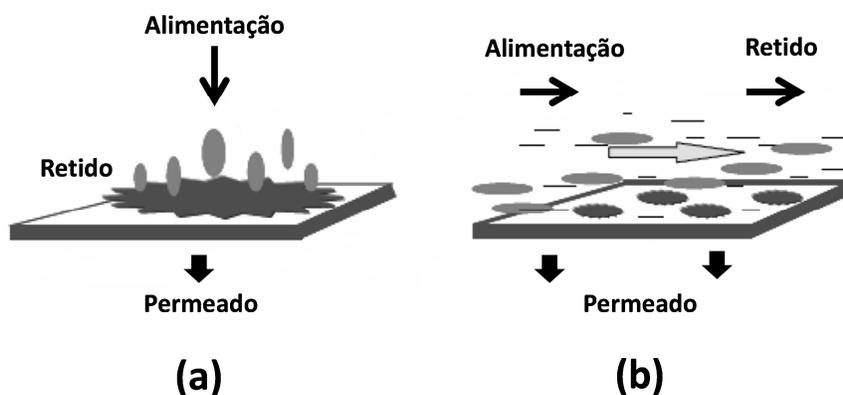


Figura 1.2 Diferentes configurações hidrodinâmicas dos PSM, (a) filtração convencional e (b) filtração tangencial. Fonte: Adaptado de Habert, Borges e Nobrega (2006).

Membranas são definidas como filmes poliméricos ou inorgânicos semipermeáveis que servem como uma barreira seletiva para processos de filtração em escala molecular,

quando aplicada alguma força motriz. Esta barreira controla a transferência de massa através de sua superfície, permitindo a passagem de certas espécies moleculares e restringindo a passagem de outras, gerando duas correntes distintas: o permeado, fluido que atravessa a superfície da membrana; e o retido, constituído dos solutos que não ultrapassam a superfície por apresentarem dimensões moleculares maiores que o tamanho médio dos poros (CHERYAN, 1998).

Com relação à estrutura morfológica, as membranas de modo geral, podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas ou porosas. Ambas podem ser isotrópicas (simétricas) ou anisotrópicas (assimétricas), ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua seção transversal. As membranas anisotrópicas se caracterizam por apresentar uma região superior muito fina (aproximadamente 1 μ m), podendo conter poros ou não, chamada de pele, suportada em uma estrutura porosa. Quando ambas regiões são constituídas por um único material a membrana é do tipo anisotrópica integral, se diferentes materiais são empregados no preparo de cada região a membrana será do tipo anisotrópica composta (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

A grande diferença entre membranas assimétricas e simétricas está na definição e caracterização dos limites de retenção. A retenção das membranas simétricas é uma função do seu diâmetro equivalente ao poro de tamanho máximo, enquanto nas membranas assimétricas essa retenção é expressa como uma razão nominal que se refere a um diâmetro de corte, definido como o valor da massa molecular para o qual a membrana apresenta coeficiente de retenção de 95%. Assim, uma membrana com massa molecular de corte (MWCO) de 15 kDa é aquela capaz de reter 95% de moléculas com massas molares iguais ou superiores a 15 kDa (CHERYAN, 1998; HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

Dois tipos de parâmetros são normalmente empregados para caracterizar membranas: parâmetros de natureza morfológica e parâmetros relativos a suas propriedades de transporte. No caso das membranas porosas, características como a distribuição de tamanho dos poros, rugosidade superficial e espessura representam parâmetros morfológicos relevantes. Por outro lado, para membranas densas as características físico-químicas envolvendo o polímero utilizado e as substâncias a serem separadas, bem como a espessura do filme polimérico, devem ser consideradas. No caso das membranas anisotrópicas compostas, as características do suporte poroso devem ser incluídas. Independente do tipo de membrana, propriedades de transporte como permeabilidade a gases e líquidos e capacidade seletiva são utilizadas como parâmetros característicos dos PSM (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

A capacidade seletiva ou seletividade de uma membrana com relação a um soluto pode ser expressa através do coeficiente de retenção ou coeficiente de rejeição, podendo ser chamado também de retenção observada, definida como o quociente da concentração ou massa do soluto de interesse no permeado e a sua concentração ou massa na solução inicialmente alimentada. A retenção observada de um soluto i ($R_{\text{obs},i}$) pode ser calculada através da Equação 1.1, onde $C_{p,i}$ é a concentração de soluto i no permeado e $C_{f,i}$ é a concentração do soluto i na solução de alimentação.

$$R_{\text{obs},i} = \left(1 - \frac{C_{p,i}}{C_{f,i}} \right) \quad (1.1)$$

Além da seletividade, o fluxo de permeado J_p que representa a vazão volumétrica, mássica ou molar do processo por unidade de área, é empregado para avaliar o processo de separação. O fluxo volumétrico de permeado é definido como o volume de permeado que passa através da membrana (V_p) por unidade de tempo (t) e pela área de permeação da membrana (A_m), conforme a Equação 1.2.

$$J_p = \frac{V_p}{A_m t} \quad (1.2)$$

Nas membranas porosas a seletividade está diretamente associada ao tamanho do poro da membrana e ao tamanho das partículas presentes na solução, que devem ser inertes em relação ao material de constituição da membrana. Nesse caso, o principal mecanismo de transporte é a convecção. Já as membranas densas são caracterizadas por apresentarem uma única fase, não possuindo poros em sua estrutura. Neste caso, o transporte das moléculas através da membrana ocorre nas seguintes etapas: a sorção das moléculas na superfície da membrana, a difusão através do material que constitui a membrana e por fim, a dessorção das moléculas no lado do permeado (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

Quando um soluto neutro i de concentração C_i é retido parcialmente pela membrana, a fração de solutos que não é permeada é acumulada sob a superfície até que, em estado estacionário, o fluxo convectivo de solutos em direção à membrana ($J_p * C_i$) é equilibrado pelo fluxo de soluto através da membrana ($J_p * C_{p,i}$) e pelo fluxo difusivo de soluto da superfície da membrana para o seio da alimentação ($-D_i * (\partial C_i / \partial x)$). Desta situação decorre,

em estado estacionário, o estabelecimento de um perfil de concentração adjacente à superfície da membrana (BOTELHO-CUNHA, 2010), conforme apresenta a Figura 1.3.

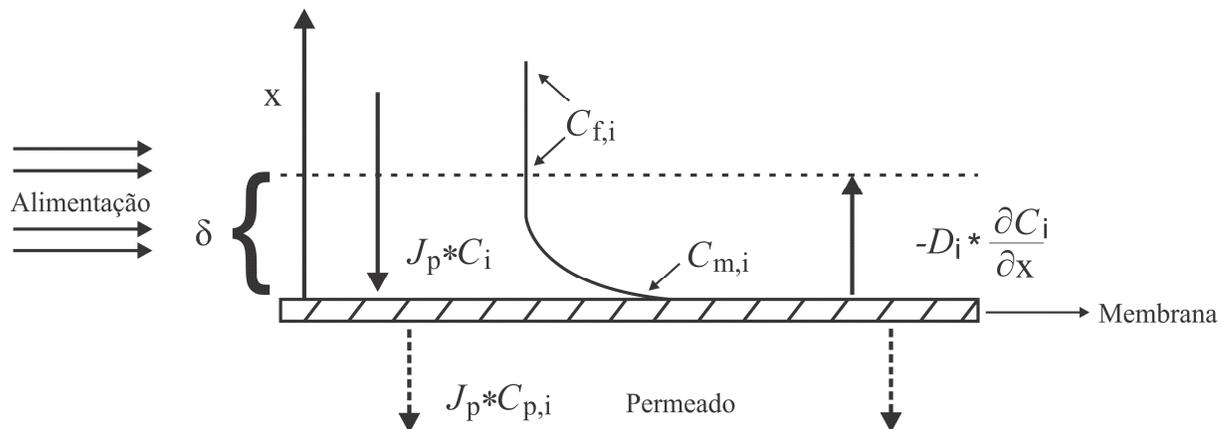


Figura 1.3 Perfil de concentração de solutos na fase fluida adjacente à superfície da membrana no estado estacionário, onde $C_{f,i}$, $C_{m,i}$ e $C_{p,i}$ são as concentrações de solutos, na alimentação, na superfície da membrana e no permeado, respectivamente, J_p é o fluxo de permeado e δ é a espessura da camada sub-laminar. Fonte: Adaptado de González-Muñoz e Parajó (2010).

O acúmulo de solutos próximo à superfície da membrana ocorre no início do processo, onde parte do solvente é removida da solução, ocasionando uma maior concentração do soluto na superfície da membrana em relação à concentração na solução alimentada. Esse fenômeno é chamado de polarização da concentração. O aumento da concentração na camada polarizada pode atingir o limite de saturação do soluto, resultando na formação da camada gel, ou camada polarizada, na superfície da membrana. Tal fenômeno ocasiona prejuízos no funcionamento hidrodinâmico do sistema, pois constitui uma barreira para o fluxo de permeado (CHERYAN, 1998).

O fenômeno de polarização da concentração é reversível. Porém, a sua ocorrência pode dar origem a outros tipos de fenômenos que podem prejudicar irreversivelmente o desempenho do processo. Como possíveis efeitos negativos da polarização da concentração pode ser mencionado o decréscimo do fluxo de permeado devido o aumento na pressão osmótica na superfície da membrana, a precipitação no caso da concentração exceder o limite de solubilidade do soluto e o favorecimento de incrustações por deposição (HO e SIRKAR, 1992).

A incrustação dos poros da membrana, por sua vez, é resultado da penetração de solutos ou de suspensões coloidais na superfície interna dos poros e também da adsorção de moléculas no material da membrana diminuindo o fluxo de permeado e alterando as características de retenção. A incrustação é caracterizada como um fenômeno irreversível e pode ser resultante de três fatores principais, ou da interação entre eles: as propriedades do material constituinte da membrana, as propriedades do soluto e os parâmetros operacionais (CHERYAN, 1998). A diferença entre a polarização da concentração e a incrustação é que na primeira as substâncias acumuladas próximas a superfície da membrana da membrana estão dissolvidas na solução e no segundo as substâncias deixaram a solução e estão depositadas na superfície ou dentro dos poros. Esses fenômenos também contribuem para aumentar a resistência à transferência de massa através da membrana (GEKAS, BARALLA e FLORES, 1998; BRUIJN *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, além das condições operacionais do processo, as características da membrana e dos solutos determinam a intensidade das incrustações. A carga superficial da membrana influencia diretamente na possibilidade de deposição de substâncias em sua superfície. A idealidade é que o soluto e a membrana apresentem cargas

idênticas entre si para aumentar a repulsão e conseqüentemente diminuir a probabilidade de deposição. Porém, interações hidrofóbicas entre os solutos e as membranas podem ser maiores que as repulsões eletrostáticas. Este fenômeno pode ser minimizado através da promoção de uma eficiente mistura da solução de alimentação, incluindo promotores de turbulência como o aumento da velocidade de circulação tangencial para que o regime turbulento seja atingido (MULDER, 2003).

Os PSM são geralmente diferenciados também em função da natureza da força motriz empregada para o transporte dos componentes através da membrana. As forças motrizes que resultam em fluxos significativos de solutos são as diferenças de potencial elétrico, de concentração e de pressão hidrostática. Dentre os PSM que utilizam a pressão como força motriz estão a microfiltração, a ultrafiltração, a nanofiltração e a osmose inversa. Esses processos se diferenciam pelo tamanho médio de poro da membrana e pela pressão aplicada necessária para promover a separação.

As membranas industriais são dispostas em módulos, que permitem acomodar grandes áreas de filtração em um pequeno espaço, cujas estruturas suportam a pressão aplicada. Os módulos devem apresentar canais para alimentação e para a remoção do permeado e do material retido. Os módulos são preparados tanto na geometria plana (placa-quadro e espiral) quanto cilíndrica (tubular, capilar e fibra-oca) (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006). Essas configurações são as estruturas que dão suporte e condicionam a membrana e devem atender às características de interesse, tais como alta área de permeação por volume ocupado, baixo custo de fabricação, facilidade de operação e limpeza, além da possibilidade e facilidade de troca da membrana. Dentre estes módulos, o espiral é constituído de várias camadas de membranas planas, suporte e espaçadores

enrolados em um tubo coletor de permeado. É o módulo mais compacto que existe atualmente no mercado, destacando-se por apresentar alta relação área/volume e baixo custo de fabricação. A Figura 1.4 apresenta as principais configurações industriais dos módulos de membranas.

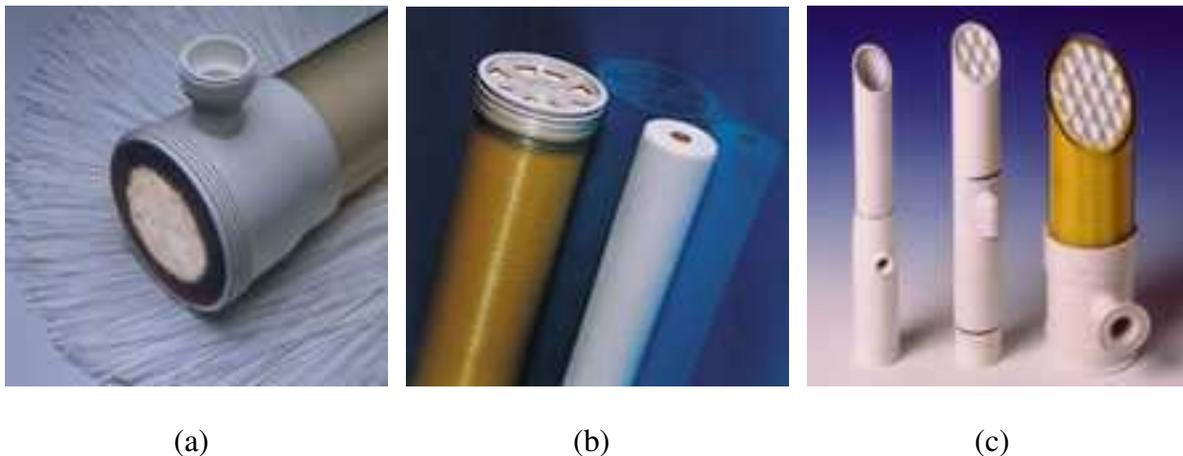


Figura 1.4 Principais configurações industriais dos módulos de membranas, (a) fibra-oca, (b) espiral e (c) tubular. Fonte: GEA Filtration (2013).

1.3.3.2 Nanofiltração

Dentre os PSM que utilizam a pressão como força motriz, a nanofiltração é a tecnologia mais recente, sendo caracterizada pela separação de moléculas com massa molar média entre 150 e 300 Da (SCHÄFER, FANE e WAITE, 2005), apresentando seletividade intermediária entre os processos de ultrafiltração e osmose inversa. Os sistemas de nanofiltração, de modo geral, requerem pressões de operação muito menores àquelas solicitadas na osmose inversa. Enquanto os processos de osmose inversa são operados na faixa de 3,5 a 10 MPa, a nanofiltração pode ser operada na faixa de 1 a 3 MPa

(MAROULIS e SARAVACOS, 2003). Por esta razão, a nanofiltração pode ser considerada economicamente favorável, se comparada à osmose (SCHÄFER, FANE e WAITE, 2005; HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

Uma unidade de separação por nanofiltração é constituída basicamente de um módulo de membrana, uma bomba de alimentação e tubulações distintas para o material retido e o permeado, além de manômetros e controladores de temperatura. A recirculação do produto concentrado é necessária para manutenção de alta vazão de alimentação com a finalidade de aumentar a eficiência da separação (MELLO, 2008). O tipo de membrana empregado no processo e sua taxa de recuperação (que é definida como a eficiência da membrana em remover sais e outros compostos da solução após sua limpeza) são os fatores que mais interferem nos custos de investimento e manutenção do processo de nanofiltração, pois afetam nas dimensões e na potência dos equipamentos utilizados (PILIPOVIK e RIVEROL, 2005).

As membranas de nanofiltração geralmente são preparadas utilizando poliamidas aromáticas, polissulfonas ou polietersulfonas. Algumas destas membranas, dependendo do tipo de material constituinte podem apresentar cargas positivas ou negativas. O material utilizado na preparação de membranas de nanofiltração é de extrema importância, pois a transferência de espécies carregadas não depende somente do tamanho dos íons, mas também de sua carga superficial (LOPES, 1999). O comportamento das membranas de nanofiltração durante o processamento dependerá das interações elétricas das espécies iônicas com a carga superficial da membrana (ALAMI-YOUNSSI *et al.*, 1995).

A nanofiltração é uma operação unitária de separação bastante versátil que apresenta diversas aplicações nos mais variados ramos industriais. Na área de tratamento de

resíduos líquidos as membranas de nanofiltração foram utilizadas com sucesso para separação de Cr(III) de solução ácidas (GOMES *et al.*, 2010) e para remoção de fósforo presente em lodo de esgoto (BLÖCHER, NIEWERSCH e MELIN, 2012). No ramo farmacêutico as membranas de nanofiltração são empregadas na purificação de medicamentos heterocíclicos (CAPELLE *et al.*, 2002) na concentração de extratos contendo antibióticos como a espiramicina (SHI *et al.*, 2006) e na purificação do ácido clavulânico (CARVALHO *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012) que é um tipo de inibidor de β -lactamases.

No entanto, a aplicação da nanofiltração no setor alimentício recebe maior destaque e consolida-se como uma técnica potencial para concentrar e/ou purificar compostos de interesse industrial. Esta técnica foi utilizada com sucesso para concentrar compostos naturais bioativos termosensíveis como antocianinas presentes em extratos de *Hibiscus sabdariffa* L. (CISSÉ *et al.*, 2011) e compostos fenólicos com propriedades antioxidantes de extratos de propólis (MELLO, PETRUS e HUBINGER, 2010; TYLKOWSKI *et al.*, 2010). A tecnologia de nanofiltração é aplicada com sucesso também na purificação de oligossacarídeos com propriedades prebióticas (GOULAS *et al.*, 2002; GRANDISON, GOULAS e RASTALL, 2002; GOULAS, GRANDISON e RASTALL, 2003) como os fruto-oligossacarídeos (LI *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; KUHN *et al.*, 2010; KUHN *et al.*, 2011), os xilo-oligossacarídeos (GULLÓN *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-MUÑOZ e PARAJÓ, 2010), a lactulose (ZHANG *et al.*, 2011) e os galacto-oligossacarídeos (FENG *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; BOTELHO-CUNHA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

1.3.3.3 Purificação de GOS por Nanofiltração

As membranas de nanofiltração têm sido aplicadas para purificar e/ou concentrar GOS obtidos de fontes distintas, como a síntese enzimática utilizando β -galactosidases e a lactose como substrato (BOTELHO-CUNHA *et al.*, 2010), leite caprino (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e principalmente misturas comerciais de GOS (GOULAS *et al.*, 2002; GRANDISON, GOULAS e RASTALL, 2002; GOULAS, GRANDISON e RASTALL, 2003; FENG *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

López-Leiva e Guzman (1995) já indicavam a nanofiltração como uma alternativa aos dispendiosos processos cromatográficos de purificação de GOS. Um módulo de filtração tangencial de osmose inversa com a membrana NFPES- 5/PP, operando a 2 MPa foi empregado em seu estudos. A membrana utilizada apresentou uma retenção de 15,4% de monossacarídeos, 37% de lactose e 74,7% de GOS. Em outro estudo, o fracionamento dos GOS obtidos através de síntese enzimática utilizando membranas de acetato de celulose preparadas através do método de inversão de fases, promoveu um aumento nas retenções de todos açúcares com o acréscimo da pressão transmembrana. Retenções de aproximadamente 90% de GOS foram verificadas neste trabalho (BOTELHO-CUNHA *et al.*, 2010).

Martinez-Ferez *et al.* (2006) desenvolveram um processo de duas etapas para separação de GOS empregando um módulo de filtração tangencial. Primeiramente, uma membrana de ultrafiltração de 50 kDa foi utilizada para retenção da caseína e permeação de GOS, lactose e proteínas solúveis. Na segunda etapa, uma membrana de 1 kDa foi utilizada e apresentou retenção de 80% dos GOS e parte da lactose, após 4 ciclos de diafiltração. A

purificação e concentração de oligossacarídeos, combinando os processos de ultrafiltração e nanofiltração, foram propostas inicialmente por Kamada *et al.* (2002). Os autores partiram de uma solução com 2,4° Brix e obtiveram um produto final com 30,3° Brix.

O potencial da nanofiltração empregando módulos de filtração tangencial para purificação de GOS, foi reportado por Goulas *et al.* (2002). Os autores utilizaram as membranas NF-CA-50 a 25°C e Desal 5-DL a 60°C ambas na pressão fixa de 1,38 MPa no processo de diafiltração contínua e verificaram uma recuperação de 14-18% de monossacarídeos, 59-89% de dissacarídeos e 81-98% de oligossacarídeos. Em estudos posteriores Goulas, Grandison e Rastall (2003) promoveram o fracionamento de uma solução contendo GOS utilizando diferentes membranas de nanofiltração em um sistema de filtração convencional. A membrana NF-TFC-50 operada a 3,0 MPa a 25°C apresentou a maior recuperação de GOS dentre as membranas testadas, aproximadamente 88% após 4 ciclos de diafiltração descontínua.

Feng *et al.* (2009) foram os primeiros pesquisadores a aproximar seus estudos acadêmicos da realidade industrial, estudando o desempenho de membranas comerciais de configuração espiral para a separação de GOS. Com a utilização de um módulo espiral de nanofiltração NF-3 (Sepro Membranes) e uma solução composta por: 19% de monossacarídeos, 45% de lactose e 36% de GOS, os autores removeram quase na totalidade os monossacarídeos e aproximadamente 50% da lactose, resultando em uma solução final de GOS com pureza de 55% (1,5 vezes superior a solução inicial).

1.3.3.4 Fatores Operacionais que Influenciam na Nanofiltração

Além da seletividade da membrana, fatores operacionais como a pressão, a temperatura, a composição e a concentração da solução de alimentação influenciam o processo de nanofiltração dos oligossacarídeos. Conforme Feng *et al.* (2009), um acréscimo na temperatura do processo geralmente ocasiona um aumento no fluxo de permeado devido à redução da viscosidade da solução e ao aumento do tamanho efetivo dos poros da membrana, contudo as retenções dos açúcares tendem a diminuir devido ao aumento no fluxo difusivo de solutos. Goulas *et al.*, (2002) verificaram que monossacarídeos são mais afetados pelo aumento da temperatura quando comparados aos dissacarídeos e aos oligossacarídeos.

Goulas *et al.* (2002) estudaram também a influência da pressão na separação de uma mistura composta por frutose, sacarose e rafinose, em proporções equivalentes, numa concentração total de 50 a 80 g/L. Os coeficientes de retenção observados para os três açúcares aumentaram com o acréscimo da pressão, devido à compactação da membrana e ao aumento do fluxo de permeado. A redução da espessura da membrana, que normalmente provoca um aumento no fluxo de permeado, também pode causar uma redução no tamanho dos poros, motivo pelo qual ocorre o aumento das retenções dos açúcares. O aumento da pressão também diminui a diferença entre as retenções observadas para os três açúcares, resultando numa separação menos efetiva.

Considerando que o mecanismo de separação nas membranas de nanofiltração ocorre por mecanismos convectivos e difusivos, um aumento na pressão causará uma diminuição nos fluxos convectivos com maior significado que nos fluxos difusivos. Assim,

na separação de solutos neutros, a importância do fluxo convectivo se torna maior à medida que o tamanho da molécula a ser separada diminui (PONTALIER, ISMAIL e GHOU, 1997). O efeito da pressão no fluxo de permeação para uma solução de GOS foi estudada por Feng *et al.* (2009). Os autores obtiveram o mesmo perfil de comportamento observado por Goulas *et al.* (2002) e ambos afirmam que a pressão ótima de operação do sistema de nanofiltração para separação de GOS não será aquela que fornece o maior fluxo de permeado, mas aquela que fornece a melhor combinação entre o fluxo de permeação e o coeficiente de retenção desejado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMI-YOUNSSI, S.; LARBOT, A.; PERSIN, M.; SARRAZIN, J.; COT, L. Rejection of mineral salts on a gamma alumina nanofiltration membrane application to environmental process. **Journal of Membrane Science**, v. 102, p. 123-129, 1995.

ARVANITOYANNIS, I. S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. V. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 5, p. 385-404, 2005.

BLÖCHER, C.; NIEWERSCH, C.; MELIN, T. Phosphorus recovery from sewage sludge with a hybrid process of low pressure wet oxidation and nanofiltration. **Water Research**, v. 46, n. 6, p. 2009-2019, 2012.

BORNET, F. R. Undigestible sugars in food products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 763-769, 1994.

BOTELHO-CUNHA, V. A.; MATEUS, M.; PETRUS, J. C. C.; PINHO, M. N. Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, n. 1–2, p. 29-36, 2010.

BOTELHO-CUNHA, V. A. **Síntese e fracionamento de oligossacarídeos a partir da lactose em reator de membrana**. Florianópolis, 2010. 247 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 19 de 1999**. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde e sua rotulagem. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 25 outubro 2011.

BRUIJN, J. P. F.; VENEGAS, A.; MARTÍNEZ, J. A.; BÓRQUEZ, R. Ultrafiltration performance of Carbosep membranes for the clarification of apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 397-406, 2003.

CAPELLE, N.; MOULIN, P.; CHARBIT, F.; GALLO, R. Purification of heterocyclic drug derivatives from concentrated saline solution by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 196, n. 1, p. 125-141, 2002.

CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T.; ÁVILA, M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 81-87, 2011.

CARVALHO, A. L.; MAUGERI-FILHO, F.; PRÁDANOS, P.; SILVA, V.; HERNÁNDEZ, A. Separation of potassium clavulanate and potassium chloride by nanofiltration: transport and evaluation of membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 83, p. 23-30, 2012.

CARVALHO, A. L.; MAUGERI-FILHO, F.; SILVA, V.; HERNÁNDEZ, A.; PALACIO, L.; PRADANOS, P. AFM analysis of the surface of nanoporous membranes: application to the nanofiltration of potassium clavulanate. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 10, p. 3356-3369, 2011.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1998.

CISSE, M.; VAILLANT, F.; PALLET, D.; DORNIER, M. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2607-2614, 2011.

FENG, Y. M.; CHANG, X. L.; WANG, W. H.; MA, R. Y. Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 3, p. 326-332, 2009.

FERSI, C.; GZARA, L.; DHAHBI, M. Treatment of textile effluents by membrane technologies. **Desalination**, v. 185, n. 1-3, p. 399-409, 2005.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.

GEA Filtration. **Tipos de Membranas**. 2009. Disponível em: <http://www.geafiltration.com/Portuguese/Tecnologia/Tipos_de_Membranas.htm>. Acesso em: 22 janeiro 2013.

GEISSER, A.; HENDRICH, T.; BOEHM, G.; STAHL, B. Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 1, p. 17-23, 2005.

GEKAS, V.; BARALLA, G.; FLORES, V. Applications of membrane technology in the food industry. **Food Science and Technology International**, v. 4, n. 5, p. 311-328, 1998.

GIBSON, J. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GOMES, S.; CAVACO, S. A.; QUINA, M. J.; GANDO-FERREIRA, L. M. Nanofiltration process for separating Cr(III) from acid solutions: experimental and modelling analysis. **Desalination**, v. 254, n. 1-3, p. 80-89, 2010.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Diafiltration of *Eucalyptus* wood autohydrolysis liquors: mathematical modeling. **Journal of Membrane Science**, v. 346, n. 1, p. 98-104, 2010.

GOULAS, A. K.; GRANDISON, A. S.; RASTALL, R. A. Fractionation of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 7, p. 675-680, 2003.

GOULAS, A. K.; KAPASAKALIDIS, P. G.; SINCLAIR, H. R.; RASTALL, R. A.; GRANDISON, A. S. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 209, n. 1, p. 321-335, 2002.

GRANDISON, A. S.; GOULAS, A. K.; RASTALL, R. A. The use of dead-end and cross-flow nanofiltration to purify prebiotic oligosaccharides from reaction mixtures. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 24, p. 915-928, 2002.

GU, Q. M. Enzyme-mediated reactions of oligosaccharides and polysaccharides. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 1999.

GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Membrane processing of liquors from *Eucalyptus globulus* autohydrolysis. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 2, p. 257-265, 2008.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI-FILHO, F. Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from *Cryptococcus* sp. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 213-221, 2008.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI-FILHO, F. Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 520-534, 2010.

HERNÁNDEZ, O.; RUIZ-MATUTE, A. I.; OLANO, A.; MORENO, F. J.; SANZ, M. L. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 9, p. 531-536, 2009.

HO, W. S. W.; SIRKAR, K. K. **Membrane Handbook**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002.

KAMADA, T.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H.; SAGLAM, N.; IWAMOTO, S. Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 5, p. 435-440, 2002.

KIMURA, K.; MATSUMOTO, K.; ISHIHARA, C.; HARADA, K.; MIYAGI, A. Structure determination of galacto-oligosaccharides by pyridylamination and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 270, n. 1, p. 33-42, 1995.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 329-347, 2008.

KUHN, R. C.; MAUGERI-FILHO, F. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 862-869, 2010a.

KUHN, R. C.; MAUGERI-FILHO, F. Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 22, p. 2023-2028, 2010b.

KUHN, R. C.; MAUGERI-FILHO, F.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. Selection of membranes for purification of fructooligosaccharides. **Water and Desalination Treatment**, v. 27, p. 18-24, 2011.

KUHN, R. C.; MAUGERI-FILHO, F.; SILVA, V.; PALACIO, L.; HERNÁNDEZ, A.; PRÁDANOS, P. Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 365, n. 1-2, p. 356-365, 2010.

LI, W.; LI, J.; CHEN, T.; CHEN, C. Study on nanofiltration for purifying fructooligosaccharides: I. operation modes. **Journal of Membrane Science**, v. 245, n. 1-2, p. 123-129, 2004.

LI, W.; LI, J.; CHEN, T.; ZHAO, Z.; CHEN, C. Study on nanofiltration for purifying fructooligosaccharides: II. extended pore model. **Journal of Membrane Science**, v. 258, n. 1-2, p. 8-15, 2005.

LOPES, C. N. **Remoção de cor de efluentes têxteis através do processo de nanofiltração**. Florianópolis, 1999. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

LÓPEZ-LEIVA, M. H.; GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 757-762, 1995.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 305-344, 2008.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 701-714, 2006.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.

MAISCHBERGER, T.; NGUYEN, T.-H.; SUKYAI, P.; KITTL, R.; RIVA, S.; LUDWIG, R.; HALTRICH, D. Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 12, p. 2140-2147, 2008.

MANERA, A. P. **Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus***. Campinas, 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F. Galactooligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 6, p. 112-119, 2010.

MANERA, A. P.; ZABOT, G. L.; OLIVEIRA, V. J.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; KALIL, S. J.; TREICHEL, H.; MAUGERI-FILHO, F. Enzymatic synthesis of

galactooligosaccharides using pressurised fluids as reaction medium. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1408-1413, 2012.

MAROULIS, Z. B.; SARAVACOS, G. D. **Food Process Design**. New York: Marcel Dekker, 2003.

MARTINEZ-FEREZ, A.; RUDLOFF, S.; GUADIX, A.; HENKEL, C. A.; POHLENTZ, G.; BOZA, J. J.; GUADIX, E. M.; KUNZ, C. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 2, p. 173-181, 2006.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; OLANO, A.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M.; JIMENO, M. L. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 557-563, 2008.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galactooligosaccharides (GOS) and their prebiotic and bifidogenic effects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MASUDA, T.; SONOBE, T.; MATSUDA, F.; HORIE, M. **Process for Fractional Separation of Multi-component Mixture**, US5198120, 1993.

MATSUMOTO, K.; NATSUKO, T.; TSUNEKAZU, W. **Method for Producing Galactooligosaccharides**, EP0272095, 1988.

MELLO, B. C. B. S. **Concentração de extratos de própolis através de membranas poliméricas**. Campinas, 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) –Universidade Estadual de Campinas.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533-539, 2010.

MONTAÑÉS, F.; OLANO, A.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E.; FORNARI, T. Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 2, p. 383-389, 2009.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Boston: Kluwer Academic, 2003.

OLIVEIRA, D. L.; WILBEY, R. A.; GRANDISON, A. S.; DUARTE, L. C.; ROSEIRO, L. B. Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 102-106, 2012.

PÉREZ-CONESA, D.; LÓPEZ, G.; ROS, G. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic follow-up infant formulas on large intestine morphology and bone mineralisation in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 6, p. 1059-1068, 2007.

PILIPOVIK, M. V.; RIVEROL, C. Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 4, p. 437-441, 2005.

PONTALIER, P. Y.; ISMAIL, A.; GHOUL, M. Mechanisms for the selective rejection of solutes in nanofiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 12, n. 2, p. 175-181, 1997.

PONTALIER, P. Y.; ISMAIL, A.; GHOUL, M. Specific model for nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 40, n. 3, p. 145-151, 1999.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, v. 65, p. 43-52, 2001.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 558-567, 1998.

SARNEY, D. B.; HALE, C.; FRANKEL, G.; VULFSON, E. N. A novel approach to the recovery of biologically active oligosaccharides from milk using a combination of enzymatic treatment and nanofiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 4, p. 461-467, 2000.

SCHÄFER, A. I.; FANE, A. G.; WAITE, T. D. **Nanofiltration: Principles and Applications**. Oxford: Elsevier, 2005.

SEN, D.; GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BHATTACHARYA, P. K.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; BHATTACHARJEE, C.; GRAS, S. L. Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 773-777, 2011.

SHI, D.; KONG, Y.; YU, J.; WANG, Y.; YANG, J. Separation performance of polyimide nanofiltration membranes for concentrating spiramycin extract. **Desalination**, v. 191, n. 1–3, p. 309-317, 2006.

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 90-109, 2002.

TYLKOWSKI, B.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M.; PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348, n. 1–2, p. 124-130, 2010.

ZHANG, Z.; YANG, R.; ZHANG, S.; ZHAO, H.; HUA, X. Purification of lactulose syrup by using nanofiltration in a diafiltration mode. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 112-118, 2011.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5–6, p. 473-479, 1998.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE NANOFILTRAÇÃO PARA PURIFICAÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Mariano Michelin¹, Andrea Limoeiro Carvalho² e Francisco Maugeri Filho¹

¹Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos; 13083-862 Campinas – SP, Brasil.

²Universidade Estadual de Feira de Santana – Departamento de Tecnologia; 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de selecionar uma membrana de nanofiltração e otimizar as condições operacionais do processo de purificação de galacto-oligosacarídeos (GOS). A partir de uma solução modelo contendo GOS e também lactose, glicose e galactose, as membranas NP010, NP030, Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL foram testadas nas condições de 3 MPa e 30°C em um sistema de escala laboratorial que simula um processo de fluxo tangencial. A membrana NP030 foi selecionada, pois apresentou nestas condições o maior valor do fator de purificação ($FP=1,68\pm 0,06$), dentre as membranas testadas. Além disso, apresentou o maior fluxo médio de permeado ($82,62\pm 1,29$ L/m²h), a maior seletividade GOS/glicose ($2,77\pm 0,22$), a maior seletividade GOS/galactose ($2,72\pm 0,32$) e a menor resistência total ao fluxo de permeado ($9,93\times 10^{13}$ m⁻¹) deferindo-se estatisticamente das demais. Após a etapa de seleção, foi conduzido um delineamento composto 2², com faces centradas e réplicas nos pontos centrais, totalizando 11 ensaios, variando a pressão de operação do sistema (2 a 4 MPa) e a temperatura do processo (15 a 55°C). As condições de 3 MPa e 35°C resultaram nos maiores valores de FP ($>1,77$). Um processo de diafiltração descontínua foi realizado com a finalidade aumentar a pureza da solução retida e verificou-se que após o 1º ciclo de diafiltração o valor de FP de 1,87 manteve-se constante até a 4º ciclo de diafiltração. As micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a membrana NP030 apresentou deposições de solutos e adesão de micro-organismos na superfície filtrante após a sua utilização e lavagem com água, indicando a necessidade de um monitoramento das incrustações e do *biofouling* para sua reutilização posterior. As análises das micrografias do suporte da

membrana indicaram uma possível compactação física da membrana. Com os resultados observados é possível afirmar que a membrana NP030 pode ser utilizada para purificação parcial de galacto-oligossacarídeos presentes em uma mistura de açúcares.

Palavras-chave: pressão, diafiltração, temperatura, galacto-oligossacarídeos e nanofiltração.

2.1 INTRODUÇÃO

Os GOS são carboidratos neutros não digestíveis (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012) formados por monômeros de galactose (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; CARDELLE-COBAS *et al.*, 2011). Estes oligossacarídeos são classificados como compostos prebióticos (GIBSON *et al.*, 2004) pois passam sem serem digeridos na parte superior do trato gastrointestinal humano servindo no cólon como substrato para proliferação de bactérias benéficas a saúde (CARDELLE-COBAS *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2011). Estas bactérias sintetizam ácidos graxos de cadeia curta que são relatados como fonte de energia para alguns tecidos, além de ser potenciais agentes da diminuição do risco de obtenção do câncer de cólon em modelos animais (POOL-ZOBEL, 2005). Por essa razão, os GOS estão sendo cada vez mais utilizados em formulações de alimentos industrializados, tais como alimentos infantis e produtos lácteos funcionais (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

Os GOS são produzidos a partir de substratos ricos em lactose pela atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase, igualmente responsável pela reação de hidrólise da lactose, formando galactose e glicose (MARTINS e BURKERT, 2009). O processo de hidrólise e a reação de transgalactosilação ocorrem simultaneamente fazendo

com que a conversão da lactose siga um modelo enzimático de inibição competitiva pelo substrato. Os produtos finais da reação enzimática são oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e grandes quantidades de mono- e dissacarídeos residuais (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; MONTAÑÉS *et al.*, 2009). A separação dos GOS dos demais açúcares é um fator positivo para melhoria da qualidade do produto final, pois esses açúcares não contribuem com as propriedades benéficas dos oligossacarídeos de maior massa molar.

Nos últimos anos diversos processos foram empregados para purificação de misturas contendo GOS como: técnicas de cromatografia de exclusão molecular e tratamento com carvão ativado (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009), tecnologia supercrítica (MONTAÑÉS *et al.*, 2009), oxidação enzimática (MAISCHBERGER *et al.*, 2008) e precipitação com etanol (SEN *et al.*, 2011). Atualmente os oligossacarídeos disponíveis comercialmente em sua maioria são purificados através de resinas de troca iônica. Entretanto, as membranas de nanofiltração são uma alternativa a essas técnicas por apresentarem diversas vantagens como a economia de energia, baixo custo de implementação e manutenção de plantas, simplicidade de operação e de ampliação de escala. Além disso, os resultados experimentais de purificação de GOS por esta técnica, inicialmente investigada por Goulas *et al.* (2002) apontam a nanofiltração como uma técnica para purificação parcial de GOS com aplicação potencial em escala industrial.

Em processos de separação utilizando membranas de nanofiltração, além da sua própria seletividade, a pressão aplicada no processo, a temperatura, a concentração da solução inicialmente alimentada e o material de constituição da membrana são fatores que afetam diretamente na purificação da solução de interesse (KUHN *et al.*, 2011). A seleção

da membrana de nanofiltração e a definição das condições operacionais ótimas são fatores determinantes para obtenção de resultados de pureza satisfatórios. Portanto, este trabalho tem o objetivo de selecionar uma membrana de nanofiltração para purificação de GOS, otimizar as condições operacionais do processo de purificação e avaliar a morfologia da membrana antes e depois de sua utilização.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Solução GOS-modelo

Foi utilizada em todos os ensaios de nanofiltração uma solução formulada com açúcares comerciais, denominada solução GOS-modelo, com concentração de açúcares totais de aproximadamente 100 g/L e composição semelhante a obtida na reação de transgalactosilação da lactose pela enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, contendo: 16,6% (m/m) de GOS, 17,7% (m/m) de lactose, 47,1% (m/m) de glicose e 18,64% (m/m) de galactose (MANERA, 2010). Para isso, foram utilizadas glicose, galactose e lactose de grau analítico (Synth[®], São Paulo, Brasil) e uma mistura de GOS em pó com nome comercial Bioligo[™] GL 4630 (Corn Products International, Seul, Coréia do Sul) contendo 4,75% (m/m) de umidade e 90,6% (m/m) de GOS, conforme especificações do fabricante.

2.2.2 Membranas

Foram utilizadas cinco membranas de nanofiltração, suas principais características estão apresentadas na Tabela 2.1. As membranas NP010 e NP030 são produzidas pela Microdyn-Nadir[®] (Wiesbaden, Alemanha) e as membranas Desal 5-DL, Desal 5-HL e Desal 5-DK são produzidas pela GE Water & Process Technologies (Treviso, Estados Unidos).

Tabela 2.1 Principais propriedades das membranas de nanofiltração.

| Membrana | Propriedade | | | | |
|------------|------------------------|------------------|----------------------|-------------------------|-------------|
| | MWCO (Da) ¹ | Material | Pressão Máxima (MPa) | Temperatura Máxima (°C) | Faixa de pH |
| NP010 | 1000 | PES ² | 4 | 95 | 0-14 |
| NP030 | 400 | PES | 4 | 95 | 0-14 |
| Desal 5-DL | 150-300 | PA ³ | 4 | 50 | 3-10 |
| Desal 5-HL | 150-300 | PA | 4 | 50 | 3-10 |
| Desal 5-DK | 150-300 | PA | 4 | 50 | 3-10 |

¹Kuhn *et al.*, (2010); ²Polietersulfonas; ³Poliamidas aromáticas.

2.2.3 Sistema de Filtração

Foi utilizado um sistema de filtração de escala laboratorial (Trevisan Tec. LTDA, Campinas, Brasil) que simula um processo de filtração tangencial, cujo diagrama esquemático e a ilustração estão apresentados na Figura 2.1.

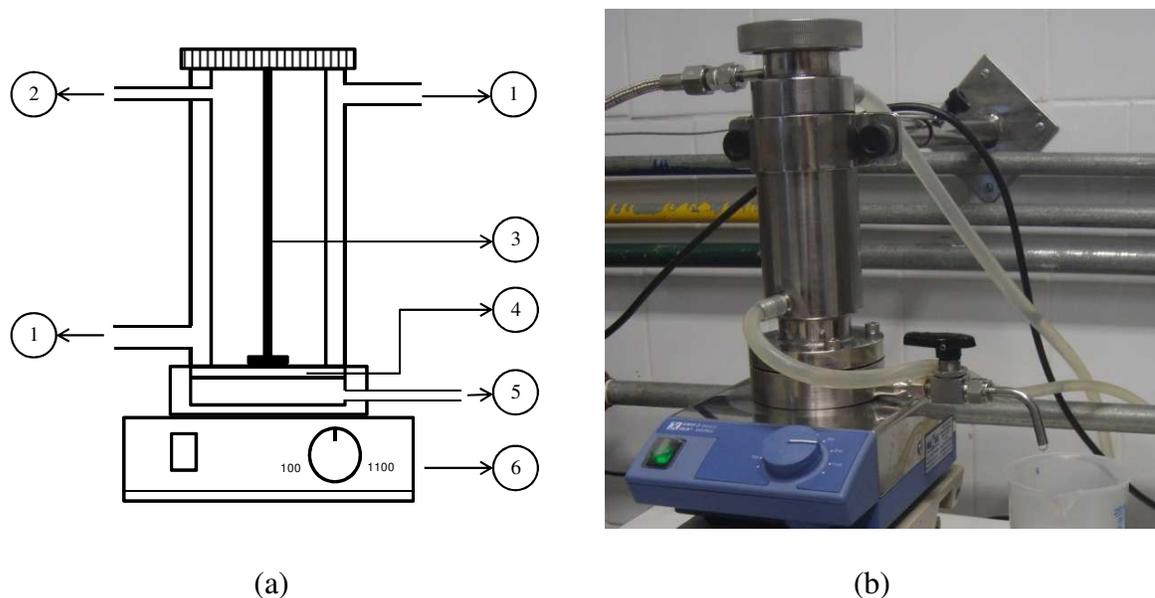


Figura 2.1 (a) Diagrama esquemático do sistema de filtração, onde (1) entrada e saída da camisa de aquecimento, (2) entrada de gás nitrogênio para pressurização da célula, (3) suporte do bastão magnético, (4) suporte do disco de membrana, (5) saída de permeado e (6) agitador magnético. (b) Ilustração do sistema de filtração.

A célula de filtração é construída em aço inoxidável, composta de um cilindro encamisado com 20 cm de altura e 4,4 cm de diâmetro interno apresentando um volume útil de 200 mL. A base do cilindro possui uma válvula que permite a liberação do material permeado. Sobre a base é montado um suporte que serve de apoio ao disco de membrana que tem área efetiva de permeação de 15,2 cm². Abaixo da base é acoplado um agitador magnético (IKA[®] KMO 2 Basic, Alemanha) que promove a agitação da solução alimentada com a finalidade de aumentar o fluxo de permeado, diminuindo o efeito da resistência devido à camada polarizada que se forma sobre a membrana e também simula uma corrente tangencial de alimentação à membrana. Anéis de vedação impedem o vazamento entre as partes. Na parte superior do cilindro, encontra-se uma entrada de gás nitrogênio (Air

Liquide Brasil, São Paulo, Brasil) para pressurização do sistema gerando a força motriz do processo. A temperatura é controlada por meio da circulação de água na camisa do equipamento, através de um banho termostático (Tecnal TE-184, Piracicaba, Brasil).

2.2.4 Ensaios de Nanofiltração

2.2.4.1 Seleção da Membrana

As cinco membranas de nanofiltração foram condicionadas durante 12 h na temperatura de 25° C em água ultrapura com condutividade elétrica de 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ obtida através do sistema Direct-Q 3 (Millipore, Bedford, Estados Unidos). Ensaios foram conduzidos utilizando as membranas em condições fixas de pressão, temperatura e agitação magnética de 3 MPa, 30°C e 900 rpm, respectivamente. Inicialmente o sistema foi alimentado com 200 mL de solução GOS-modelo e após a estabilização da temperatura do sistema e a pressurização da célula com gás nitrogênio, a válvula que permite a saída do material permeado foi liberada. Volumes de permeado foram quantificados em função do tempo e o processo era finalizado após o recolhimento de 150 mL de solução de permeado, indicando um razão de volume reduzido (*RVR*) igual a 4. Amostras das frações retidas e permeadas foram separadas no final do processo para posteriores quantificações cromatográficas dos açúcares.

Na etapa de seleção da membrana foram considerados os seguintes parâmetros para avaliação do processo de separação: retenção de GOS, retenção de lactose, retenção de glicose, retenção de galactose, seletividade GOS/lactose, seletividade GOS/glicose, seletividade GOS/galactose, fator de purificação (*FP*), fator de concentração (*FC*), fluxo de

permeado (J_p), permeabilidade hidráulica (L_p) e a resistência total ao fluxo de permeado (R_T) e suas contribuições (%). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e as determinações analíticas em duplicatas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando detectadas diferenças significativas entre as médias ao nível de significância 5% ($p < 0,05$) ao teste de comparação de média de *Tukey*.

2.2.4.2 Delineamento Composto de Faces Centradas (DCFC)

Para a avaliação da influência das condições operacionais no fator de purificação de GOS e nos fluxos de permeado e solutos utilizando a membrana selecionada, foi conduzido um DCFC 2^2 com faces centradas e réplicas nos pontos centrais, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes estudadas foram a pressão de operação do sistema (2 a 4 MPa) e a temperatura (15 a 55°C). A principal variável dependente avaliada foi o fator de purificação (FP), pois essa é a resposta que melhor representa a eficiência do processo. Além dos valores de FP , os fluxos volumétricos de permeado (J_p) e os fluxos mássicos de solutos ($J_{s,i}$) foram avaliados em todas as condições experimentais.

Todos os ensaios foram conduzidos utilizando 200 mL de solução GOS-modelo, com agitação magnética fixada em 900 rpm, utilizando a membrana previamente condicionada por 12 h a 25°C em água ultrapura. Assim como na etapa da seleção da membrana, volumes de permeado foram quantificados em função do tempo e o processo foi finalizado após o recolhimento de 150 mL de solução permeado, indicando um RVR igual a 4. Da mesma forma, amostras das frações retidas e permeadas foram separadas no final do

processo para posteriores determinações analíticas. Os resultados foram analisados através do *software* Statistica 7.0.

2.2.4.3 Diafiltração Descontínua

Procedeu-se à diafiltração descontínua com a finalidade de aumentar a pureza da solução através de diluições sucessivas do material retido. A Figura 2.2 apresenta o diagrama de fluxo das etapas da diafiltração descontínua. Este processo foi feito utilizando a membrana previamente selecionada e conduzido nas condições otimizadas de pressão e temperatura com velocidade de agitação fixa de 900 rpm. Após o processo de nanofiltração, quatro etapas de diafiltração foram conduzidas. Volumes de permeado foram quantificados em função do tempo e cada ciclo de diafiltração foi finalizado após o recolhimento de 150 mL de solução permeada. Após cada diafiltração, amostras do material retido e permeado foram separadas para posteriores determinações analíticas.

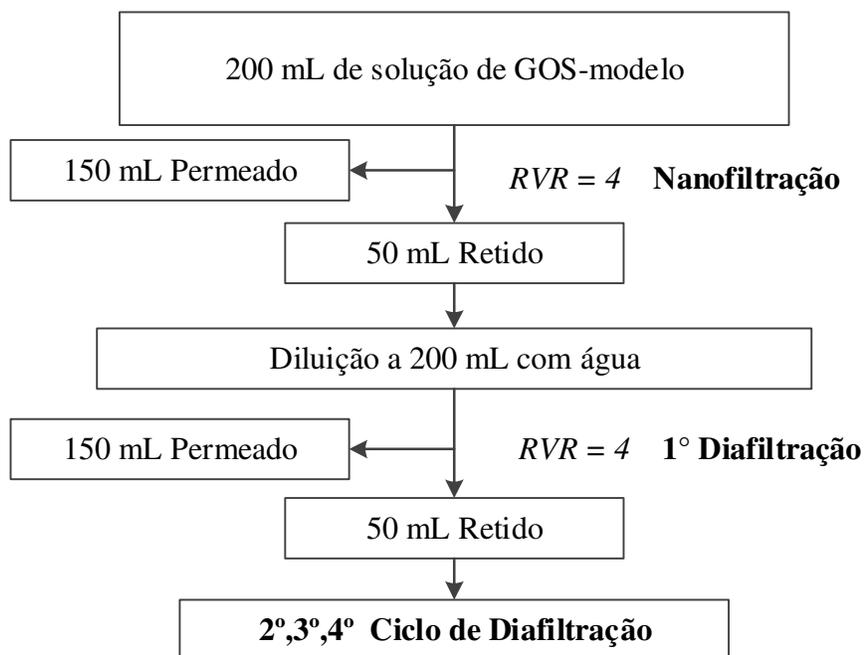


Figura 2.2 Diagrama de fluxo das etapas da diafiltração descontínua.

2.2.5 Considerações Matemáticas

O fluxo volumétrico de permeado (J_p) foi calculado através da Equação 2.1. Onde V_p é o volume acumulado de permeado, t é o tempo para o acúmulo de V_p e A_m é área de permeação da membrana.

$$J_p = \frac{V_p}{A_m t} \quad (2.1)$$

A permeabilidade hidráulica (L_p) das membranas foi determinada através da Equação 2.2. O fluxo volumétrico de um solvente puro como a água (J_w), segundo a Lei de Darcy aumenta linearmente com o aumento da pressão. Um gráfico da função $J_w = f(\Delta P)$

permite a obtenção de L_p , que corresponde ao coeficiente angular da equação linear obtida (KUHN *et al.*, 2011; ABIDI *et al.*, 2012). Onde, ΔP é a pressão transmembrana e J_w é o fluxo volumétrico de água pura.

$$J_w = L_p \Delta P \quad (2.2)$$

O coeficiente de retenção observado de cada soluto i ($R_{obs,i}$) foi determinado conforme a Equação 2.3 (CARVALHO, 2011). Onde $m_{p,i}$ é a massa do soluto i presente na fração permeada e $m_{f,i}$ é a massa do soluto i presente na solução alimentada.

$$R_{obs,i} = \left(1 - \frac{m_{p,i}}{m_{f,i}} \right) \quad (2.3)$$

A seletividade das membranas ($S_{i,j}$) foi calculada através da razão entre o coeficiente de retenção observado para o soluto i ($R_{obs,i}$) e para o soluto j ($R_{obs,j}$) (PRUKSASRI, 2007), conforme a Equação 2.4.

$$S_{i,j} = \frac{R_{obs,i}}{R_{obs,j}} \quad (2.4)$$

A razão de volume reduzido (RVR) também chamado de fator de volume concentrado foi calculado através da Equação 2.5 (GOULAS, GRANDISON e RASTALL, 2003; ATRA *et al.*, 2005; MELLO, PETRUS e HUBINGER, 2010). Onde V_f é o volume de solução alimentada no sistema e V_r é o volume da fração retida.

$$RVR = \frac{V_f}{V_r} \quad (2.5)$$

A pureza de um soluto i na fração retida ($Pu_{r,i}$) é calculada conforme a Equação 2.6. Onde $m_{r,i}$ é a massa do soluto i no retido e $m_{r,T}$ é a massa total de solutos na fração retida.

$$Pu_{r,i} = \frac{m_{r,i}}{m_{r,T}} 100 \quad (2.6)$$

O fator de purificação (FP) é calculado através da Equação 2.7. Onde $Pu_{f,i}$ e $Pu_{r,i}$ são as purezas do soluto i nas frações alimentada e retida, respectivamente.

$$FP = \frac{Pu_{r,i}}{Pu_{f,i}} \quad (2.7)$$

O fator de concentração (FC) de um soluto i é calculado conforme a Equação 2.8. Onde $C_{f,i}$ e $C_{r,i}$ são as concentrações do soluto i nas frações alimentada e retida, respectivamente.

$$FC = \frac{C_{r,i}}{C_{f,i}} \quad (2.8)$$

Conforme a Lei de Darcy, a resistência total do sistema de membrana (R_T) ao fluxo de permeado, pode ser obtida através da Equação 2.9. Onde ΔP é a pressão transmembrana,

J_p é o fluxo volumétrico de permeado e μ_p é a viscosidade dinâmica da solução de permeado (CISSÉ *et al.*, 2011).

$$R_T = \frac{\Delta P}{J_p \mu_p} \quad (2.9)$$

A resistência intrínseca da membrana (R_m), também denominada de resistência da membrana “virgem” é calculada conforme a Equação 2.10, relacionando a pressão transmembrana, o fluxo volumétrico de água pura (J_w) e a viscosidade dinâmica da água pura (μ_w) (CISSÉ *et al.*, 2011).

$$R_m = \frac{\Delta P}{J_w \mu_w} \quad (2.10)$$

A resistência à permeação provocada pelas incrustações dos poros da membrana (R_f), é calculada através da relação entre a pressão transmembrana, o fluxo de água pura verificado após a utilização da membrana (J_w'), a resistência intrínseca da membrana (R_m) e a viscosidade da água pura (μ_w), conforme Equação 2.11.

$$R_f = \frac{\Delta P}{J_w' \mu_w} - R_m \quad (2.11)$$

Após determinação da resistência total do sistema e das contribuições das resistências intrínsecas da membrana e devido as incrustações, a resistência ao fluxo de

permeado provocado pela formação da camada polarizada (R_p) pode ser calculada através da Equação 2.12.

$$R_T = R_m + R_f + R_p \quad (2.12)$$

2.2.6 Determinações Analíticas

2.2.6.1 Concentração de Açúcares

A quantificação de todos os açúcares (glicose, lactose, galactose e GOS) foi determinada por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), utilizando o cromatógrafo Dionex[®] (Sunnyvale, Estados Unidos) equipado com a coluna Carbopac PA-1 (4x250 mm), uma coluna de guarda Carbopac PA-1 (4x50 mm), bomba GP50, detector eletroquímico ED40 e o *software* PEAKNET. A coluna foi equilibrada com NaOH 150 mM e os açúcares eluídos com NaOH 20 mM a uma vazão de 1 mL/min. Antes de sua injeção no sistema, as amostras foram filtradas (0,22 μ m) e diluídas convenientemente.

2.2.6.2 Viscosidade

A viscosidade dinâmica das soluções foram determinadas através de um microviscosímetro capilar (Anton Paar, Modelo AMVn, Austria) de 1,6 mm de diâmetro (0,3-10 mPas) previamente calibrado com fluido padrão IPT-77 OP-6. A determinação foi realizada a 20°C, através de média de 14 observações em diferentes ângulos.

2.2.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da membrana selecionada antes e 30 dias após sua utilização nas condições otimizadas, foi analisada por MEV em microscópio eletrônico modelo JEOL JSM 6360 LV sob vácuo com aceleração de feixe de elétrons de 10 kV. Para a obtenção das imagens, as amostras foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas com ouro/paládio em um metalizador modular (BAL-TEC, Modelo MED-020,).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Seleção da Membrana de Nanofiltração

As respostas avaliadas nos ensaios de purificação de GOS utilizando diferentes membranas de nanofiltração na pressão de 3 MPa e temperatura de 30°C, são apresentadas na Tabela 2.2. As retenções observadas pelas membranas são dependentes de algumas condições de processo como: pressão, temperatura, velocidade de agitação, concentração e perfil de solutos na corrente de alimentação. Para uma mesma membrana, operando nas mesmas condições de processo, a polarização da concentração deve ser semelhante para todos os solutos e, portanto, as diferenças relativas entre as retenções observadas podem ser consideradas constantes. Nestas condições é possível comparar o desempenho de membranas distintas através dos valores da retenção observada, definindo assim, a membrana mais apropriada para um determinado processo (KUHN *et al.*, 2011).

É possível verificar através da Tabela 2.2 que a membrana de nanofiltração Desal 5-HL apresenta a maior retenção de GOS ($0,99 \pm <0,01$), diferindo-se significativamente

($p > 0,05$) das demais membranas testadas. Apesar de apresentar coeficientes de retenção de GOS significativamente menores ($p > 0,05$), as membranas NP010 e NP030 apresentam também retenções de lactose, glicose e galactose significativamente menores ($p > 0,05$) e seletividades significativamente maiores ($p > 0,05$) que as membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL, indicando uma separação mais eficaz dos GOS dos demais açúcares. As seletividades GOS/lactose apresentadas pelas membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL indicam que essas membranas não possuem capacidade de separar esses dois açúcares.

Tabela 2.2 Médias (\pm desvios padrões) das respostas avaliadas para a seleção da membrana de nanofiltração.

| Membranas | $R_{obs,i}$ | | | | $S_{i,j}$ | | | |
|------------|-------------------------------|------------------------------|--|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| | GOS | Lactose | Glicose | Galactose | GOS/Lactose | GOS/Glicose | GOS/Galactose | |
| NP010 | 0,65 \pm 0,05 ^{d*} | 0,16 \pm 0,03 ^d | 0,19 \pm <0,01 ^c | 0,19 \pm <0,01 ^c | 3,81 \pm 0,60 ^a | 3,34 \pm 0,26 ^a | 3,63 \pm 0,14 ^a | |
| NP030 | 0,61 \pm 0,02 ^d | 0,25 \pm 0,06 ^d | 0,22 \pm 0,02 ^c | 0,23 \pm 0,02 ^c | 2,55 \pm 0,55 ^b | 2,77 \pm 0,22 ^{ab} | 2,72 \pm 0,32 ^{ab} | |
| Desal 5-DK | 0,87 \pm 0,04 ^b | 0,85 \pm 0,03 ^b | 0,35 \pm 0,09 ^b | 0,36 \pm 0,09 ^b | 1,02 \pm 0,04 ^c | 2,58 \pm 0,68 ^{ab} | 2,51 \pm 0,67 ^b | |
| Desal 5-DL | 0,79 \pm <0,01 ^c | 0,65 \pm 0,02 ^c | 0,41 \pm 0,01 ^b | 0,39 \pm 0,01 ^b | 1,21 \pm 0,03 ^c | 1,95 \pm 0,06 ^{bc} | 2,00 \pm 0,07 ^{bc} | |
| Desal 5-HL | 0,99 \pm <0,01 ^a | 0,98 \pm 0,01 ^a | 0,64 \pm 0,04 ^a | 0,71 \pm 0,05 ^a | 1,02 \pm 0,01 ^c | 1,56 \pm 0,10 ^c | 1,40 \pm 0,09 ^c | |
| | FP | FC | J_p (L/m ² h) ^{**} | L_p (m/Pas) | R_T (m ⁻¹) | Contribuição (%) | | |
| | | | | | | R_m | R_f | R_p |
| NP010 | 1,36 \pm 0,04 ^c | 1,57 \pm 0,14 ^c | 76,89 \pm <0,01 ^b | 2,61 $\times 10^{-11}$ | 1,14 $\times 10^{+14}$ | 33,43 | 19,08 | 47,49 |
| NP030 | 1,68 \pm 0,06 ^a | 1,78 \pm 0,24 ^c | 82,62 \pm 1,29 ^a | 2,25 $\times 10^{-11}$ | 9,93 $\times 10^{+13}$ | 44,67 | 31,74 | 23,59 |
| Desal 5-DK | 1,52 \pm 0,06 ^b | 2,55 \pm 0,06 ^b | 8,75 \pm 0,51 ^e | 3,65 $\times 10^{-11}$ | 1,09 $\times 10^{+15}$ | 2,51 | 1,26 | 96,23 |
| Desal 5-DL | 1,51 \pm 0,01 ^b | 1,92 \pm 0,01 ^c | 14,66 \pm 0,33 ^d | 5,24 $\times 10^{-11}$ | 6,43 $\times 10^{+14}$ | 2,97 | 2,69 | 94,34 |
| Desal 5-HL | 1,35 \pm 0,04 ^c | 4,90 \pm 0,13 ^a | 34,71 \pm 2,98 ^c | 6,57 $\times 10^{-11}$ | 2,73 $\times 10^{+14}$ | 5,57 | 9,41 | 85,02 |

* Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$);

** Fluxo de permeado médio quando $RVR = 4$.

É possível verificar também através dos resultados apresentados na Tabela 2.2, que as membranas utilizadas apresentam diferentes tendências, podendo ser divididas em dois grupos, sendo o seu material de constituição o parâmetro mais significativo para realização desta classificação. As membranas NP010 e NP030 são constituídas de polietersulfonas com valor nominal de corte (MWCO) de 1000 e 400 Da, respectivamente, e foram caracterizadas pelos menores coeficientes de retenção dos açúcares, maiores fluxos de permeado e maiores seletividades de GOS. Por outro lado, as membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL são compostas de poliamidas aromáticas com valores nominais de MWCO compreendidos entre 150-300 Da e são caracterizadas por maiores retenções de açúcares, e menores fluxos de permeado e seletividades de GOS.

As membranas NP010 e NP030, ambas constituídas de polietersulfonas apresentam seletividades GOS/lactose ($3,81 \pm 0,60$ e $2,55 \pm 0,55$, respectivamente) significativamente maiores ($p > 0,05$) quando comparadas às demais membranas. Presumivelmente, os GOS prebióticos presentes na solução GOS-modelo são dissacarídeos diferentes da lactose. Dessa forma, os GOS e a lactose apresentam uma diferença muito pequena entre suas massas molares. Portanto, para separação desses açúcares é necessário uma membrana com distribuição de poros uniforme. Possivelmente, as membranas de polietersulfonas apresentam poros com maior uniformidade que as membranas confeccionadas de poliamidas aromáticas. Goulas *et al.*, (2002) observaram que as membranas constituídas de polietersulfonas promovem uma melhor separação entre açúcares quando comparadas as membranas sintetizadas através de outros materiais.

Com relação ao fluxo de permeado, verifica-se na Tabela 2.2 que as membranas de nanofiltração apresentam valores de fluxos significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre si.

A membrana NP030 apresenta um fluxo de permeado igual a $82,62 \pm 1,29$ L/m²h, este valor é significativamente maior ($p > 0,05$) que o fluxo de permeado apresentado pela membrana NP010 ($76,89 \pm 0,01$ L/m²h), apesar de seu valor nominal de MWCO ser menor. Dentre as membranas estudadas, a Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL apresentam os menores fluxos de permeado ($8,75 \pm 0,51$; $14,66 \pm 0,33$ e $34,71 \pm 2,98$ L/m²h, respectivamente), possivelmente devido aos seus menores valores nominais de MWCO com relação às demais. Cabe ressaltar que a membrana ideal para o processo de nanofiltração para purificação de GOS deve apresentar um compromisso entre as respostas de fluxo de permeado e de retenção observada de GOS (FENG *et al.*, 2009).

Os valores das rugosidades das membranas de polietersulfonas podem ser utilizados para explicar o menor fluxo de permeado apresentado pela membrana NP010 com relação à membrana NP030. A caracterização morfológica dessas membranas através de microscopia de força atômica (AFM) indicou que a superfície da membrana NP010 apresenta uma rugosidade de 2,5 vezes maior que a membrana NP030 (CARVALHO *et al.*, 2011). Membranas rugosas apresentam uma superfície de adsorção maior que as membranas de superfície lisa (WONG, KWON e CRIDDLE, 2009). Portanto, presume-se que nessas membranas as partículas acumularam-se preferencialmente nos vales resultando na obstrução parcial dos poros, o que explicaria o fluxo menor da membrana NP010 com relação a membrana NP030.

De acordo com a Tabela 2.2, as membranas de poliamidas aromáticas são mais permeáveis à água pura quando comparadas com as membranas de polietersulfonas. A membrana Desal 5-HL apresenta a maior permeabilidade hidráulica ($6,57 \times 10^{-11}$ m/Pas) seguido das membranas Desal 5-DL ($5,24 \times 10^{-11}$ m/Pas) e Desal 5-DK ($3,65 \times 10^{-11}$ m/Pas).

As membranas de NP010 e NP030 apresentam permeabilidades hidráulicas de: $2,61 \times 10^{-11}$ e $2,25 \times 10^{-11}$ m/Pas, respectivamente. Com estes resultados não é possível detectar nenhuma relação dos valores dos fluxos de permeado e das permeabilidades hidráulicas para as membranas com os seus valores nominais de MWCO. Acredita-se portanto, que a influência dos materiais constituintes das membranas e suas interações é a explicação mais provável para as diferenças observadas.

As resistências aos fluxos de permeado e suas contribuições (%) nas diferentes membranas de nanofiltração utilizadas são apresentadas também na Tabela 2.2. É possível verificar que as membranas de poliamidas aromáticas apresentam valores de resistência total ao fluxo de permeado superiores às membranas de polietersulfonas. Esses resultados podem explicar também os menores valores de fluxo de permeado que as membranas de poliamidas aromáticas apresentaram. Para as membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL a contribuição das resistências intrínsecas e das resistências devido às incrustações dos poros é praticamente desprezível. Portanto, nessas membranas a maior contribuição para resistência ao fluxo de permeado é a formação da camada polarizada, contribuindo 96,23, 94,34 e 85,02% na resistência total do sistema, para a Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL, respectivamente.

As membranas NP010 e NP030 apresentam resistências totais ao fluxo de permeado menores que as membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL. Tais resultados podem estar relacionados com a maior dificuldade dos açúcares em penetrar nos poros das membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL que apresentam valor nominal de MWCO menor, formando uma camada polarizada de maior espessura que nas membranas NP010 e NP030. Esta suposição é confirmada pela contribuição superior a 85% da

resistência devido à formação da camada polarizada nas membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL.

A membrana NP030 apresenta contribuições semelhantes das resistências intrínsecas (44,67%), devido às incrustações (31,74%) e formação da camada polarizada (23,59%) ao fluxo de permeado. Já a membrana NP010 apresenta uma menor contribuição da resistência devido às incrustações (19,08%) e da resistência intrínseca (33,43%), já a formação da camada polarizada é responsável por aproximadamente 50% da resistência total ao fluxo de permeado. No entanto, com os resultados obtidos não foi possível observar uma correlação das resistências com os valores nominais de MWCO. A estrutura, a natureza e as interações entre os materiais constituintes das membranas é a explicação mais provável para as diferenças observadas nos valores das resistências (CISSÉ *et al.*, 2011).

De acordo com a Tabela 2.2, a partir dos resultados dos fatores de purificação e concentração, verifica-se que as membranas Desal 5-DK, Desal 5-DL e Desal 5-HL apresentam uma capacidade de concentração de GOS mais significativa que a sua capacidade de purificação. A membrana Desal 5-HL apresentou o maior fator de concentração ($4,90 \pm 0,13$) diferindo-se significativamente ($p > 0,05$) das demais membranas estudadas. Já as membranas NP010 e NP030 não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os fatores de concentração ($1,57 \pm 0,14$ e $1,78 \pm 0,24$, respectivamente). Por outro lado a membrana NP030 apresenta o maior fator de purificação ($1,68 \pm 0,06$) diferindo-se significativamente das membranas Desal 5-DK ($1,52 \pm 0,06$), Desal 5-DL ($1,51 \pm 0,01$) e das membranas NP010 ($1,36 \pm 0,04$) e Desal 5-HL ($1,35 \pm 0,04$) que apresentaram os menores fatores de purificação.

Com o exposto, a membrana NP030 foi a selecionada para estudos de otimização da purificação de GOS por nanofiltração em função da pressão e da temperatura, pois apresenta o maior fator de purificação de GOS ($1,68 \pm 0,06$) dentre as membranas estudadas. Além disso, essa membrana apresenta o maior fluxo de permeado ($82,62 \pm 1,29$), a maior seletividade de GOS/glicose ($2,77 \pm 0,22$) e a maior seletividade GOS/galactose ($2,72 \pm 0,32$). O fator de purificação é a resposta mais relevante em um processo de purificação através de membranas de nanofiltração. Uma melhoria no grau de pureza da solução retida poderá ser observada com o estabelecimento de condições operacionais como pressão e temperatura otimizadas.

2.3.2 Delineamento Composto de Faces Centradas (DCFC)

A influência da pressão e da temperatura no processo de purificação de GOS utilizando a membrana NP030 foi estudado através de um DCFC 2^2 , com faces centradas e tréplicas nos pontos centrais. A matriz dos ensaios realizados e as respostas observadas estão apresentadas na Tabela 2.3. É possível observar que todos os ensaios apresentam valores de $FP > 1,00$. Estes resultados indicam a ocorrência da purificação da solução GOS-modelo em todas as condições de pressão e temperatura estudadas.

Os maiores valores de FP ($\sim 1,80$) foram observados nos ensaios correspondentes aos pontos centrais do DCFC (3 MPa, 35°C). Já nos Ensaios 1 (2 MPa, 15°C) e 2 (4MPa, 15°C) foram verificados os menores valores de FP (1,32). Os fluxos de permeado e dos solutos também foram avaliados em função da pressão e da temperatura aplicada no processo de nanofiltração. Conforme apresenta a Tabela 2.3, o maior fluxo de permeado

dentre os ensaios conduzidos é de 349,08 L/m²h, valor correspondente ao Ensaio 8 (3MPa, 55°C) e o menor é de 49,49 L/m²h, valor correspondente ao Ensaio 1 (2 MPa, 15° C).

Tabela 2.3 Matriz do DCFC 2² de faces centradas e tréplicas nos pontos centrais com os ensaios em valores codificados e valores reais (entre parênteses) e respostas observadas.

| Ensaio | Pressão (MPa) | Temperatura (°C) | <i>FP</i> (adimensional) | <i>J_p</i> (L/m ² h)* |
|--------|---------------|------------------|--------------------------|--|
| 1 | -1(2) | -1(15) | 1,32 | 49,49 |
| 2 | 1(4) | -1(15) | 1,32 | 109,32 |
| 3 | -1(2) | 1(55) | 1,35 | 187,01 |
| 4 | 1(4) | 1(55) | 1,47 | 174,51 |
| 5 | -1(2) | 0(35) | 1,43 | 58,69 |
| 6 | 1(4) | 0(35) | 1,67 | 169,82 |
| 7 | 0(3) | -1(15) | 1,38 | 61,15 |
| 8 | 0(3) | 1(55) | 1,49 | 349,08 |
| 9 | 0(3) | 0(35) | 1,82 | 93,53 |
| 10 | 0(3) | 0(35) | 1,77 | 94,74 |
| 11 | 0(3) | 0(35) | 1,80 | 96,47 |

* Fluxo de permeado médio quando *RVR* = 4.

2.3.2.1 Fator de Purificação

A Tabela 2.4 apresenta os coeficientes de regressão estimados, os erros padrão, o teste *t* e o *p*-valor para a resposta *FP*. Os termos lineares da pressão e da temperatura e o termo de interação não foram estatisticamente significativos (*p*<0,05). Verifica-se ainda que são significativos (*p*<0,05) somente a média e os termos quadráticos das duas variáveis. Apesar de não ser significativo o termo linear da pressão foi considerado para obtenção do modelo reparametrizado, pois sua adição a falta de ajuste acarretaria uma redução na soma

dos quadrados da regressão e conseqüentemente uma redução na máxima variância explicável, prejudicando assim a qualidade da resposta predita pelo modelo.

Tabela 2.4 Coeficientes de regressão estimados para a resposta *FP*.

| Fator | Coeficiente de regressão | Erro padrão | <i>t</i> (5) | <i>p</i> -valor |
|---------------------|--------------------------|-------------|--------------|-----------------|
| Média* | 1,7594 | 0,0409 | 42,9319 | <0,0001 |
| Pressão (L) | 0,0600 | 0,0326 | 1,8396 | 0,1252 |
| Pressão (Q)* | -0,1536 | 0,0502 | -3,0618 | 0,0280 |
| Temperatura (L) | 0,0483 | 0,0326 | 1,4819 | 0,1984 |
| Temperatura (Q)* | -0,2686 | 0,0502 | -5,3529 | 0,0031 |
| Pressão×Temperatura | 0,0300 | 0,0399 | 0,7510 | 0,4865 |

*Parâmetros significativos ($p < 0,05$).

A Tabela 2.5 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a resposta *FP*, conforme proposto por Rodrigues e Iemma (2005). Pode ser verificada a validade do modelo matemático obtido, pela máxima variância explicável de 87,38% e pelo teste F apresentar um valor 3,71 vezes superior ao tabelado, a 95% de confiança. Obteve-se um modelo de segunda ordem para a resposta *FP* e os termos estatisticamente não significativos a 95% de confiança, exceto o termo linear da pressão, foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. Portanto, o modelo matemático empírico codificado obtido, apresentado na Equação 2.13, é adequado para descrever o comportamento dos valores de *FP* em função da pressão e da temperatura.

$$FP = 1,7594 + 0,06\text{Pressão} - 0,1536\text{Pressão}^2 - 0,2686\text{Temperatura}^2 \quad (2.13)$$

Tabela 2.5 ANOVA para a resposta *FP*.

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|
| Regressão | 0,3429 | 3 | 0,1143 | 16,15 |
| Resíduo | 0,0495 | 7 | 0,0071 | |
| Total | 0,3924 | 10 | | |

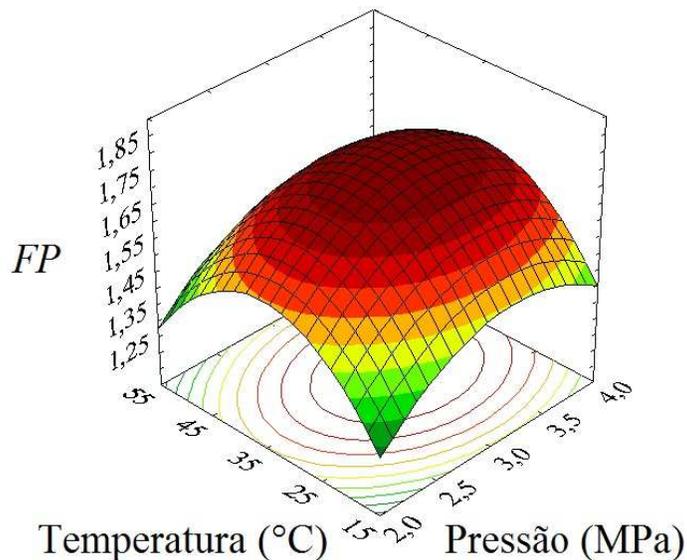
$$F_{0,05;3;7} = 4,35 \text{ e } R^2 (\%) = 87,38$$

A Tabela 2.6 apresenta os fatores de purificação observados experimentalmente e os previstos pelo modelo, além dos erros relativos. Através dos dados da Tabela 2.6 pode-se verificar que mesmo a análise estatística sendo feita a $p < 0,05$ e a ANOVA válida, têm-se erros relativos inferiores a 10%. Isto normalmente ocorre, mas na região de interesse (maiores valores de *FP*) os erros relativos são baixos considerando a complexidade do processo.

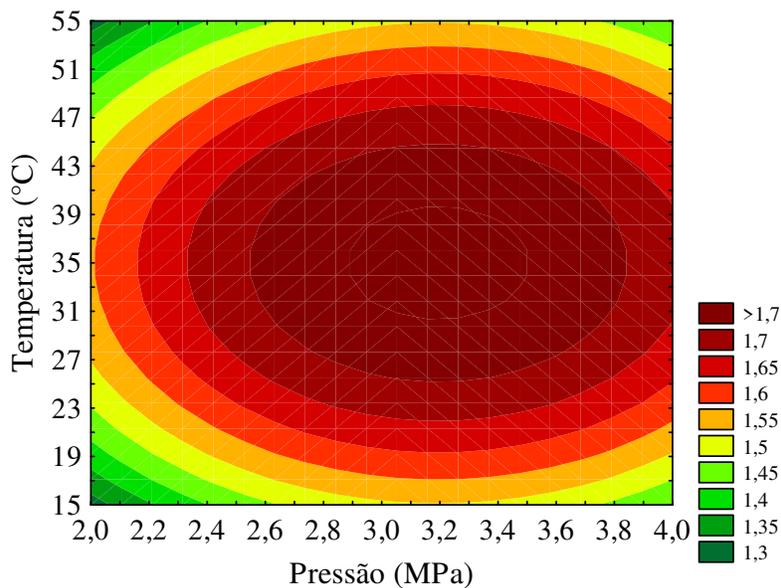
Tabela 2.6 Valores de *FP* experimentais e preditos através do modelo.

| Ensaio | <i>FP</i> observado | <i>FP</i> predito | Erro | Erro relativo (%) |
|--------|---------------------|-------------------|-------|-------------------|
| 1 | 1,32 | 1,28 | -0,04 | -3,03 |
| 2 | 1,32 | 1,40 | 0,08 | 6,06 |
| 3 | 1,35 | 1,28 | -0,07 | -5,19 |
| 4 | 1,47 | 1,40 | -0,07 | -4,76 |
| 5 | 1,43 | 1,55 | 0,12 | 8,39 |
| 6 | 1,67 | 1,67 | 0,00 | 0,00 |
| 7 | 1,38 | 1,49 | 0,11 | 7,97 |
| 8 | 1,49 | 1,49 | 0,00 | 0,00 |
| 9 | 1,82 | 1,76 | -0,06 | -3,30 |
| 10 | 1,77 | 1,76 | -0,01 | -0,56 |
| 11 | 1,80 | 1,76 | -0,04 | -2,22 |

Assim, após sua validação, o modelo matemático empírico codificado obtido para a variável dependente FP foi utilizado para a construção da superfície de resposta e da curva de contorno, conforme Figura 2.3.



(a)



(b)

Figura 2.3 (a) Superfície de resposta e (b) curva de contorno para a resposta FP em função da pressão (MPa) e da temperatura (° C).

De acordo com a Figura 2.3, valores de $FP > 1,70$ são observados em uma faixa de pressão compreendida entre 2,9 e 3,5 MPa na temperatura de 31-39° C. No entanto, o processo foi considerado otimizado nas condições referentes ao ponto central do DCCF (3,0 MPa e 35° C). Por tratar-se de uma condição experimental conduzida em tréplica de maneira aleatória, não foi necessária a realização de um experimento para validação da condição otimizada. Verifica-se também através da Figura 2.3, que na temperatura fixa de 35° C a partir de um determinado valor de pressão (2,5 MPa) um incremento nessa variável exerce uma pequena influência nos valores de FP de aproximadamente 0,05.

A compactação é um fenômeno de natureza física, provocado pelo aumento da pressão, que reduz a espessura da membrana causando uma redução no tamanho dos poros, esse fenômeno interfere diretamente no mecanismo de retenção de solutos neutros - o peneiramento, causando um aumento geral nas retenções observadas (GOULAS *et al.*, 2002). A redução da espessura da membrana devido o aumento da pressão pode modificar o valor nominal de MWCO e alterar a sua capacidade seletiva (TYLKOWSKI *et al.*, 2010). O aumento da pressão possivelmente promoveu a compactação da membrana NP030 e modificou sua capacidade seletiva, influenciando positivamente nos valores de FP observados nos ensaios de nanofiltração.

O aumento dos valores de FP concomitante ao aumento da pressão aplicada no processo também pode ser explicado pelo fenômeno da difusão-solução (WIJMANS e BAKER, 1995) e pelo tamanho dos poros da camada seletiva da membrana. A pressão crescente no processo aumenta a adsorção de água na parede interna dos poros de escala nanométrica. A água tem a capacidade de formar pontes de hidrogênio com os grupos funcionais da superfície seletiva da membrana hidrofílica, dificultando assim a passagem

dos solutos pela membrana. Quanto maior é a molécula do soluto, que geralmente apresenta pouca interação com o material da membrana, maior será a dificuldade da sua entrada nos poros devido à repulsão estérica (SRIDHAR, KALE e KHAN, 2002; MURTHY *et al.*, 2005). Dessa forma, acredita-se que com o aumento da pressão os açúcares maiores (GOS) tiveram sua passagem restringida e os menores tiveram passagem livre através da membrana, melhorando assim a separação. Por outro lado, após um valor de pressão limitante de 3,5 MPa observou-se uma pequena redução nos valores de *FP*. Tal fato pode estar relacionado com a maior influência da formação da camada polarizada na seletividade da membrana após esse valor de pressão.

A influência da temperatura no processo de nanofiltração de açúcares foi investigada por Feng *et al.* (2009) que observaram que um aumento na temperatura de 20° C para 50° C diminuiu significativamente a retenção observada de glicose, porém não exerce influência nas retenções de lactose e de GOS pela membrana NF-30 a 0,6 MPa, indicando uma separação ineficaz. Conforme Tsuru *et al.* (2000) uma vez que o transporte difusivo das moléculas é ativado devido às forças hidrodinâmicas de arraste dentro dos poros, um maior fornecimento de energia térmica para o sistema resulta no aumento da difusividade, este aumento possivelmente resulta numa diminuição da retenção de solutos pela membrana.

A redução nas retenções observadas e os menores valores de *FP* verificados neste trabalho em temperaturas elevadas podem também ser explicados pela redução na viscosidade da solução de alimentação e um possível aumento na área efetiva do poro da membrana (GOULAS *et al.*, 2002; XU, WANG e ZENG, 2005; FENG *et al.*, 2009). Esta suposição pode explicar também os resultados obtidos nas menores temperaturas, onde a

viscosidade da solução é maior e a área efetiva dos poros é menor. Portanto, conclui-se que a temperatura de 35° C é ideal para um processo de nanofiltração para purificação de GOS, pois esse valor é suficiente para reduzir a viscosidade da solução e aumentar a área do poro da membrana restringindo a passagem do soluto de interesse e permitindo a passagem dos contaminantes.

2.3.2.2 Fluxos de Permeado e Solutos

Com a finalidade de estudar a influência de diferentes pressões e temperaturas nos fluxos mássicos de GOS, glicose, galactose e lactose e no fluxo volumétrico de permeado da membrana NP030 foram conduzidos alguns experimentos adicionais, além dos propostos pelo planejamento. A influência da pressão e da temperatura no fluxo volumétrico de permeado e nos fluxos mássicos de solutos é apresentada nas Figura 2.4 e 2.5. Como mostra a Figura 2.4 (a), a membrana NP030 apresenta uma relação aproximadamente linear entre o fluxo volumétrico de permeado e a pressão aplicada no processo (na temperatura fixa de 35° C), esse comportamento foi semelhante aos observados por outros autores (GOULAS *et al.*, 2002; MURTHY *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2009).

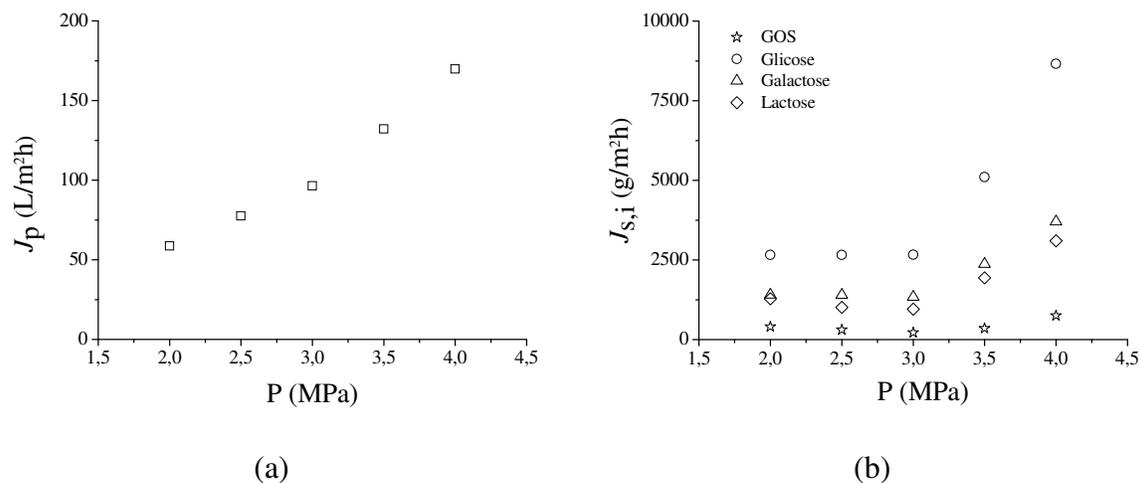


Figura 2.4 (a) Influência da pressão no fluxo volumétrico de permeado e (b) nos fluxos mássicos de solutos, ambos na temperatura fixa de 35° C.

O significado dos fluxos convectivos e difusivos dos solutos com relação à pressão de operação do processo de nanofiltração tornam-se evidentes ao observar a Figura 2.4 (b). A permeação dos açúcares não foi influenciada pela pressão até um valor limitante de aproximadamente 3 MPa, após essa pressão um aumento linear acentuado foi observado nos fluxos mássicos de glicose, lactose e galactose. Portanto, os resultados sugerem que o transporte convectivo de solutos é mais significativo que o difusivo quando o sistema é operado em pressões acima de 3 MPa. Conforme Goulas *et al.* (2002) o fluxo de solutos é diretamente dependente da pressão quando a permeação é controlada pela convecção, ao mesmo tempo em que se torna independente quando é controlado pela difusão.

Pode ser observado através da Figura 2.4 (b) também que os fluxos mássicos de glicose, galactose e lactose são maiores que os fluxos mássicos de GOS. Portanto, à medida que o tamanho molar do açúcar aumenta os fluxos mássicos diminuem. Segundo Goulas *et al.* (2002) em processos de permeação de solutos neutros em membranas de nanofiltração,

o significado do fluxo convectivo torna-se maior à medida que o tamanho molecular do açúcar a ser separado diminui (GOULAS *et al.*, 2002). Portanto, esta afirmação está de acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho.

Com relação à influência da temperatura nos fluxos de permeado, Figura 2.5 (a), observa-se que ela exerce uma influência menor na faixa compreendida entre 15° C e 35° C quando comparada a faixa entre 35° C e 55° C. A influência da temperatura no fluxo de permeado pode ser explicada através das modificações que ocorrem nas propriedades reológicas da solução de alimentação, o aumento da temperatura promove uma redução da viscosidade na solução resultando no aumento do fluxo de permeado, conforme a Lei de Hagen-Poisellue (ATRA *et al.*, 2005). Geralmente o fluxo de permeado aumenta de forma linear com o aumento da temperatura, conforme verifica-se em diversos estudos (GOULAS *et al.*, 2002; MÄNTTÄRI *et al.*, 2002; ATRA *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2009; MELLO, PETRUS e HUBINGER, 2010), diferente ao observado no presente trabalho.

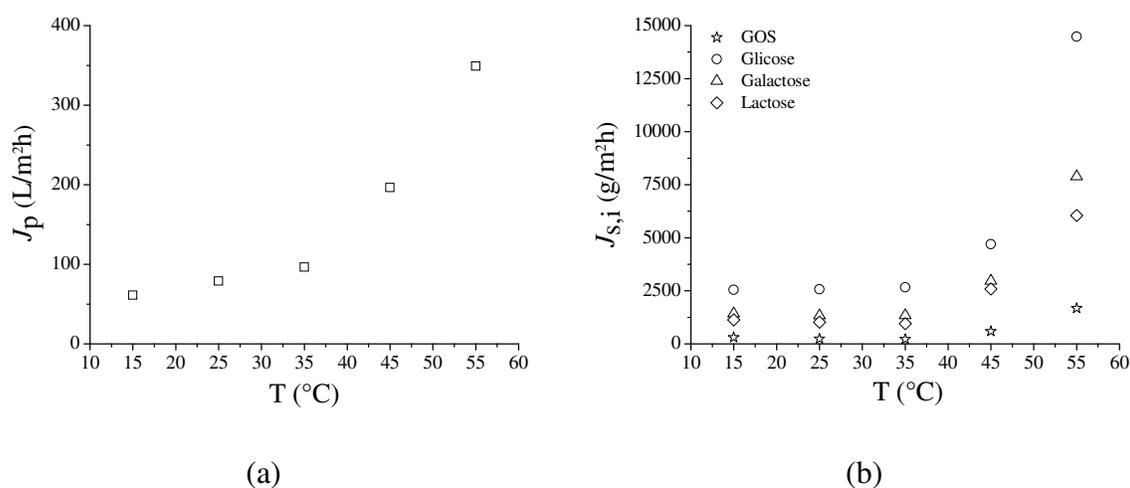


Figura 2.5 (a) Influência da temperatura no fluxo de permeado e (b) nos fluxos mássicos de solutos, ambas na pressão fixa de 3 MPa.

Conforme Tsuru *et al.* (2000) o aumento dos fluxos de permeado e de solutos em função do aumento da temperatura observado neste trabalho, podem ter diferentes explicações: (a) o aumento da energia térmica das moléculas em temperaturas mais altas permite a sua passagem através da barreira de energia gerada pelas forças de atrito na parede interna dos poros; (b) o diâmetro efetivo de permeação do poro da membrana aumenta com o aumento da temperatura devido a camada de água adsorvida na superfície hidrofílica dos poros tornar-se mais fina; (c) o aumento da temperatura reduz a viscosidade da solução e conduz a fluxos de solutos e de solventes superiores.

2.3.3 Diafiltração Descontínua

O processo de diafiltração descontínua foi realizada com a finalidade de aumentar os valores de *FP* através de 4 etapas de diluições sucessivas do material retido após a primeira nanofiltração. A Figura 2.6 apresenta o comportamento do fluxo de permeado durante a diafiltração descontínua. É possível verificar uma redução global nos fluxos de permeado em todas as etapas durante a redução do volume de 200 mL para 50 mL ($RVR=4$). Este fato está relacionado com o aumento da polarização da concentração causado pelo aumento da concentração devido à redução do solvente (GOULAS, GRANDISON e RASTALL, 2003). Observa-se também que o fluxo de permeado na nanofiltração inicial é menor que nas filtrações subsequentes. Isto ocorre pois, com a remoção de solutos contaminantes em função do número de ciclos, ocorre uma redução da pressão osmótica e, conseqüentemente, um aumento no fluxo de permeado.

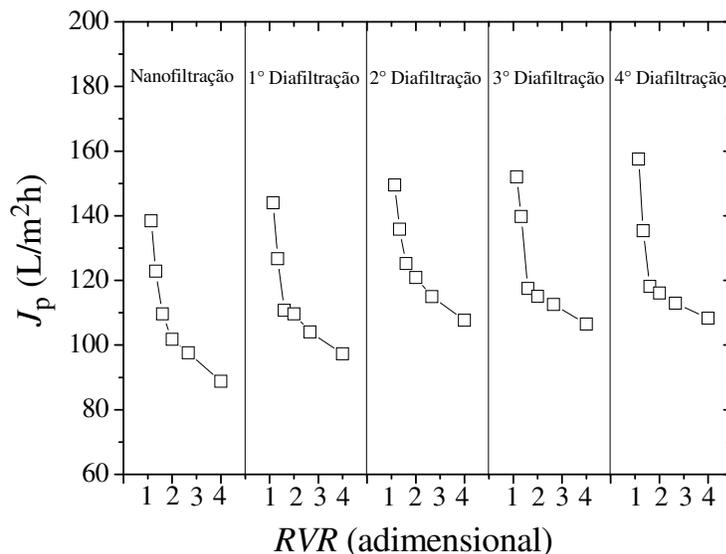


Figura 2.6 Fluxos de permeado em função da RVR durante os ciclos de diafiltração descontínua realizados a 3 MPa e 35° C com a membrana NP030.

Com relação à pureza da solução retida, é possível observar na Tabela 2.7 que a partir do primeiro ciclo de diafiltração já é possível observar um valor constante de FP (aproximadamente 1,88). Nota-se que a pureza da lactose sofre um aumento significativo durante as etapas de diafiltração descontínua, enquanto que os açúcares menores (glicose e galactose) são eliminados e suas purezas são reduzidas até aproximadamente a metade, no final do quarto ciclo. Após a primeira diafiltração a pureza de GOS torna-se praticamente constante. Esses resultados indicam que com aumento do número de diafiltrações ocorre um aumento na pureza da lactose concomitante com a pureza dos GOS.

Com estes resultados, não foi possível aumentar expressivamente os valores de FP através de etapas de lavagem da solução retida após a primeira diafiltração. Apesar da diafiltração descontínua ser uma técnica bastante empregada em processo de separação

com membranas quando se deseja eliminar contaminantes que apresentam dimensões menores que o soluto de interesse, não foi possível observar a eliminação da lactose da solução retida após quatro etapas. Possivelmente a grande semelhança da massa molar entre os GOS e lactose é o fator determinante para a dificuldade de separação desses açúcares. Após o 1° e o 4° ciclo de diafiltração é possível observar a mesma pureza de GOS. Portanto, para obtenção de uma solução de GOS com baixo teor de lactose apenas um ciclo de diafiltração é necessário.

Tabela 2.7 Valores *FP* e fluxos de permeado durante os ciclos de diafiltração descontínua.

| | <i>Pu_{r,i}</i> (%) | | | | <i>FP</i> (-) | <i>J_p</i> (L/m ² h)* |
|-----------------|-----------------------------|---------|---------|-----------|---------------|--|
| | GOS | Lactose | Glicose | Galactose | | |
| Alimentação | 18,61 | 18,35 | 43,67 | 19,37 | - | - |
| Nanofiltração | 32,93 | 20,09 | 30,31 | 16,67 | 1,77 | 88,77 |
| 1° Diafiltração | 34,78 | 25,69 | 25,77 | 13,76 | 1,87 | 97,28 |
| 2° Diafiltração | 34,95 | 29,91 | 22,56 | 12,58 | 1,88 | 107,66 |
| 3° Diafiltração | 35,06 | 32,77 | 20,58 | 11,59 | 1,88 | 106,46 |
| 4° Diafiltração | 34,79 | 34,52 | 19,47 | 11,22 | 1,87 | 108,31 |

* Fluxo de permeado médio em *RVR* = 4.

2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise microscópica permitiu a visualização estrutural da superfície filtrante e do suporte da membrana NP030 antes e 30 dias após sua utilização a 3 MPa e 35° C e sua lavagem com água, conforme as Figuras 2.7 e 2.8. Pelo fato de apresentar o melhor desempenho na purificação de GOS entre as membranas de nanofiltração estudadas, conforme visto anteriormente, a análise morfológica através de MEV foi feita somente para

a membrana NP030 após uso nas condições otimizadas de temperatura e pressão. Deve-se ressaltar que não foi possível realizar a análise microscópica da seção transversal, pois não foi possível fraturar a membrana utilizando nitrogênio líquido. Este fato pode estar relacionado à rigidez das fibras presentes no suporte da membrana. Sendo assim, a análise microscópica das superfícies da camada filtrante e do suporte permitiram a obtenção de algumas informações que reforçam alguns resultados obtidos.

Observa-se nas micrografias apresentadas nas Figuras 2.7 (1a, 2a e 3a) que a membrana NP030 possui antes da utilização uma superfície filtrante homogênea, não sendo possível observar poros aparentes. Porém, após o processo de nanofiltração, as micrografias da Figura 2.7 (1b, 2b e 3b) apresentam uma superfície filtrante com acúmulo de partículas sólidas menores que 1 μm , possivelmente cristais de açúcar. A deposição de partículas sólidas na superfície da membrana possivelmente é a responsável pela contribuição de 31,74% da resistência total do processo ao fluxo de permeado devido às incrustações (R_f), conforme se observa na Tabela 2.2.

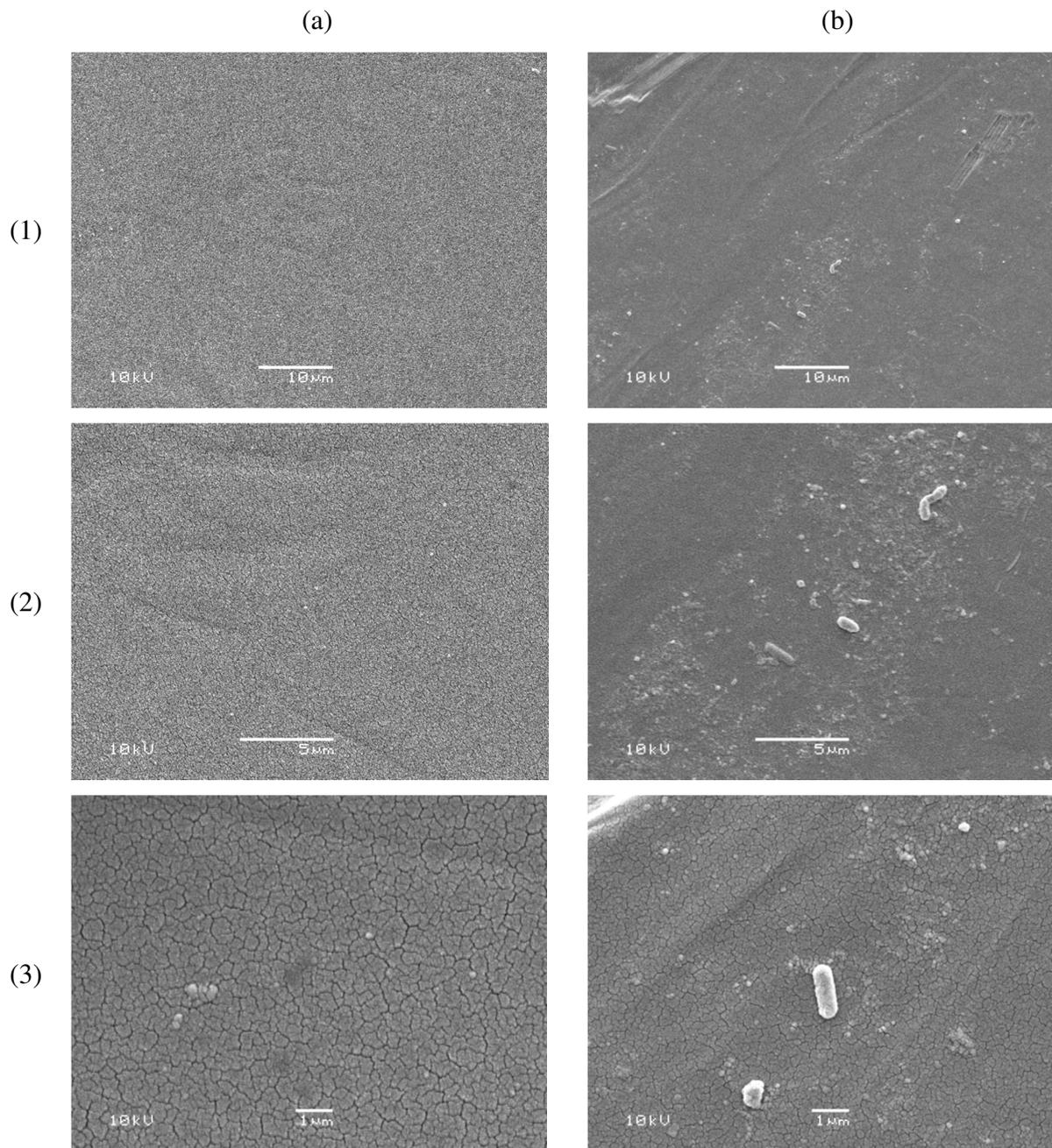


Figura 2.7 Micrografias da superfície filtrante da membrana NP030: (a) antes e (b) após a nanofiltração a 3 MPa e 35° C e aumento na magnitude de (1) 2 k, (2) 5 k e (3) 10 k.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser utilizada também como uma estratégia para monitoramento do *biofouling* em membranas, pois através da alta resolução das imagens produzidas é possível visualizar a distribuição espacial dos micro-organismos na matriz dos biofilmes (AL-JUBOORI e YUSAF, 2012). Biofilmes são comunidades microbianas que crescem ligadas à superfície da membrana. A formação dos biofilmes, invariavelmente, precede o fenômeno do *biofouling* (SCHÄFER, FANE e WAITE, 2005; VAN DER BRUGGEN, MÄNTTÄRI e NYSTRÖM, 2008). É possível observar na superfície filtrante da membrana após a utilização na Figuras 2.7 (1b, 2b e 3b) a presença de micro-organismos unicelulares, possivelmente bactérias menores que 1 μm , com formas ligeiramente alongadas e extremidades hemisféricas, sendo classificadas quanto a sua morfologia como bastonetes.

De acordo com Schäfer, Fane e Waite (2005) a formação de biofilmes em membranas de nanofiltração é iniciada pela adesão de um micro-organismo colonizador na superfície da membrana. Esta constatação pode sugerir que a formação do biofilme encontra-se em estágio inicial. Porém, apesar de todas as observações e constatações, as micrografias obtidas não fornecem informações suficientes para afirmar que a formação de biofilmes e *biofouling* ocorrem na membrana NP030 após o processo de nanofiltração da solução de GOS a 3 MPa e 30° C. Contudo, a presença de sedimentos e de micro-organismos nas superfícies, caso não sejam consideradas, podem afetar a reutilização múltipla das membranas de nanofiltração. Ações de proteção e monitoramento das incrustações e do *biofouling* são discutidas largamente na literatura (TYLKOWSKI *et al.*, 2010; AL-JUBOORI e YUSAF, 2012).

As micrografias do suporte fibroso da membrana de nanofiltração NP030 antes e depois da sua utilização são apresentadas na Figura 2.8. É possível observar que antes de sua utilização, Figura 2.8 (1a, 2a e 3a) a membrana NP030 apresenta estruturas fibrosas cilíndricas alongadas entrelaçadas, as quais servem de suporte mecânico para a camada filtrante. É possível observar nas micrografias após a utilização, apresentadas na Figura 2.8 (1b, 2b e 3b), que as fibras apresentam um desgaste moderado, uma desestruturação e uma maior proximidade uma das outras quando comparadas com a membrana virgem. Essa observação indica que a pressão aplicada no processo de nanofiltração diminui a espessura da membrana NP030 e portanto, promove a sua compactação física. A redução da espessura da membrana devido o aumento da pressão geralmente aumenta a permeabilidade de solventes (MOHAMMAD, BASHA e LEO, 2010), porém pode modificar o valor nominal de MWCO e alterar a sua capacidade seletiva (TYLKOWSKI *et al.*, 2010).

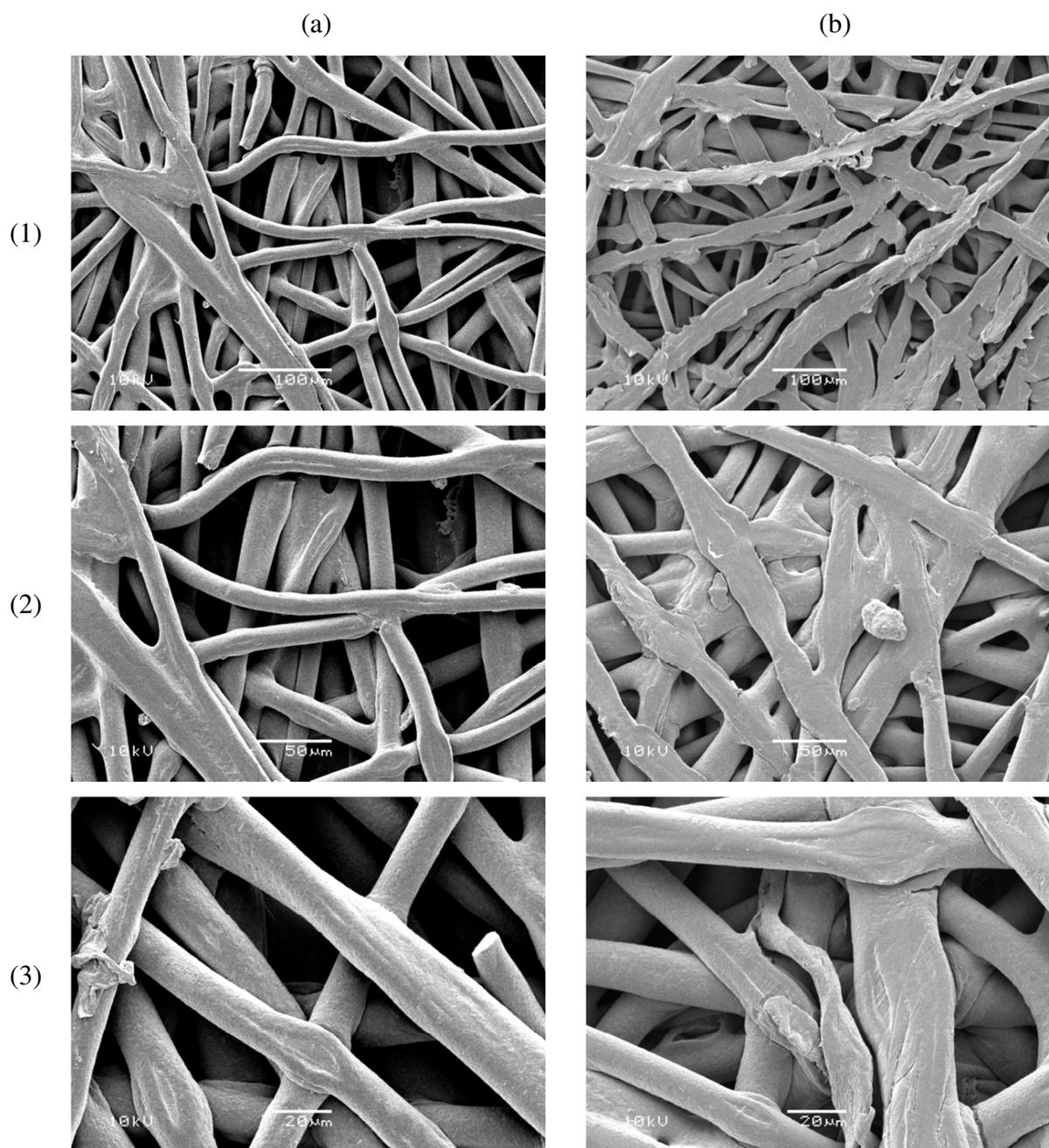


Figura 2.8 Micrografias do suporte da membrana NP030 (a) antes e (b) depois da nanofiltração a 3 MPa e 35° C e aumento na magnitude de (1) 0,25 k, (2) 0,4 k e (3) 0,8 k.

2.4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a membrana NP030 apresentou o maior valor de *FP* dentre as membranas testadas ($1,68 \pm 0,06$) diferindo estatisticamente das demais. Além disso, a membrana NP030 apresentou o maior fluxo de permeado ($82,62 \text{ L/m}^2\text{h} \pm 1,29$), a maior seletividade de GOS/glicose ($2,77 \pm 0,22$), a maior seletividade GOS/galactose ($2,72 \pm 0,32$) e a menor resistência total ao fluxo de permeado ($9,93 \times 10^{+13} \text{ m}^{-1}$). Através de um planejamento experimental DCFC 2², foi possível observar valores máximos de *FP* de aproximadamente 1,80 na temperatura de 35° C e pressão de 3 MPa. Através das micrografias foi possível observar as modificações na superfície da membrana após a utilização e a deposição de materiais sólidos, inclusive a adesão de micro-organismos na superfície da membrana, indicando a necessidade de um controle das incrustações e do *biofouling* para sua reutilização. Com os resultados obtidos pode-se afirmar que a membrana NP030 pode ser utilizada como uma técnica primária de purificação de GOS, tendo em vista a baixa seletividade GOS/lactose desses dois açúcares. Assim, para obtenção de um produto com alto grau de pureza, o que elevaria seu potencial comercial, um *design* de processo deve ser estabelecido considerando técnicas de purificação complementares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, A.; GHERRAF, N.; LADJEL, S.; RABILLER-BAUDRY, M.; BOUCHAMI, T. Effect of operating parameters on the selectivity of nanofiltration phosphates transfer through a Nanomax-50 membrane. **Arabian Journal of Chemistry**, *in press*, 2012.

AL-JUBOORI, R. A.; YUSAF, T. Biofouling in RO system: mechanisms, monitoring and controlling. **Desalination**, v. 302, p. 1-23, 2012.

ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 3, p. 325-332, 2005.

CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T.; ÁVILA, M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 81-87, 2011.

CARVALHO, A. L.; MAUGERI-FILHO, F.; SILVA, V.; HERNÁNDEZ, A.; PALACIO, L.; PRADANOS, P. AFM analysis of the surface of nanoporous membranes: application to the nanofiltration of potassium clavulanate. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 10, p. 3356-3369, 2011.

CISSÉ, M.; VAILLANT, F.; PALLET, D.; DORNIER, M. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2607-2614, 2011.

FENG, Y. M.; CHANG, X. L.; WANG, W. H.; MA, R. Y. Separation of galactooligosaccharides mixture by nanofiltration. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 3, p. 326-332, 2009.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. V.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.

GOULAS, A. K.; GRANDISON, A. S.; RASTALL, R. A. Fractionation of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 7, p. 675-680, 2003.

GOULAS, A. K.; KAPASAKALIDIS, P. G.; SINCLAIR, H. R.; RASTALL, R. A.; GRANDISON, A. S. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 209, n. 1, p. 321-335, 2002.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O.; CALVILLO, I.; LEBRÓN-AGUILAR, R.; MORENO, F. J.; SANZ, M. L. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 1220, n. 0, p. 57-67, 2012.

HERNÁNDEZ, O.; RUIZ-MATUTE, A. I.; OLANO, A.; MORENO, F. J.; SANZ, M. L. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 9, p. 531-536, 2009.

KUHN, R. C.; MAUGERI-FILHO, F.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. Selection of membranes for purification of fructooligosaccharides. **Water and Desalination Treatment**, v. 27, p. 18-24, 2011.

MAISCHBERGER, T.; NGUYEN, T.-H.; SUKYAI, P.; KITTL, R.; RIVA, S.; LUDWIG, R.; HALTRICH, D. Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 12, p. 2140-2147, 2008.

MÄNTTÄRI, M.; PIHLAJAMÄKI, A.; KAIPAINEN, E.; NYSTRÖM, M. Effect of temperature and membrane pre-treatment by pressure on the filtration properties of nanofiltration membranes. **Desalination**, v. 145, n. 1-3, p. 81-86, 2002.

MANERA, A. P. **Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus***. Campinas, 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galactooligosaccharides (GOS) and their prebiotic and bifidogenic effects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533-539, 2010.

MOHAMMAD, A. W.; BASHA, R. K.; LEO, C. P. Nanofiltration of glucose solution containing salts: Effects of membrane characteristics, organic component and salts on retention. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 4, p. 510-518, 2010.

MONTAÑÉS, F.; OLANO, A.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E.; FORNARI, T. Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 2, p. 383-389, 2009.

MURTHY, G. S.; SRIDHAR, S.; SHYAM SUNDER, M.; SHANKARAI AH, B.; RAMAKRISHNA, M. Concentration of xylose reaction liquor by nanofiltration for the production of xylitol sugar alcohol. **Separation and Purification Technology**, v. 44, n. 3, p. 221-228, 2005.

POOL-ZOBEL, B. L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. 73-90, 2005.

PRUKSASRI, S. **Production and separation of galacto-oligosaccharides from lactose by β -galactosidase immobilized on nanofiltration membranes**. Ohio, 2007. 204 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – School of The Ohio State University.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Cárita Editora:Campinas, 2009.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, M.; CARDELLE-COBAS, A.; VILLAMIEL, M.; BANGA, J. R. Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases. **Journal of Biotechnology**, v. 153, n. 3–4, p. 116-124, 2011.

SCHÄFER, A. I.; FANE, A. G.; WAITE, T. D. **Nanofiltration: Principles and Applications**. Oxford: Elsevier, 2005.

SEN, D.; GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BHATTACHARYA, P. K.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; BHATTACHARJEE, C.; GRAS, S. L. Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 773-777, 2011.

SRIDHAR, S.; KALE, A.; KHAN, A. A. Reverse osmosis of edible vegetable oil industry effluent. **Journal of Membrane Science**, v. 205, n. 1-2, p. 83-90, 2002.

TSURU, T.; IZUMI, S.; YOSHIOKA, T.; ASAEDA, M. Temperature effect on transport performance by inorganic nanofiltration membranes. **AIChE Journal**, v. 46, n. 3, p. 565-574, 2000.

TYLKOWSKI, B.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M.; PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348, n. 1-2, p. 124-130, 2010.

VAN DER BRUGGEN, B.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖM, M. Drawbacks of applying nanofiltration and how to avoid them: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 63, n. 2, p. 251-263, 2008.

WIJMANS, J. G.; BAKER, R. W. The solution-diffusion model: a review. **Journal of Membrane Science**, v. 107, n. 1-2, p. 1-21, 1995.

WONG, P. C. Y.; KWON, Y.N.; CRIDDLE, C. S. Use of atomic force microscopy and fractal geometry to characterize the roughness of nano-, micro-, and ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 340, n. 1–2, p. 117-132, 2009.

XU, L.; WANG, S.; ZENG, X. The maltitol purification and concentration by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, n. 1–3, p. 295-303, 2005.

CAPÍTULO III

PURIFICAÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR NANOFILTRAÇÃO: MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO EM ESCALA PILOTO, MECANISMOS DE INCRUSTAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DOS POROS

Mariano Michelin¹, Andrea Limoeiro Carvalho² e Francisco Maugeri Filho¹

¹*Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos; 13083-862 Campinas – SP, Brasil.*

²*Universidade Estadual de Feira de Santana – Departamento de Tecnologia; 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil.*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi purificar os galacto-oligossacarídeos (GOS) presentes numa mistura de açúcares contendo também glicose, lactose e galactose através de um processo de diafiltração utilizando um módulo espiral da membrana de nanofiltração NP030 em uma unidade piloto de fluxo tangencial e também identificar os mecanismos de incrustação devido à adsorção dos açúcares e descrever o comportamento do processo de separação através da distribuição do tamanho dos poros de permeação da membrana. Após os ensaios, foi possível observar um valor de *FP* de aproximadamente 2,55 e uma recuperação de GOS de 97,82%. Foi possível identificar os mecanismos de incrustação dos poros, e verificou-se que a glicose e a galactose seguem o modelo padrão de bloqueio. Com relação ao GOS e à lactose, observa-se que, sua adsorção no material da membrana corresponde a uma modelo de bloqueio parcial do poro. Através da distribuição do tamanho dos poros de permeação da NP030 foi possível verificar com a probabilidade de 68,3% que o diâmetro médio está contido no intervalo entre 1,94-3,47 nm. Com os resultados verifica-se que a membrana NP030 tem potencial de utilização em larga escala na purificação parcial de GOS obtidos através de síntese enzimática.

Palavras-chave: adsorção, diafiltração, membrana, resistência, nanofiltração e GOS.

3.1 INTRODUÇÃO

Os GOS são oligossacarídeos não digestíveis, constituídos de 2 a 20 moléculas de galactose e uma molécula de glicose terminal, e são reconhecidos como importantes ingredientes prebióticos, pois estimulam a proliferação de bactérias ácido-lácticas e bifidobactérias no intestino humano (MANERA *et al.*, 2012). Tornaram-se foco de grande atenção nos últimos anos como alimentos funcionais, pelo reconhecimento de seus benefícios para saúde humana e também pelo seu potencial para melhoria da qualidade de diversos produtos alimentícios (MANERA *et al.*, 2010). Devido as propriedades benéficas para saúde e também a seu potencial tecnológico, os GOS estão sendo utilizados atualmente como adoçantes de baixa caloria em produtos lácteos fermentados, produtos de confeitaria e bebidas (PARK e OH, 2010).

Os GOS são encontrados naturalmente em vegetais como o alho, a cebola, a soja e nas raízes de chicória. No entanto, as quantidades observadas de GOS nos extratos obtidos através dessas fontes são insuficientes para sua utilização industrial como ingredientes prebióticos. Por esta razão, o desenvolvimento de processos químicos ou enzimáticos de produção de GOS são necessários (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999; MANERA *et al.*, 2012). Os GOS disponíveis comercialmente são obtidos através de uma série de reações catalisadas pelas enzimas β -galactosidases. O mecanismo de reação da enzima β -galactosidase inclui a hidrólise parcial da lactose e a transgalatosilação da galactose (MAHONEY, 1998). O produto final é formado por GOS com diferentes graus de polimerização e quantidades significativas de mono- e dissacarídeos residuais (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Portanto, a separação dos GOS dos demais açúcares presentes

no produto final da síntese enzimática é necessária para obtenção de um material com elevado grau de pureza, garantindo assim as suas propriedades funcionais.

A micro- e a ultrafiltração são processos comerciais amplamente aplicados nas indústrias de alimentos e de biotecnologia para concentração de oligossacarídeos de elevada massa molar. No entanto, os produtos comerciais obtidos através dessas técnicas podem conter açúcares de baixa massa molar, que como já mencionado anteriormente, não apresentam propriedades prebióticas. Portanto a nanofiltração apresenta-se como uma alternativa potencial para ser aplicado em escala industrial para concentração e/ou purificação de misturas de oligossacarídeos (KUHN *et al.*, 2010). A nanofiltração têm sido empregada com sucesso em escala laboratorial para purificação de oligossacarídeos obtidos através de síntese enzimática (BOTELHO-CUNHA *et al.*, 2010; KUHN *et al.*, 2010; KUHN *et al.*, 2011).

As vantagens para utilização da nanofiltração para purificação de GOS industrialmente em relação a outras alternativas seriam o baixo consumo energético, o baixo custo de implementação, a facilidade de operação e o custos reduzidos com manutenção e limpeza das membranas, devido aos baixos índices de incrustação observados nesses processos. O comportamento dos processos de nanofiltração são geralmente analisados levando em conta a contribuição da pressão osmótica no transporte de solutos e considerando que a variação das resistências da membrana à transferência de massa é uma consequência do processo de adsorção dos solutos no material da membrana (GONZÁLEZ-MUÑOZ e PARAJÓ, 2010).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi purificar os GOS presentes numa mistura de açúcares contendo também glicose, lactose e galactose através de um processo de

diafiltração utilizando a membrana de nanofiltração NP030 em uma unidade piloto fluxo tangencial, identificar os mecanismos de incrustação devido à adsorção dos açúcares e descrever o comportamento do processo de separação através da distribuição do tamanho dos poros de permeação da membrana.

3.2 TEORIA

3.2.1 Considerações Gerais

Em processos de filtração de açúcares de tamanho pequeno e médio, a pressão osmótica ($\Delta\Pi$) gerada pelos açúcares na célula de filtração e a resistência total do sistema a transferência de massa (R_T) são dois fatores que afetam o fluxo de permeado (J_p) (PRÁDÀNOS *et al.*, 1995), conforme a Equação 3.1. Onde μ_s é a viscosidade da solução e ΔP é a pressão aplicada no processo.

$$J_p = \frac{\Delta P - \Delta \Pi}{\mu_s R_T(t)} \quad (3.1)$$

Conforme Kuhn *et al.* (2010), pode-se assumir que a pressão osmótica obedece à lei de Van't Hoff's, assim a diferença osmótica gerada por todos os solutos presentes na mistura pode ser calculada através da Equação 3.2, onde $C_{m,i}$ é a concentração do soluto i na camada ativa da membrana, $C_{p,i}$ é a concentração soluto i no permeado, R é constante dos gases ideais, T é a temperatura absoluta e $M_{w,i}$ é a massa molar do açúcar i .

$$\Delta\Pi = \sum_{i=1}^n \Delta\Pi_i = \sum_{i=1}^n \frac{RT}{M_{w,i}} (C_{m,i} - C_{p,i}) \quad (3.2)$$

A resistência total do sistema é a soma da resistência intrínseca da membrana (R_m), também denominada de resistência hidráulica, mais uma série de resistências dependentes das incrustações devido a adsorção e/ou deposição dos solutos no material da membrana (R_f), conforme Equação 3.3.

$$R_T(t) = R_m + R_f(t) \quad (3.3)$$

A resistência intrínseca da membrana pode ser calculada através da Equação 3.4, quando $R_f(t)=0$ e $\Delta\Pi=0$, onde J_w é o fluxo de água pura, μ_w é a viscosidade da água pura e L_p é a permeabilidade hidráulica da membrana (GONZÁLEZ-MUÑOZ e PARAJÓ, 2010).

$$J_w = \frac{\Delta P}{\mu_w R_m} = L_p \Delta P \quad (3.4)$$

3.2.2 Coeficientes Cinéticos de Adsorção ($k_{ads,i}$)

Em um sistema de diafiltração é possível realizar o balanço de massa do processo, pois a massa de soluto alimentada no sistema é igual à massa de soluto permeada mais a massa de soluto depositada e/ou adsorvida na membrana (GONZÁLEZ-MUÑOZ e PARAJÓ, 2010; KUHN *et al.*, 2010), assim para um soluto i , é possível escrever o balanço

de massa, conforme a Equação 3.5, onde V_f é o volume total alimentado, $C_{r,i}$ é a concentração do soluto i no retido, V_p é o volume acumulado de permeado e $m_{ads,i}$ é a massa do soluto i adsorvida e/ou depositada na membrana.

$$V_f \frac{dC_{r,i}}{dt} + \frac{dV_p}{dt} C_{p,i} + \frac{dm_{ads,i}}{dt} = 0 \quad (3.5)$$

A Equação 3.5 pode ser reescrita, considerando que a taxa de volume permeado pode ser descrito pela Equação 3.6, onde A_m é a área total de permeação da membrana.

$$\frac{dV_p}{dt} = A_m J_p \quad (3.6)$$

A massa do soluto i adsorvida e/ou depositada na membrana pode estar relacionada com a concentração do soluto i na membrana ($C_{m,i}$). Supondo que a taxa de adsorção segue uma cinética de primeira ordem, definida por uma constante cinética ($k_{ads,i}$), tem-se a Equação 3.7.

$$\frac{dm_{ads,i}}{dt} = k_{ads,i} C_{m,i} \quad (3.7)$$

A hipótese de cinética de adsorção de primeira ordem é escolhida, pois é simples e conforme observado em outros trabalhos ajusta-se bem aos resultados (GONZÁLEZ-MUÑOZ e PARAJÓ, 2010; KUHN *et al.*, 2010). A partir das considerações das Equações

3.6 e 3.7 o balanço de massa apresentado na Equação 3.5 é reescrito conforme a Equação 3.8.

$$\frac{dC_{r,i}}{dt} = \left(-J_p \frac{A_m}{V_f} C_{p,i} \right) - \left(\frac{C_{m,i}}{V_f} \right) k_{ads,i} \quad (3.8)$$

Além disso, pode-se considerar que a resistência à transferência de massa devido às incrustações é proporcional à massa total adsorvida, conforme Equação 3.9, onde K_R é a constante de proporcionalidade e $m_{0,i}$ é a massa inicial adsorvida do soluto i em $t = 0$.

$$R_f(t) = K_R \sum_{i=1}^n m_{ads,i}(t) = K_R \sum_{i=1}^n \left(m_{0,i} + \int_0^t C_{m,i} dt \right) \quad (3.9)$$

Através destas equações é possível analisar a importância do efeito da pressão osmótica e o comportamento da resistência devido às incrustações em função tempo ($R_f(t)$). Também é possível estimar as constantes cinéticas de adsorção ($k_{ads,i}$) para estudar a importância da incrustação devido à adsorção de cada açúcar na membrana. Para a resolução destas equações é necessária a estimativa da concentração de cada açúcar adsorvido e/ou depositado na superfície da membrana ($C_{m,i}$).

3.2.3 Concentração da Polarização ($C_{m,i}$)

A concentração de cada espécie adsorvida e/ou depositada na membrana $C_{m,i}$ pode ser calculada através da Teoria do Filme e do coeficiente de transferência de massa externo $K_{m,i}$ (PRADÁNOS, ARRIBAS e HERNÁNDEZ, 1994), conforme Equação 3.10.

$$J_p = K_{m,i} \ln \left[\frac{C_{m,i} - C_{p,i}}{C_{r,i} - C_{p,i}} \right] \quad (3.10)$$

Os coeficientes de transferência de massa de cada açúcar podem ser obtidos através de uma correlação adequada entre números adimensionais do processo, conforme as Equações 3.11 e 3.12. Onde Sh_i é o número de Sherwood do soluto i , Re é o número de Reynolds do processo, Sc_i é o número de Schmidt do soluto i , d_h é o diâmetro hidráulico do canal da membrana, v é a velocidade média tangencial na superfície da membrana, ρ_s é a densidade da solução, D_i é a difusividade do soluto i , μ_s é a viscosidade da solução e A , β , α são parâmetros do modelo.

$$Sh_i = A Re^\alpha Sc_i^\beta \quad (3.11)$$

$$Sh_i = \frac{K_{m,i} d_h}{D_i}, Re = \frac{d_h v \rho_s}{\mu_s} \text{ e } Sc_i = \frac{\mu_s}{\rho_s D_i} \quad (3.12)$$

A massa específica (ρ_s) e a viscosidade dinâmica (μ_s) da solução podem ser consideradas iguais as da água (KUHN *et al.*, 2010). A predição dos coeficientes de difusão

de cada soluto (D_i) em uma solução diluída de água sem a presença de eletrólitos pode ser realizada através da correlação proposta por Wilke & Chang (TREYBAL, 1980), conforme a Equação 3.13. Onde φ_w é o fator de associação da água, $M_{w,w}$ é a massa molecular da água, T é a temperatura absoluta e $v_{m,i}$ é o volume molar do soluto i no ponto normal de ebulição.

$$D_i = \frac{(117,3 \cdot 10^{-18})(\varphi_w M_{w,w})^{0,5} T}{(\mu_s v_{m,i})^{0,6}} \quad (3.13)$$

3.2.4 Distribuição de Tamanho dos Poros

Os resultados experimentais da retenção intrínseca [$(R_i = 1 - (C_{p,i}/C_{m,i}))$] em relação ao fluxo volumétrico de permeado (J_p) podem ser utilizados para a obtenção do diâmetro médio dos poros. Considerando que a retenção ocorre somente pelo peneiramento das moléculas, presume-se que para cada massa molar, há uma fração de poros de retenção completa, enquanto o restante permite a passagem livre das moléculas. Dessa forma, o balanço de massa para cada massa molar é apresentado nas Equações 3.14 e 3.15 (NOBREGA *et al.*, 1989; PRÁDANOS e HERNÁNDEZ, 1995; OCHOA *et al.*, 2001; KUHN *et al.*, 2010). Onde $J_{w,t}$ e J_w são os fluxos de água pura passando através dos poros de retenção e dos poros de não-retenção, respectivamente.

$$J_{w,t} = J_p(1 - R_i) \quad (3.14)$$

$$J_w = J_p R_i \quad (3.15)$$

Assim, $J_{w,t}/J_w$ em função da massa molecular ($M_{w,i}$) irá resultar na fração acumulada de fluxos passando através dos poros de não-retenção. Com a finalidade de aumentar a definição, uma função analítica pode ser utilizada para interpolar $J_{w,t}/J_w$ em função da massa molar ($M_{w,i}$). Para efeitos de um bom ajuste dos dados experimentais, utiliza-se uma curva lógica com assíntotas horizontais, $J_{w,t}/J_w = 1$ e 0, conforme Equação 3.16.

$$\frac{J_{w,t}}{J_w} = \frac{1}{1 + (M_{w,i}/B)^C} \quad (3.16)$$

Para obtenção de uma equação de $J_{w,t}/J_w$ em função do diâmetro do poro ($d_{p,i}$), calcula-se o valor de $d_{p,i}$ no qual $M_{w,i}$ esta permeando, para isso utiliza-se o modelo apresentado na Equação 3.17 (OCHOA *et al.*, 2001).

$$d_{p,i} = (1550 \pm 60) \cdot 10^{-13} (M_{w,i})^{1/2} \quad (3.17)$$

Assim, a Equação 3.17 pode ser reescrita, conforme a Equação 3.18. Onde B e C são constantes a serem estimadas através dos resultados experimentais. Dessa forma, a distribuição do tamanho dos poros é obtida através da Equação 3.18.

$$\frac{J_{w,t}}{J_w} = \frac{1}{1 + (d_{p,i}/B)^C} \quad (3.18)$$

Para uma descrição mais completa da separação de açúcares por nanofiltração relaciona-se o diâmetro médio dos poros ($\langle d_p \rangle$) com o diâmetro de Stokes das moléculas de açúcar ($d_{s,i}$). O diâmetro de cada açúcar ($d_{s,i}$) pode ser obtido considerando que as moléculas são uniformes e apresentam geometria esférica, conforme Equação 3.19 (GONZÁLEZ-MUÑOZ e PARAJÓ, 2010). Onde $M_{w,i}$ é massa molecular do açúcar i , ρ_i é a massa específica do açúcar i e N_A é o número de Avogadro.

$$d_{s,i} = \frac{3M_{w,i}}{4\pi\rho_i N_A} \quad (3.19)$$

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Solução GOS-modelo

A solução de trabalho denominada GOS-modelo, foi formulada com uma concentração de açúcares totais de aproximadamente 100 g/L e composição semelhante a obtida na reação de transgalactosilação da lactose pela enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 contendo: 16,6% (m/m) de GOS, 17,7% (m/m) de lactose, 47,1% (m/m) de glicose e 18,64% (m/m) de galactose (MANERA, 2010). Para isso, foram utilizadas glicose, galactose e lactose de grau analítico (Synth[®], São Paulo, SP, Brasil) e uma mistura de GOS em pó com nome comercial de Bioligo[™] GL 4630 (Corn Products International, Seul, Coreia do Sul) contendo 4,75% (m/m) de umidade e 90,6% (m/m) de GOS.

3.3.2 Membrana

Foi utilizado um módulo espiral da membrana NP030 (SPIRA-CEL[®] OY NP030 2440D 1- 44 mil Parallel Spacer, Microdyn-Nadir, Alemanha) com MWCO de 400 Da (KUHN *et al.*, 2010). Conforme informações do fabricante a membrana possui uma área efetiva de permeação (A_m) igual a $1,8 \text{ m}^2$ e diâmetro hidráulico (d_h) de $1,1 \times 10^{-3} \text{ m}^2$. O módulo espiral é constituído por camadas de membrana de polietersulfonas (PES) que apresentam caráter hidrofílico e uma elevada resistência química e térmica. A membrana é caracterizada pelo fabricante por apresentar uma retenção nominal de 80-95% de Na_2SO_4 e uma fluxo volumétrico de água superior a $40 \text{ L/m}^2\text{h}$, ambos a 4 MPa e 20°C . A temperatura máxima e a faixa de pH de operação são de 80°C e 0-12, respectivamente.

3.3.3 Unidade Piloto de Filtração de Fluxo Tangencial

A unidade piloto de filtração tangencial é semelhante a utilizada em processos de nanofiltração em escala industrial, conforme Figura 3.1. A unidade é composta basicamente de uma bomba de deslocamento positivo (Hydracell G10EKSJSHHFF, EUA) e um vaso de pressão construído de PVC rígido que serve de suporte para o módulo espiral da membrana. A unidade possui, acoplados ao sistema, dois manômetros, um localizado na entrada do sistema e outro na saída da membrana, dois medidores de vazão para o monitoramento da vazão de recirculação do material retido e a vazão do material permeado, além um condensador acoplado a linha de recirculação de retido conectado a um banho termostático

(Tecnal, São Paulo, Brasil) para manutenção da temperatura do processo. A ilustração da unidade piloto de nanofiltração de fluxo tangencial é apresentada na Figura 3.1.



Figura 3.1 Ilustração da unidade piloto de nanofiltração de fluxo tangencial.

3.3.4 Processo de Purificação – Diafiltração

Inicialmente, o módulo espiral da membrana foi condicionado até atingir um valor de fluxo constante através da alimentação de água destilada no sistema a uma pressão de 3 MPa. Após esse período, 4 L da solução GOS-modelo foram alimentados no sistema, onde as condições operacionais de pressão, temperatura e vazão de recirculação de retido foram: 3 MPa, 35° C e 300 L/h, respectivamente. O volume do tanque de alimentação (4 L) foi mantido constante ao longo do processo de diafiltração por adição de água destilada a uma vazão de alimentação igual a vazão de saída do material permeado, conforme diagrama esquemático da Figura 3.2. Durante o processo de diafiltração foram quantificados os fluxos de permeado e recolhidas amostras da solução retida e da solução permeada em diferentes intervalos de tempo para posteriores análises cromatográficas. Quando a pureza de GOS na solução retida atingiu um valor constante, o processo de diafiltração foi finalizado através da interrupção da adição de água ao sistema. A solução foi, então, concentrada até um volume final igual a 50% do volume inicialmente alimentado (2 L).

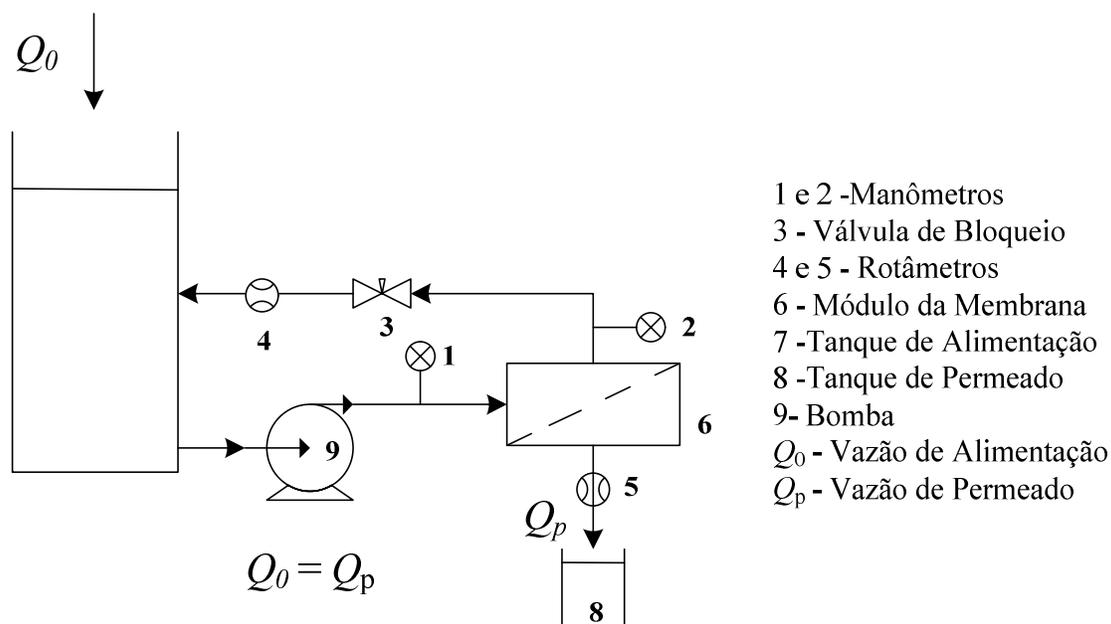


Figura 3.2 Diagrama de fluxo da diafiltração na unidade piloto de nanofiltração de fluxo tangencial.

3.3.5 Quantificação dos Açúcares

A quantificação de todos os açúcares (glicose, lactose, galactose e GOS) foi feita por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), utilizando o cromatógrafo Dionex[®] (Sunnyvale, CA, Estados Unidos) equipado com a coluna Carbopac PA-1 (4x250 mm), uma coluna de guarda Carbopac PA-1 (4x50 mm), bomba GP50, detector eletroquímico ED40 e o *software* PEAKNET. A coluna foi equilibrada com NaOH 150 mM e os açúcares eluídos com NaOH 20 mM a uma vazão de 1 mL/min. Antes de sua injeção no sistema, as amostras foram filtradas (0,22 μ m) e diluídas convenientemente.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Processo de Purificação

Com a finalidade de avaliar a viabilidade industrial da aplicação da nanofiltração como uma etapa primária de purificação de GOS, um processo de diafiltração foi realizado em um protótipo de nanofiltração de fluxo tangencial. O processo foi realizado em duas etapas, a primeira compreendeu uma diafiltração com volume de alimentação mantido constante através da adição de água em vazão igual a da saída da solução permeada, pois como demonstrado em outros trabalhos, não são observadas diferenças significativas entre este processo e a diafiltração com volume variável (LI *et al.*, 2004). Já a segunda etapa iniciou quando foi atingido uma pureza constante de GOS e consistiu em interromper a alimentação de água e concentrar a solução previamente retida.

O acompanhamento do fluxo de permeado e da pureza dos açúcares retidos em função do tempo nas etapas de diafiltração e concentração de GOS são apresentadas na Figura 3.3. Os resultados indicam que é possível a obtenção de uma solução de GOS com grau de pureza de aproximadamente 44%. Este valor de pureza é cerca de 2,55 vezes superior ao da solução GOS-modelo alimentada inicialmente. Observa-se também que o comportamento da pureza das espécies de açúcar em função do tempo é típico de um processo de purificação, pois a pureza do composto de interesse na solução retida aumenta em função do tempo, enquanto que a pureza dos açúcares contaminantes, com exceção da lactose, sofrem uma redução. O processo final de concentração não interfere no grau de pureza da solução final (KUHN *et al.*, 2010), apenas remove o solvente.

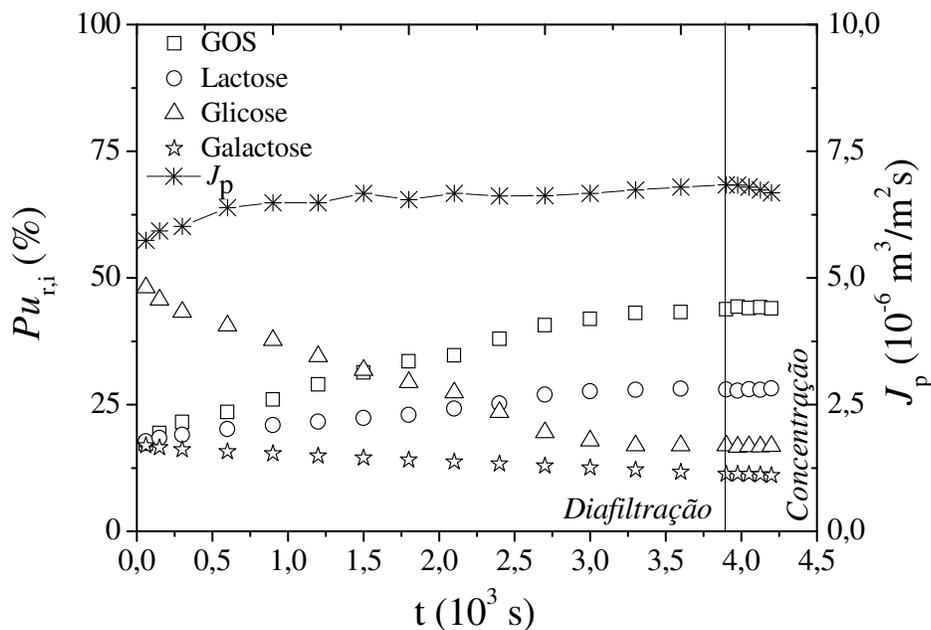


Figura 3.3 Pureza dos açúcares na solução retida e fluxo de permeado em função do tempo das etapas de diafiltração e concentração.

É possível verificar através da Figura 3.4 que durante o processo de diafiltração ocorre uma diminuição na concentração dos açúcares na fração retida em função do tempo, sendo esta redução mais evidente para os açúcares de menor massa molecular (glicose e galactose). A diminuição da concentração dos açúcares no retido em função do tempo durante a diafiltração promove também uma redução na contribuição da pressão osmótica de 0,41 MPa a 0,23 MPa (Equação 3.2). É possível também observar através da Figura 3.4 que os açúcares menores apresentam uma redução mais significativa da concentração no retido em função do tempo atingindo valores de concentração baixos mais rapidamente que os açúcares maiores. Este resultado era esperado, tendo em vista que, no caso das moléculas apolares, a retenção ocorre somente por diferença de tamanho.

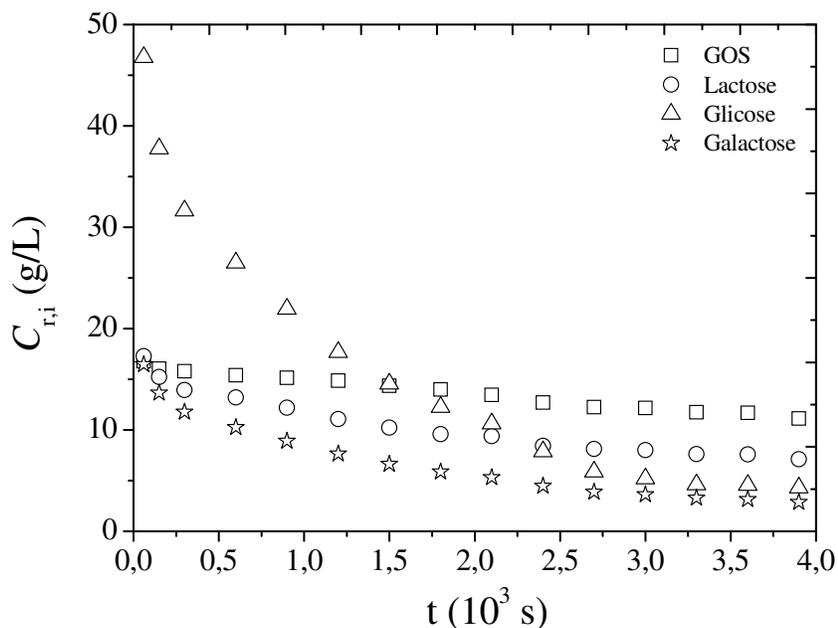


Figura 3.4 Concentrações de açúcares na solução retida em função do tempo de diafiltração.

A Figura 3.5 apresenta o acompanhamento dos coeficientes de retenção observados, $[R_{\text{obs},i} = 1 - (C_{p,i}/C_{r,i})]$, em função do tempo de diafiltração. É possível observar que a membrana NP030 nas condições de pressão e temperatura aplicadas no processo, apresenta uma maior retenção de GOS durante todo o processo de purificação, quando comparado aos demais açúcares, atingindo um valor máximo de aproximadamente 0,99. A lactose e a galactose apresentam um coeficiente de retenção intermediário entre os GOS e glicose de 0,95 e 0,98, respectivamente. A glicose por sua vez, apresenta o menor coeficiente de retenção (aproximadamente 0,63) dentre os açúcares, sendo observado um aumento significativo nos valores do coeficiente de retenção no início do processo.

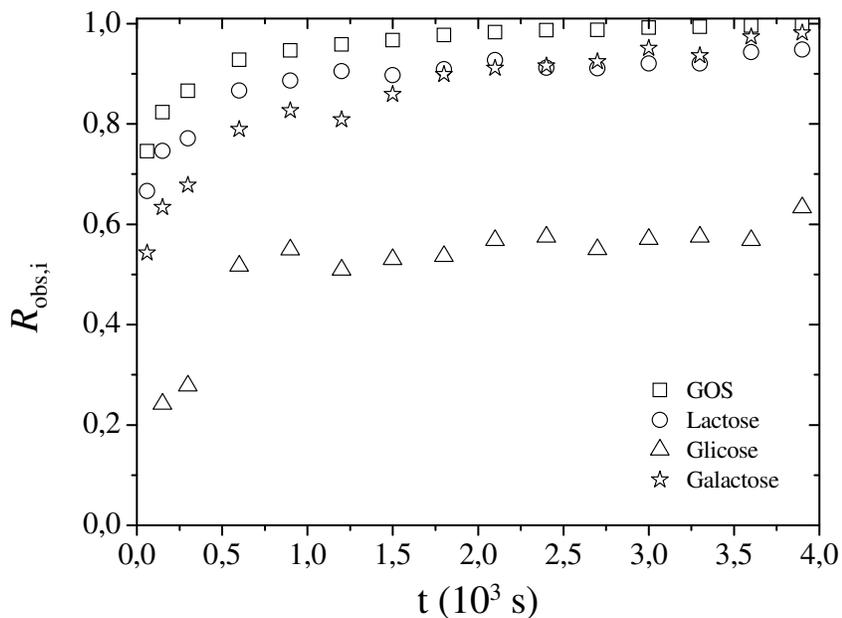


Figura 3.5 Coeficientes de retenção observados dos açúcares em função do tempo de diafiltração.

É possível observar através da Figura 3.5 que todos os açúcares apresentam um ligeiro aumento nas retenções observadas em função do tempo nos períodos iniciais do processo de diafiltração. Esse fato possivelmente está relacionado com a formação de uma pseudomembrana na superfície da membrana devido à deposição dos solutos (KUNH *et al.*, 2010). Pode-se verificar também que as moléculas de maior massa molecular tendem a atingir um resultado constante nos valores dos coeficientes de retenção mais rapidamente que os demais açúcares. Por outro lado, as moléculas com massas moleculares menores tendem a maiores oscilações nos coeficientes de retenção em função do tempo. Essas oscilações podem estar relacionadas aos erros das estimativas dos coeficientes de retenção, os quais aumentam em função do tempo de processo de diafiltração, pois essa estimativa é obtida através da razão de valores de concentração de permeado muito reduzidos.

A Tabela 3.1 apresenta o resultado final da purificação de GOS utilizando a membrana NP030 com o processo conduzido a 3 MPa e 35° C através de diafiltração. É possível observar que são eliminados juntamente com o volume de 48 L de solução permeada aproximadamente 1,82 g de GOS, 17,66 g de lactose, 102,28 g de glicose e 2,49 g de galactose. Essas massas de açúcares indicam que o processo apresenta uma recuperação de GOS de 97,82%. No final do processo de purificação, foi obtido uma solução retida de volume igual a 4 L com grau de pureza de GOS de 44,00%, lactose de 28,19%, glicose de 16,79% e galactose de 11,01%, resultando em um fator de purificação de GOS de aproximadamente 2,55. Verifica-se também que, juntamente com os GOS, a lactose também foi purificada ($FP=1,59$). Este resultado pode indicar que a composição dos GOS é formada majoritariamente por dissacarídeos e trissacarídeos com dimensões semelhantes à lactose, o que explica a dificuldade de separação.

Tabela 3.1 Resultados experimentais da diafiltração realizada na unidade piloto de nanofiltração de fluxo tangencial.

| | Alimentação, $V_f = 4$ L | | | Permeado, $V_p = 48$ L | | | Retido, $V_r = 4$ L | | | FP (-) | Y (%) |
|-----------|--------------------------|---------------|----------------|------------------------|---------------|----------------|---------------------|---------------|----------------|----------|---------|
| | $C_{f,i}$ (g/L) | $m_{f,i}$ (g) | $Pu_{f,i}$ (%) | $C_{p,i}$ (g/L) | $m_{p,i}$ (g) | $Pu_{p,i}$ (%) | $C_{r,i}$ (g/L) | $m_{r,i}$ (g) | $Pu_{r,i}$ (%) | | |
| GOS | 16,76 | 67,04 | 17,23 | 0,04 | 1,82 | 1,47 | 12,93 | 51,70 | 44,00 | 2,55 | 97,82 |
| Lactose | 17,27 | 69,08 | 17,76 | 0,37 | 17,66 | 14,21 | 8,28 | 33,12 | 28,19 | 1,59 | |
| Glicose | 46,78 | 187,12 | 48,10 | 2,13 | 102,28 | 82,31 | 4,93 | 19,72 | 16,79 | 0,35 | |
| Galactose | 16,45 | 65,80 | 16,91 | 0,05 | 2,49 | 2,00 | 3,23 | 12,97 | 11,01 | 0,65 | |

O único trabalho reportado pela literatura até o presente momento para purificação de GOS por nanofiltração, aproximando o processo do nível industrial, foi realizado por Feng *et al.* (2009), que observaram um fator de purificação e uma recuperação de GOS de aproximadamente 1,5 e 70%, respectivamente, valores estes inferiores aos observados no presente trabalho. Porém deve-se ressaltar que os autores utilizaram em suas pesquisas condições de pressão e temperatura (0,6 MPa, 50°C, respectivamente) diferentes das utilizadas no presente trabalho (3MPa e 35°C), bem como outro tipo de membrana. No entanto, esses resultados indicam que a nanofiltração pode ser utilizada como uma técnica primária de purificação de GOS. Uma solução com teor de pureza superior pode ser obtida após a nanofiltração empregando outras técnicas de purificação para obtenção de um produto com a pureza comercial.

A partir destes resultados é possível verificar um aumento de 2,55 vezes da pureza da solução GOS-modelo. No entanto, como durante a síntese enzimática a reação de hidrólise da lactose é mais efetiva que a reação de transgalactosilação, o percentual de GOS na mistura final de açúcares será baixo, em média próximo a 16,6% (MANERA, 2010). Através da nanofiltração o máximo que se alcançaria em pureza seria aproximadamente 44%. Para obtenção de um produto com a pureza comercial é necessário o emprego de outras técnicas de purificação após a nanofiltração com o intuito de separação da lactose, visto que a lactose é purificada juntamente com o GOS. Apesar dos estudos serem realizados utilizando uma solução sintética de açúcares, os resultados obtidos indicam que este processo pode ser aplicado como uma técnica primária de purificação das soluções de GOS obtidas através de síntese enzimática.

3.4.2 Mecanismos de Incrustação dos Poros

Os valores dos coeficientes cinéticos de adsorção ($k_{ads,i}$) foram estimados através de um modelo matemático baseado no balanço de massa do sistema (Equações 3.5-3.9). Para obtenção dos coeficientes ($k_{ads,i}$) inicialmente foram estimadas as concentrações de cada açúcar na superfície da membrana ($C_{m,i}$) através da Teoria do Filme (Equação 3.10). Os coeficientes de transferência de massa externos de cada açúcar ($K_{m,i}$) foram estimados através de uma correlação adequada entre números adimensionais do processo, conforme a Equação 3.20, que considera os efeitos entre os materiais espaçadores das membranas de configuração espiral e também que $100 < Re < 1000$ (SCHOCK e MIQUEL, 1987).

$$Sh_i = 0,065Re^{0,875}Sc_i^{0,25} \quad (3.20)$$

A Tabela 3.2 apresenta as propriedades dos solutos utilizados para a estimativa dos valores de $k_{ads,i}$, além dos coeficientes externos de transferência de massa e os números adimensionais de Reynolds, Schmidt e Scherwood para cada soluto presente na solução GOS-modelo.

Tabela 3.2 Propriedades dos açúcares e números adimensionais do processo.

| Parâmetros | GOS | Lactose | Glicose | Galactose |
|--|----------|---------|---------|-----------|
| $M_{w,i}$ (g/mol) | ~540,47* | 342,3 | 180,16 | 180,16 |
| ρ_i (kg/m ³) | ~1565 | 1629 | 1562 | 1616 |
| D_i ($\times 10^{-10}$ m ² /s) | 5,01 | 6,55 | 9,68 | 9,68 |
| Re (adimensional) | 123,94 | 123,94 | 123,94 | 123,94 |
| Sh_i (adimensional) | 27,17 | 25,41 | 23,04 | 23,04 |
| Sc_i (adimensional) | 1439,57 | 1101,44 | 745,49 | 745,49 |
| $K_{m,i}$ ($\times 10^{-5}$ m/s) | 1,24 | 1,51 | 2,03 | 2,03 |

*Estimativa média considerando o perfil de GOS em amostras comerciais obtidas através de síntese enzimática (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Na Figura 3.6 está a representação linear da Equação 3.8 onde os valores absolutos dos coeficientes angulares das retas obtidas representam os valores de $k_{ads,i}$. Os ajustes lineares apresentaram valores de máxima variância explicável superiores a 98% para todos os açúcares presentes na solução GOS-modelo. Portanto, estes resultados sugerem que a hipótese considerada pelo modelo de uma cinética de adsorção de primeira ordem é adequada. Os valores de $k_{ads,i}$ em função da massa molar dos açúcares estão apresentados na Figura 3.7. É possível observar que os açúcares menores, ou seja, os monossacarídeos que apresentam massa molar ($M_{w,i}$) inferior ao valor nominal da MWCO da membrana apresentam valores de $k_{ads,i}$ superiores aos demais açúcares.

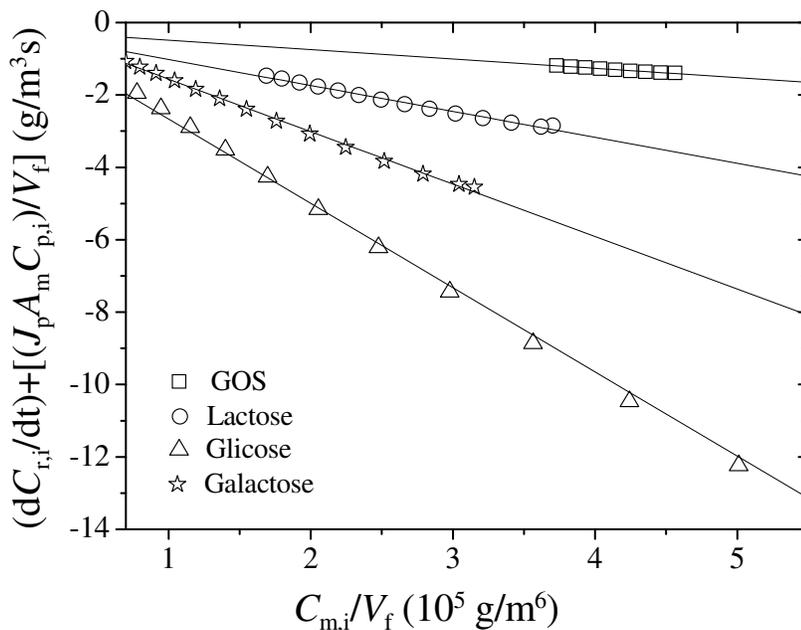


Figura 3.6 Ajuste do modelo (Equação 3.9) para obtenção das constantes cinéticas de adsorção dos açúcares.

O comportamento dos valores de $k_{ads,i}$ em função do valor de $M_{w,i}$ pode ser utilizado para explicar os mecanismos de incrustação das espécies de açúcar na membrana. Devido a sua massa molar inferior ao valor nominal de MWCO da membrana NP030, as moléculas de glicose e a galactose têm acesso tanto à superfície exterior da membrana quanto às superfícies internas dos poros, conforme ilustração da Figura 3.7, sendo adsorvidos, portanto, por uma grande área da membrana. Este mecanismo de adesão das moléculas menores na superfície interna dos poros é conhecido como Modelo Padrão de Bloqueio (JACOB *et al.*, 1998). No processo de diafiltração, as concentrações dos açúcares menores no retido sofrem uma redução significativa nos estágios iniciais do processo, conforme Figura 3.4. Portanto, a adsorção desses açúcares na membrana é mais significativa em intervalos curtos de tempo de processo (KUHN *et al.*, 2010).

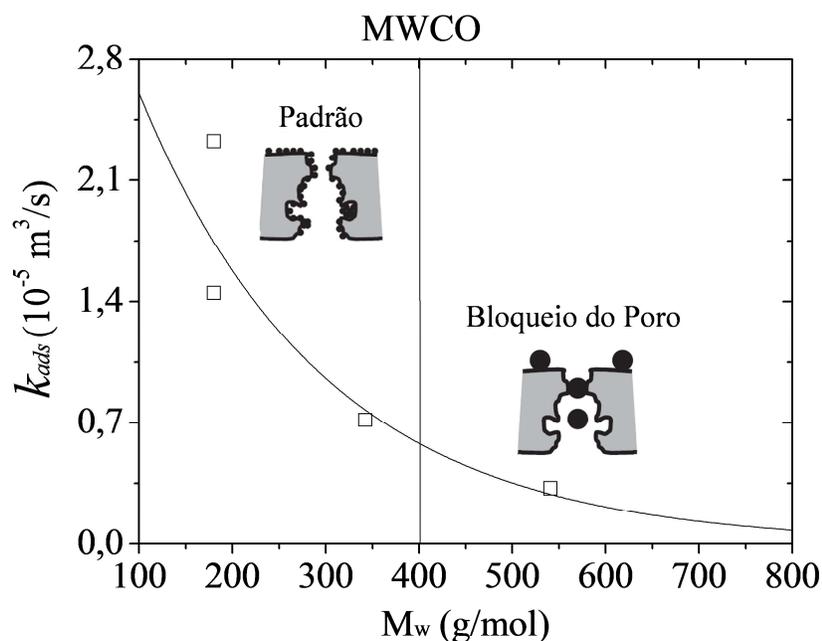


Figura 3.7 Constantes cinéticas de adsorção de cada açúcar em função da massa molecular e mecanismos de incrustação propostos.

As moléculas de GOS e lactose apresentam valores de massa molar próximos ao valor nominal de MWCO da membrana. Os valores de $k_{ads,i}$ para esses açúcares são menores que para os outros açúcares presentes na solução GOS-modelo. Esses açúcares têm a capacidade de passar através dos poros e/ou de serem adsorvidos na superfície externa da membrana, porém seu tamanho não lhes permite serem adsorvidos na parede interna dos poros. Contudo, ao invés de apresentarem o comportamento supracitado, estes açúcares podem bloquear totalmente a entrada do poro e prevenir assim a deposição de outros açúcares presentes na mistura, conforme é sugerido na Figura 3.7. O mecanismo de adesão das moléculas nas superfícies exteriores das membrana e/ou de bloqueio dos poros

são conhecidos como Modelos de Bloqueio Completo e Bloqueio Intermediário (*Complete Blocking and Intermediate Blocking Models*) (JACOB *et al.*, 1998).

Deve-se ressaltar que as concentrações de GOS foram relatadas no presente trabalho como uma mistura de espécies de GOS com diferentes graus de polimerização, sendo estipulado uma massa molar média para esse grupo de açúcares de aproximadamente 540 g/mol. Portanto, não é correto negligenciar a presença de açúcares com massas molares muito mais elevadas ao valor de MWCO da membrana. Moléculas maiores possivelmente não conseguem penetrar no poro e tendem a acumular-se na superfície externa da membrana, formando uma torta. A magnitude dessa camada dependerá do valor do $k_{ads,i}$ e do equilíbrio entre a deposição pelo efeito convectivo e o arraste induzido pelo fluxo tangencial de alimentação (KUHN *et al.*, 2010).

Considerando a existência de uma proporcionalidade entre a massa adsorvida pela membrana ($m_{ads,i}$) e a resistência ao fluxo de permeado devido às incrustações dos poros (R_f), independente do mecanismo de adsorção, a Equação 3.9 permite a obtenção da constante de proporcionalidade (K_R). A resistência total do sistema em função do tempo ($R_T(t)$) e a diferença de pressão osmótica ($\Delta\Pi$) são calculadas utilizando as Equações 3.1 e 3.2, respectivamente. Assim pela Equação 3.3 é possível calcular os valores de $R_f(t)$ desde que a resistência intrínseca da membrana (R_m) seja calculada através da medição da permeabilidade hidráulica (L_P). O valor de L_P ($3,86 \times 10^{-12}$ m/Pas) é obtido através do ajuste linear dos fluxos de água pura (J_w) obtidos em diferentes pressões transmembrana (Figura 3.8). Por fim, o valor de R_m ($2,91 \times 10^{-14}$ m⁻¹) foi calculado a partir da Equações 3.4, quando $R_f(t) = 0$ e $\Delta\Pi = 0$.

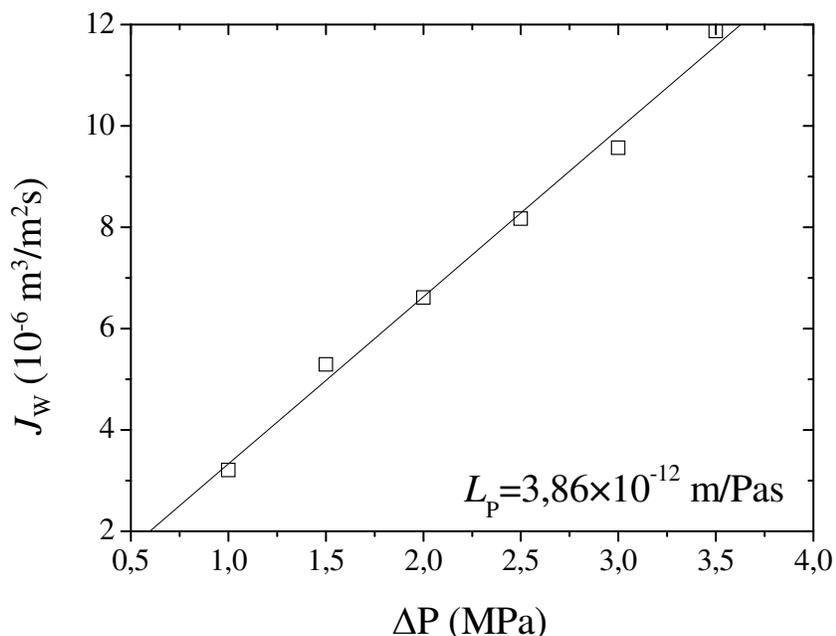


Figura 3.8 Ajuste linear para obtenção da permeabilidade hidráulica da membrana NP030.

O comportamento dos valores da resistência intrínseca da membrana (R_m) e da resistência ao fluxo de permeado gerada pelas incrustações da membrana (R_f) e suas contribuições (%) para resistência total da membrana (R_T) é apresentado na Figura 3.9, através da qual se pode verificar que as resistências ao fluxo provocadas pela adsorção e/ou deposição dos solutos no material constituinte da membrana no decorrer da diafiltração são insignificantes, pois seus valores reduzem com o tempo, tornando-se muito inferiores aos da resistência intrínseca da membrana. Observa-se ainda que o mesmo ocorre com sua contribuição para resistência total dos sistema a transferência de massa. Esses resultados são típicos de processos de diafiltração, onde a concentração das espécies de açúcares no retido diminui promovendo a redução da deposição de partículas na superfície da membrana, diminuindo assim, os valores de $R_f(t)$.

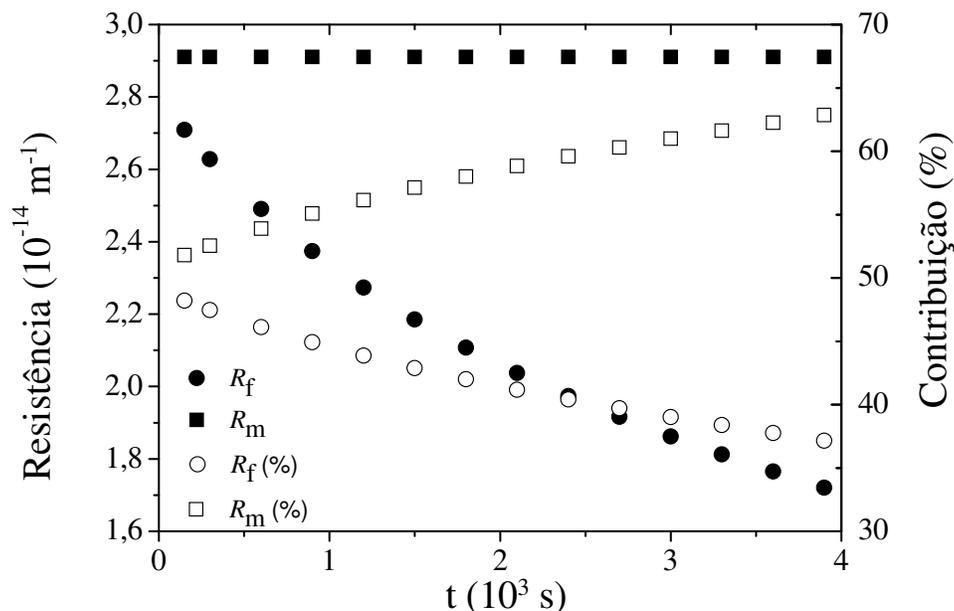


Figura 3.9 Resistências intrínseca da membrana e devido às incrustações dos poros e suas contribuições na resistência total do sistema.

A redução dos valores de $R_f(t)$ também pode estar relacionada com o arraste das moléculas de solutos da superfície da membrana pela corrente tangencial de alimentação, fazendo com que a resistência devido às incrustações seja praticamente desprezível. Esses resultados nos permitem confirmar que o material de constituição da membrana (PES) é apropriado para esse processo de purificação. Conforme a Equação 3.9, a representação dos valores de $R_f(t)$ como uma função de massa dos açúcares na superfície da membrana em qualquer momento da diafiltração ($m_{ads,i}(t) - m_{0,i}$) irá apresentar um comportamento linear. O valor de K_R verificado ($0,02 \times 10^{15}$ m/kg) está na mesma ordem de outro trabalhos reportados na literatura com outros oligossacarídeos (GONZÁLEZ-MUÑOZ e PARAJÓ, 2010; KUHN *et al.*, 2010).

3.4.3 Distribuição dos Tamanhos dos Poros

Através dos valores da retenção intrínseca de cada espécie de açúcar (R_i) e dos fluxos volumétricos de permeado (J_P) foi possível determinar o diâmetro médio dos poros de permeação dos açúcares da membrana NP030, conforme Equação 3.18. Os parâmetros B e C do modelo, foram estimados pelo método numérico de minimização local de Gauss-Newton utilizando os valores experimentais da razão de fluxos ($J_{w,i}/J_w$) e o diâmetro dos poros de permeação de cada açúcar ($d_{p,i}$) obtidos através da Equação 3.17. O ajuste da Equação 3.18 aos dados experimentais é apresentado na Figura 3.10. Como a função obtida é bastante simétrica, os diâmetros dos poros de permeação da membrana podem ser ajustados a uma distribuição Gaussiana (KUHN *et al.*, 2010) que conduz a um diâmetro de poro médio de 2,71 nm, com desvio padrão (σ) igual a 0,77. Conforme a Figura 3.11, pode-se afirmar que a probabilidade dos poros de permeação da membrana NP030 estarem contidos no intervalo entre 1,94 e 3,47 nm é 68,3%.

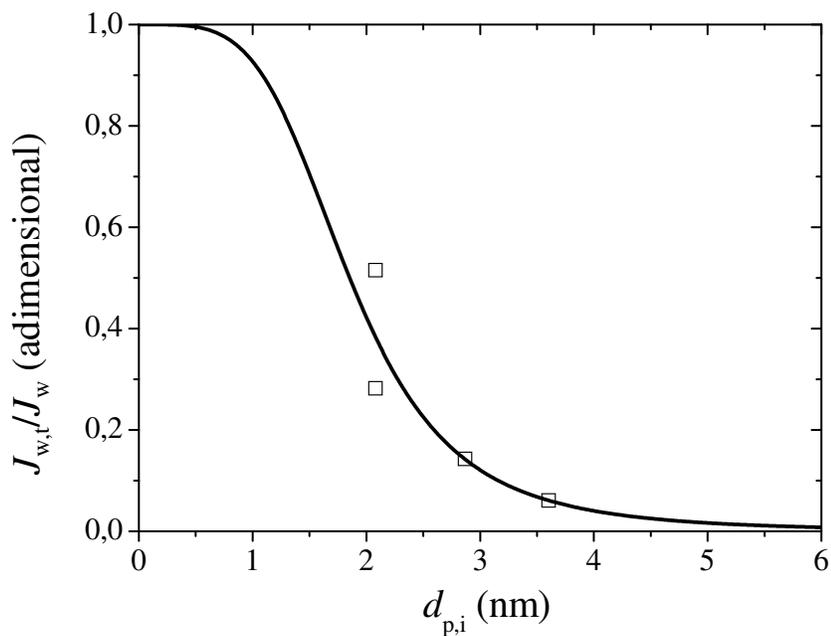


Figura 3.10 Ajuste do modelo (Equação 3.18) para obtenção do diâmetro do poro de permeação de cada açúcar.

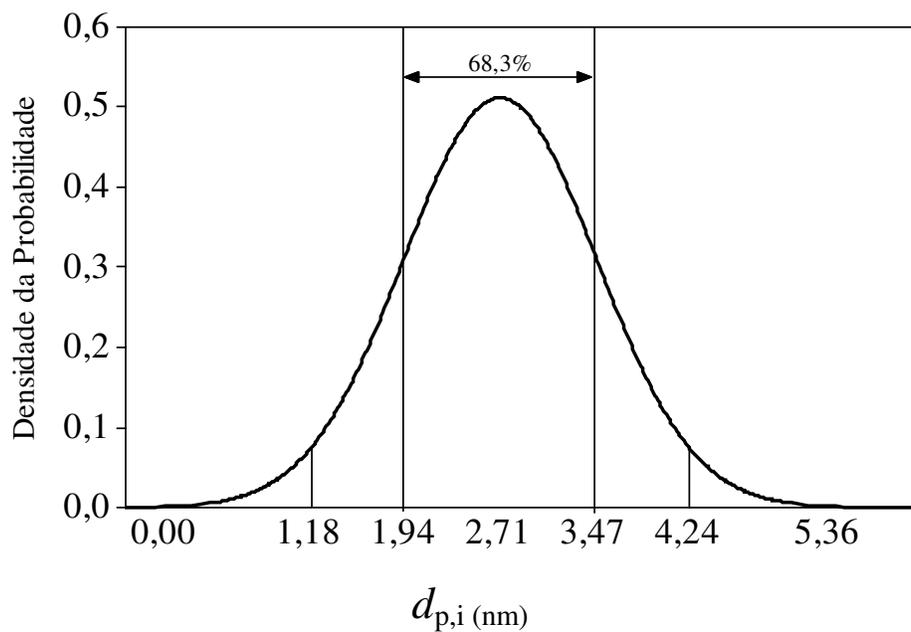


Figura 3.11 Distribuição Gaussiana dos poros de permeação da membrana NP030.

Na Tabela 3.3 é possível observar os valores dos diâmetros de permeação dos açúcares ($d_{p,i}$) obtidos através do modelo ajustado apresentado na Equação 3.18, os valores do diâmetro de Stokes de cada açúcar ($d_{s,i}$) calculado através da Equação 3.19 e a relação entre o diâmetro médio ($\langle d_p \rangle$) e o valor de $d_{s,i}$. Conforme a hipótese apontada na Figura 3.7, a glicose e a galactose são menores que o tamanho médio dos poros, portanto, algumas moléculas são adsorvidas e/ou depositadas na superfície da membrana enquanto o restante tem passagem livre. Essa hipótese é confirmada pela distribuição do tamanho dos poros, pois como se pode verificar na Tabela 3.3, o diâmetro de permeação para essas moléculas é em média 50% menor que o diâmetro médio dos poros.

Tabela 3.3 Diâmetros de permeação dos poros da membranas NP030 e diâmetro de Stokes dos açúcares.

| Açúcar | $d_{s,i}$ (nm) | $d_{p,i}$ (nm) | $\langle d_p \rangle / d_{s,i}$ |
|-----------|----------------|----------------|---------------------------------|
| GOS | 2,06 | 3,61 | 1,31 |
| Lactose | 1,78 | 2,87 | 1,52 |
| Glicose | 1,44 | 1,71 | 1,88 |
| Galactose | 1,42 | 2,64 | 1,91 |

Com relação à lactose e os GOS, os resultados indicam uma diferença menor entre o diâmetro do açúcar e o diâmetro médio de permeação quando comparado com a glicose e a galactose, o que confirma a hipótese de incrustação, levantada na Figura 3.7, e de um bloqueio parcial do poro, onde algumas moléculas ficam aderidas no exterior enquanto outras podem bloquear a entrada do poro. Cabe ressaltar também, que os diâmetros foram estimados através de um número reduzido de observações experimentais e a estimativa considera aspectos teóricos e semi-empíricos, onde algumas considerações como a

uniformidade e a esfericidade das moléculas assim como os erros experimentais, podem influenciar na resposta. No entanto a estimativa do tamanho médio dos poros de permeação da membrana NP030 está de acordo com o proposto em outros trabalhos que observaram uma diâmetro médio de 1,24 nm (KUHN *et al.*, 2010) e 1,48 nm (CARVALHO *et al.*, 2011).

3.5 CONCLUSÃO

A validação do processo de nanofiltração foi realizada em uma unidade piloto de fluxo tangencial e foi possível observar um valor de *FP* de 2,55 e uma recuperação de GOS de 97,82% através de um processo de diafiltração contínua. Foi possível identificar os mecanismos de incrustação dos poros do módulo espiral da membrana NP030, e verificou-se que a glicose e a galactose seguem um modelo padrão de bloqueio, sendo adsorvidas na parede interna do poro ou na superfície exterior da membrana. Com relação aos GOS e à lactose, observa-se que, como apresentam massas molares muito próximas ao valor nominal da MWCO da membrana, eles tendem a depositar-se na superfície externa ou bloquear inteiramente a entrada do poro, mas não são adsorvidos na sua parede interna, correspondendo a uma modelo de bloqueio parcial. Através da distribuição do tamanho dos poros de permeação da NP030 foi possível verificar com a probabilidade de 68,3% que o diâmetro médio está contido no intervalo ente 1,94 e 3,47 nm. Com os resultados, verifica-se que a membrana NP030 tem potencial de utilização em larga escala na purificação parcial de GOS obtidos através de síntese enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTELHO-CUNHA, V. A.; MATEUS, M.; PETRUS, J. C. C.; PINHO, M. N. Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, n. 1–2, p. 29-36, 2010.

CARVALHO, A. L.; MAUGERI-FILHO, F.; SILVA, V.; HERNÁNDEZ, A.; PALACIO, L.; PRADANOS, P. AFM analysis of the surface of nanoporous membranes: application to the nanofiltration of potassium clavulanate. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 10, p. 3356-3369, 2011.

FENG, Y. M.; CHANG, X. L.; WANG, W. H.; MA, R. Y. Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 3, p. 326-332, 2009.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Diafiltration of *Eucalyptus* wood autohydrolysis liquors: mathematical modeling. **Journal of Membrane Science**, v. 346, n. 1, p. 98-104, 2010.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O.; CALVILLO, I.; LEBRÓN-AGUILAR, R.; MORENO, F. J.; SANZ, M. L. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 1220, n. 0, p. 57-67, 2012.

HERNÁNDEZ, O.; RUIZ-MATUTE, A. I.; OLANO, A.; MORENO, F. J.; SANZ, M. L. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 9, p. 531-536, 2009.

JACOB, J.; PRÁDANOS, P.; CALVO, J. I.; HERNÁNDEZ, A.; JONSSON, G. Fouling kinetics and associated dynamics of structural modifications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 138, n. 2–3, p. 173-183, 1998.

KUHN, R. C.; MAUGERI-FILHO, F.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. Selection of membranes for purification of fructooligosaccharides. **Water and Desalination Treatment**, v. 27, p. 18-24, 2011.

KUHN, R. C.; MAUGERI-FILHO, F.; SILVA, V.; PALACIO, L.; HERNÁNDEZ, A.; PRÁDANOS, P. Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 365, n. 1–2, p. 356-365, 2010.

LI, W.; LI, J.; CHEN, T.; CHEN, C. Study on nanofiltration for purifying fructooligosaccharides: I. operation modes. **Journal of Membrane Science**, v. 245, n. 1–2, p. 123-129, 2004.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.

MANERA, A. P. **Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus***. Campinas, 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGEI-FILHO, F. Galactooligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 6, p. 112-119, 2010.

MANERA, A. P.; ZABOT, G. L.; OLIVEIRA, V. J.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; KALIL, S. J.; TREICHEL, H.; FILHO, F. M. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides using pressurised fluids as reaction medium. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1408-1413, 2012.

NOBREGA, R.; BALMANN, H.; AIMAR, P.; SANCHEZ, V. Transfer of dextran through ultrafiltration membranes: a study of rejection data analysed by gel permeation chromatography. **Journal of Membrane Science**, v. 45, n. 1-2, p. 17-36, 1989.

OCHOA, N. A.; PRÁDANOS, P.; PALACIO, L.; PAGLIERO, C.; MARCHESE, J.; HERNÁNDEZ, A. Pore size distributions based on AFM imaging and retention of multidisperse polymer solutes: characterisation of polyethersulfone UF membranes with dopes containing different PVP. **Journal of Membrane Science**, v. 187, n. 1-2, p. 227-237, 2001.

PARK, A. R.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1279-1286, 2010.

PRÁDANOS, P.; ABAJO, J.; CAMPA, J. G.; HERNÁNDEZ, A. A comparative analysis of flux limit models for ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 108, n. 1-2, p. 129-142, 1995.

PRADÁNOS, P.; ARRIBAS, J. I.; HERNÁNDEZ, A. Retention of proteins in cross-flow UF through asymmetric inorganic membranes. **AIChE Journal**, v. 40, n. 11, p. 1901-1910, 1994.

PRADANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. Cross-flow ultrafiltration of proteins through asymmetric polysulfonic membranes: I. retention curves and pore size distributions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 6, p. 617-625, 1995.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999.

SCHOCK, G.; MIQUEL, A. Mass transfer and pressure loss in spiral wound modules. **Desalination**, v. 64, n. 0, p. 339-352, 1987.

TREYBAL, R. E. **Mass Transfer Operations**. New York: McGraw-Hill, 1980.

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSÕES GERAIS

As principais conclusões deste trabalho sobre separação e purificação de GOS através de membranas de nanofiltração foram:

- Na etapa de seleção da membrana de nanofiltração, observou-se que a membrana NP030 (400 Da) apresentou o maior valor de *FP* dentre as membranas utilizadas ($1,68 \pm 0,06$), o maior fluxo de permeado ($82,62 \pm 1,29 \text{ L/m}^2\text{h}$), a maior seletividade de GOS/glicose ($2,77 \pm 0,22$), a maior seletividade GOS/galactose ($2,72 \pm 0,32$) e a menor resistência total ao fluxo de permeado ($9,93 \times 10^{+13} \text{ m}^{-1}$), sendo selecionada para a etapa de otimização das condições de pressão e temperatura do processo;

- Através de DCFC 2^2 com faces centradas e réplicas nos pontos centrais, foi possível observar que a temperatura e pressão ótimas para obtenção de um valor médio de *FP* de 1,80, foram de 35°C e 3 MPa, respectivamente. Observou-se também que após a primeira etapa de diafiltração o valor de *FP* ($\sim 1,87$) manteve-se constante até o quarto ciclo de diafiltração, já o fluxo volumétrico de permeado aumentou;

- As micrografias obtidas através de MEV indicaram a presença de materiais sólidos presentes na superfície da membrana e também a adesão de micro-organismos na superfície filtrante após sua utilização, indicando a necessidade de um monitoramento das incrustações e métodos eficientes de lavagem durante a vida útil da membrana;

- Com processo operado na unidade piloto de fluxo tangencial utilizando um módulo espiral da membrana da membrana NP030, foi possível observar um valor de *FP* igual a 2,55 e uma recuperação de GOS de 97,82%. Este resultado confirma a viabilidade de aplicação da nanofiltração como uma técnica de purificação parcial de GOS.

- Através dos valores dos coeficientes cinéticos de adsorção foi possível identificar os mecanismos de incrustação dos poros. A glicose e galactose seguem um modelo padrão de bloqueio enquanto os GOS e a lactose seguem um modelo de incrustação parcial. Foi possível também definir com a probabilidade de 68,3% que os poros de permeação da membrana NP030 estão contidos no intervalo entre 1,94-3,47 nm.

Finalmente, nada impede que essa técnica de purificação parcial seja utilizada industrialmente, visando aumentar a eficiência e a economia da produção. Para isso, uma análise mais detalhada do processo se faz necessário.

