

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

***FRACIONAMENTO A PARTIR DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE EM  
REATOR CONTÍNUO UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO***

JÉSSICA DE CARVALHO LIMA

Maringá – PR – Brasil

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

***FRACIONAMENTO A PARTIR DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE EM  
REATOR CONTÍNUO UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO***

Tese de Doutorado submetida à Universidade  
Estadual de Maringá, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do Título de Doutor em  
Engenharia Química.

MSc. Eng<sup>a</sup>. Jéssica de Carvalho Lima  
Orientador: Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho, PhD  
Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Jane Sélia dos Reis Coimbra

Maringá – PR – Brasil

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

L732f Lima, Jéssica de Carvalho  
Fracionamento a partir de isolado proteico de soro de leite em reator contínuo utilizando dióxido de carbono supercrítico / Jéssica de Carvalho Lima. - Maringá, PR, 2018.  
91 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho.  
Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jane Sélia dos Reis Coimbra.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2018.

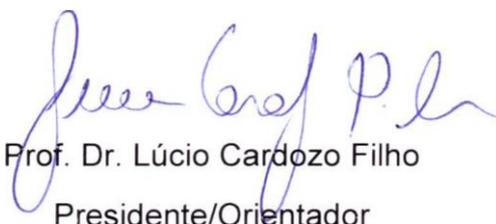
1. Soro do leite bovino - Isolado de proteína. 2. Fracionamento de proteína - Leite bovino. I. Cardozo Filho, Lucio, orient. II. Coimbra, Jane Sélia dos Reis, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 23.ed. 637.1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Jéssica de Carvalho Lima perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 27 de julho de 2018.

COMISSÃO JULGADORA

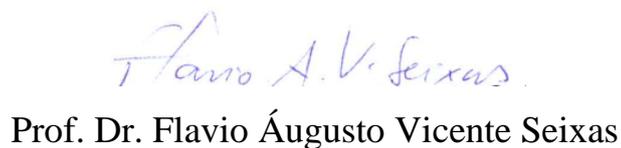


Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho  
Presidente/Orientador



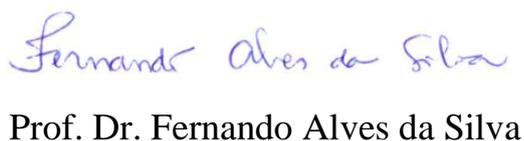
Prof. Dr. Carlos Eduardo Barão

Membro



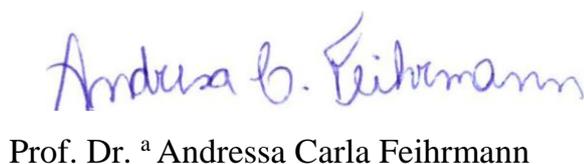
Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

Membro



Prof. Dr. Fernando Alves da Silva

Membro



Prof. Dr.ª Andressa Carla Feihrmann

Membro

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me conceder as condições necessárias para encarar esta  
jornada;*

*Ao professor Lúcio por ter me orientado ao decorrer desta pesquisa, ter  
me indicado bons caminhos para o desenvolvimento da minha vida  
acadêmica e ter me possibilitado a chance de conhecer pessoas e  
lugares;*

*À professora Jane que me orientou e somou nesta pesquisa com seu  
conhecimento no tema, e por me receber na Universidade Federal de  
Viçosa;*

*Ao professor Flavio por me receber em seu laboratório e me auxiliar e  
capacitar para as análises;*

*Aos colegas Stéphanie, Carlos, Tatiana, Pedro e Lucas por ajudar e  
socorrer em várias dúvidas que surgiram ao longo da pesquisa;*

*Ao amigo Fernando por ser meu irmão, meu pai e meu professor;*

*Aos amigos e companheiros de trabalho que estiveram presentes tanto  
nas horas de discussões de ideias quanto nas horas de descontração;*

*À minha família que sempre me apoia e está presente, principalmente,  
mãe, vó e irmã.*

# ***FRACIONAMENTO A PARTIR DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE EM REATOR CONTÍNUO UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO***

**Autor: Jéssica de Carvalho Lima**

**Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jane Sélia Reis Coimbra**

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, D90 – sala 109; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, defendida em 27 de julho de 2018. 110 p.

## **RESUMO**

Neste trabalho, o isolado proteico do soro do leite bovino (WPI) foi utilizado como matéria-prima para a obtenção de correntes individuais das proteínas  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) e  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) purificadas. Para tanto, foi desenvolvido um reator de fluxo contínuo utilizando dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) como solvente para permitir a acidificação no meio reacional contendo suspensões com concentração de 1 e 5% de WPI. As condições de processamento avaliadas foram pressão (8, 16 e 24 MPa) e temperatura (55, 60 e 65 °C). A confirmação do fracionamento foi realizada por meio de análise quantitativa das proteínas conduzida em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os níveis de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram utilizados para o cálculo da seletividade (razão  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg). A suspensão de WPI (1% massa/massa; sem tratamento) utilizada no fracionamento do soro sob alta pressão apresentou razão de  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg de 0,37. Após o tratamento do WPI com scCO<sub>2</sub>, a condição da extração a 16 MPa e 55 °C resultou na maior razão  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg (4,01), com correspondente recuperação de  $\alpha$ -La no precipitado de 39,6% e rendimento de 14,9%. A condição de processo de maior seletividade foi 8 MPa e 55 °C, com recuperação da  $\alpha$ -La no precipitado de 52,9%, rendimento de 20,9% e razão  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg de 3,84. Portanto, esta condição foi considerada o melhor binômio pressão/temperatura para a obtenção de  $\alpha$ -La, devido à alta seletividade, rendimento e recuperação da proteína e menor custo energético. O uso desta condição também resultou em uma corrente rica em  $\beta$ -Lg com alta seletividade ( $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg de 0,12). Além disso, menores valores de pressão e de temperatura significam menor custo com energia. A suspensão de WPI (5% massa/massa; sem tratamento) utilizada no fracionamento do soro a alta pressão apresentou razão de  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg de 0,34. A maior seletividade foi obtida

ao utilizar o binômio 16 Mpa/60 °C, com respectiva razão  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg de 5,42, recuperação de proteína  $\alpha$ -La no precipitado de 24,5% e rendimento de 13,5%. A condição de 8 MPa/65 °C, com razão  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg de 3,66, rendimento de 14,8% e a recuperação de  $\alpha$ -La no precipitado de 52,7%, é também uma alternativa, devido a elevada recuperação da  $\alpha$ -La. A influência da tecnologia supercrítica na desnaturação das proteínas foi estudada a partir dos espectros de dicroísmo circular (DC). Para tanto, foram conduzidas análises de DC a fim de determinar o perfil da estrutura secundária das proteínas puras ( $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg) e das proteínas fracionadas presentes nas correntes obtidas com suspensão de WPI 1%, nas condições de extração extremas, de 24 MPa e 65 °C. Os resultados indicaram que nessa condição de operação, a  $\alpha$ -La foi parcialmente desnaturado e  $\beta$ -Lg permaneceu em seu estado nativo. O software Aspen Plus<sup>®</sup> foi utilizado para realizar a análise econômica da extração das proteínas utilizando scCO<sub>2</sub>. Verificou-se que a obtenção de correntes enriquecidas em  $\alpha$ -La é mais rentável quando se usa o scCO<sub>2</sub>, em modo contínuo, em comparação com reação em batelada.

**Palavras-chave:** Isolado de proteína do soro de leite;  $\alpha$ -Lactalbumina;  $\beta$ -Lactoglobulina; análise econômica; estrutura secundária.

# FRACTIONATION OF WHEY PROTEIN ISOLATE IN CONTINUOUS REACTOR USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

**Author: Jéssica de Carvalho Lima**

**PhD. Thesis Advisor: Prof. PhD. Lúcio Cardozo Filho**

**DS. Thesis Co-advisor: Prof. DS Jane Sélia Reis Coimbra**

Doctoral thesis; Pos-Graduation Program in Chemical Engineering; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco D90 – sala 109; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, defended in July, 27<sup>th</sup>, 2018. 110 p.

## ABSTRACT

In this framework, bovine milk whey protein isolate (WPI) was used as a protein source for the production of purified  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) and  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) fractions. A continuous flow reactor was developed. Supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) was used as solvent to allow acidification in the reaction medium. Solutions with 1 and 5% concentration of WPI were used. The pressure conditions evaluated were 8, 16 and 24 MPa and temperatures of 55, 60 and 65 °C. The fractionation was verified by means of quantitative analysis conducted in HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The levels of  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg were used to calculate the selectivity ( $\alpha/\beta$  ratio). The results were statistically analyzed using Statistica 8.0 software. The  $\alpha$ -La: $\beta$ -Lg ratio in the untreated (initial) WPI used in fractionation with 1% WPI solution was 1:2.7. The condition resulting in higher ratio  $\alpha/\beta$  (4.01) was applying 16 MPa and 55 °C, with recovery of  $\alpha$ -La protein of 39.6% and yield of 14.9%. The second most selective pressure and temperature combination was 8 MPa and 55 °C. In this condition, recovery of the  $\alpha$ -La protein in the precipitate was 52.9%, yield 20.9% and  $\alpha / \beta$  ratio = 3.84. Therefore, this condition was considered the best condition for obtaining  $\alpha$ -La, due to the high selectivity, yield and recovery of the  $\alpha$ -La protein. This condition also resulted in a  $\beta$ -Lg rich fraction with high selectivity ( $\alpha / \beta = 0.12$ ). In addition, lower pressures and temperatures mean less energy costs. The untreated WPI solution used in the 5% fractionation had  $\alpha/\beta$  ratio = 0.34. The best selectivity obtained was  $\alpha/\beta$  ratio = 5.42, with  $\alpha$ -La protein recovery = 24.5% and yield = 13.5%, using a pressure of 16 MPa and temperature of 60 °C. However, when using the pressure 8 MPa and temperature 65 °C, the

ratio  $\alpha/\beta$  was 3.66, yield of 14.8% and recovery of  $\alpha$ -La of 52.7%, showing more viability due to higher production and recovery. Circular dichroism (DC) analyzes were performed to determine the secondary structure profile of fractioned samples with 1% WPI solution, 24 MPa and 65 °C, as well as pure  $\alpha$ La and  $\beta$ -Lg proteins. From this profile it was possible to evaluate the influence of supercritical technology on protein denaturation. The results indicated that, under these operating conditions,  $\alpha$ -La was partially denatured and  $\beta$ -Lg remained in its native state. The economic analysis was performed for all operating conditions using the Aspen Plus software and it was verified that the production of fractions enriched in  $\alpha$ -La using scCO<sub>2</sub> in continuous mode is more profitable than the production in batch reactor available in the literature.

**Keywords:** whey protein isolate;  $\alpha$ -Lactalbumin;  $\beta$ -Lactoglobulin; economic analysis; secondary structure.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivos.....	2
1.2 Estrutura do trabalho.....	3
1.3 Contribuição Científica do Trabalho .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	3
2.1 Soro do leite bovino.....	3
2.2 Proteínas do soro do leite bovino .....	5
2.2.1 Alfa-lactalbumina .....	6
2.2.2 Beta-lactoglobulina.....	7
2.2.3 Glicomacropéptido.....	9
2.3 Fracionamento das proteínas .....	9
2.4 Utilização do CO <sub>2</sub> em meio supercrítico no fracionamento de proteínas.....	12
2.4.1 sCCO <sub>2</sub> em meio aquoso .....	13
2.4.2 Precipitação da proteína $\alpha$ -La .....	15
2.5 Estrutura das proteínas.....	16
2.5.1 Dicroísmo Circular .....	18
2.6 Precipitação da proteína $\alpha$ -La em meio supercrítico utilizando o reator contínuo.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
3.1 Reação de fracionamento em batelada .....	21
3.2 Determinação de proteínas por eletroforese em gel .....	24
3.3 Determinação do pH da suspensão no ambiente reacional.....	27
3.3.1 Determinação da distribuição do tempo de residência .....	27
3.4 Planejamento Experimental.....	29
3.5 Reação de fracionamento das proteínas.....	31
3.5.1 Equipamento.....	31

3.5.2 Desenvolvimento do fracionamento das proteínas no reator contínuo.....	32
3.5.3 Liofilização .....	33
3.6 Análises experimentais .....	34
3.6.1 Determinação do teor das proteínas $\alpha$ -lactalbumina e $\beta$ -lactoglobulina .....	34
3.6.2 Determinação do teor de glicomacropéptido .....	36
3.6.3 Análise de dicroísmo circular .....	37
3.7 Análise e simulação econômica.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1 Resultados Preliminares .....	42
4.1.1 Determinação da composição do WPI antes do fracionamento .....	42
4.1.2 Reação em batelada .....	43
4.1.3 Determinação da distribuição do tempo de residência .....	45
4.1.4 Determinação da concentração baseada nos cálculos do pH.....	47
4.2 Quantificação de $\alpha$ -Lactalbumina e $\beta$ -Lactoglobulina por cromatografia líquida .....	48
4.2.1 Composição das frações obtidas por meio da suspensão 1% WPI.....	48
4.2.2 Composição das frações obtidas por meio da suspensão 5% WPI.....	57
4.3 Dicroísmo circular .....	65
4.3.3 Proteína $\beta$ -Lactoglobulina .....	70
4.4 Análise e simulação econômica.....	73
4.4.3 Análise comparativa .....	77
5 CONCLUSÕES .....	78
REFERÊNCIAS .....	81
MATERIAL COMPLEMENTAR .....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da proteína $\alpha$ -Lactalbumina bovina obtida a partir das coordenadas espaciais depositadas em Protein Data Bank (pdbid: 1f6r). .....	7
Figura 2. Representação da estrutura da proteína $\beta$ -lactoglobulina bovina obtida a partir das coordenadas espaciais depositadas em Protein Data Bank (pdbid: 4gny). .....	8
Figura 3. Espectros de dicroísmo circular característicos da proteína. ....	19
Figura 4. Aparato utilizado na reação em batelada para o fracionamento das proteínas do soro de leite bovino $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg. ....	22
Figura 5. Aparato para análise de eletroforese em gel (SDS-PAGE). ....	25
Figura 6. Esquema representativo da técnica de SDS-PAGE. ....	27
Figura 7. Experimento de determinação da distribuição do tempo de residência utilizando método degrau. ....	28
Figura 8. Representação do aparato de fracionamento de proteínas em meio supercrítico. HS: corrente aquecida; CS: corrente resfriada; CR: reator contínuo; CC: Elutriador. ....	31
Figura 9. Liofilizador de bancada. ....	34
Figura 10. Equipamentos utilizados para análise de dicroísmo circular. ....	37
Figura 11. Fluxograma simplificado para o processo contínuo de fracionamento de proteína a partir do WPI utilizando $scCO_2$ . ....	39
Figura 12. Precipitação de parte do material da suspensão aquosa de WPI em reator batelada. ....	43
Figura 13. Gel resultante da análise eletroforética - corrente solúvel das proteínas do WPI. ....	44
Figura 14. Gel resultante da análise eletroforética - corrente precipitada das proteínas do WPI. ....	45
Figura 15. Determinação da distribuição do tempo de residência - a) Curva F. b) Curva E. $\circ$ : E(t); $\bullet$ : Distribuição Gauss. ....	46
Figura 16. Influência da concentração do WPI e da pressão no pH da suspensão. $\blacksquare$ : 1% WPI; $\bullet$ : 2% WPI; $\blacktriangle$ : 5% WPI; $\blacktriangledown$ : 10% WPI. ....	47
Figura 17. Gráfico de Pareto - corrente rica em proteína $\alpha$ -La – suspensão 1%. ....	51
Figura 18. Gráfico de Pareto - Corrente solúvel (rica em $\beta$ -Lg) – 1% WPI. ....	53
Figura 19. Valores preditos x valores observados na corrente rica em $\alpha$ -La - suspensão 1% WPI a) modelo linear b) modelo quadrático. ....	54
Figura 20. Superfície de resposta - corrente rica em $\alpha$ -La -1% WPI. ....	56

Figura 21. Curva de nível - corrente rica em $\alpha$ -La – 1% WPI.....	56
Figura 22. Gráfico de Pareto – corrente precipitada (rica em $\alpha$ -La) – 5% WPI.....	59
Figura 23. Gráfico de Pareto – corrente solúvel (rica em $\beta$ -La) – 5% WPI. ....	61
Figura 24. Valores preditos x valores observados - suspensão 5% WPI a) modelo linear b) modelo quadrático. ....	62
Figura 25. Superfície de resposta - corrente rica em $\alpha$ -La -5% WPI.....	63
Figura 26. Curva de nível - corrente rica em $\alpha$ -La – 5% WPI.....	64
Figura 27. Variação da elipsidade bruta em função do comprimento de onda durante o processo de desnaturação – proteína $\alpha$ -La Sigma.....	66
Figura 28. Variação da elipticidade de $\alpha$ -La a 222 nm em função do aumento de temperatura (a) Padrão Sigma (b) corrente obtida no fracionamento.....	68
Figura 29. a) Variação da elipsidade bruta em função do comprimento de onda durante o processo de renaturação da proteína $\alpha$ -La. b) Variação da elipsidade bruta em 222 nm em função do aumento e diminuição da temperatura - proteína $\alpha$ -La Sigma.....	70
Figura 30. Variação da elipticidade de $\beta$ -Lg a 205 nm em função do aumento da temperatura. ....	72
Figura 31 Fluxograma do processo contínuo de fracionamento de proteínas projetado em Aspen Plus®. ....	75

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição do soro de leite doce e ácido.....	4
Tabela 2. Soluções de tampão fosfato. ....	21
Tabela 3. Planejamento experimental – ensaios preliminares no reator batelada. ....	24
Tabela 4. Composição do gel de poliacrilamida.....	25
Tabela 5. Planejamento experimental.....	29
Tabela 6. Cálculo da Análise de Variância.....	30
Tabela 7. Vazão de alimentação do CO <sub>2</sub> na reação de acordo com a densidade.....	33
Tabela 8. Gradiente empregado na determinação analítica do GMP. ....	37
Tabela 9. Composição do WPI antes do fracionamento das proteínas.....	42
Tabela 10. Tempo de residência referente as vazões testadas. ....	46
Tabela 11. Pressões necessárias para atingir o ponto isoelétrico da proteína $\alpha$ -La nas concentrações pré-determinadas.....	47
Tabela 12. Composição das frações após a reação – 1% WPI. ....	49
Tabela 13. Análise de Variância – 1% WPI. ....	55
Tabela 14. Coeficiente de Regressão – 1% WPI. ....	55
Tabela 15. Composição das frações após a reação – 5% WPI. ....	58
Tabela 16. Análise de Variância – 5% WPI. ....	62
Tabela 17. Coeficiente de Regressão - 5% WPI.....	63
Tabela 18. Comparação entre a estimativa da composição (%) dos elementos da estrutura secundária para cada amostra analisada de $\alpha$ -La. ....	67
Tabela 19. Comparação entre a estimativa da composição (%) dos elementos da estrutura secundária para cada amostra analisada de $\beta$ -Lg.....	71
Tabela 20. Temperatura de transição da proteína $\beta$ -Lg – pura e fracionada. ....	73
Tabela 21. Balanço de massa para o diagrama simplificado da Figura 10, de acordo com as correntes numeradas, calculado usando os resultados experimentais com CWPI = 1%, T = 60 °C e P = 16 MPa (caso base). ....	74
Tabela 22. Equipamento e especificações para fracionamento de WPI com scCO <sub>2</sub> – T = 60 °C, P = 16 MPa, C = 1% e tempo de residência de 34 min. ....	75
Tabela 23. Custos de produção como função dos parâmetros de operação para uma taxa de alimentação WPI de 970 kg/h.....	76
Tabela 24. Análise comparativa do processo proposto. ....	78

## NOMENCLATURA

AA – Aminoácidos essenciais humanos

ANOVA – Análise de Variância

BCAA – Aminoácidos de cadeia ramificada

BPR – “Back Pressure”

$C_0$  – Concentração da entrada do reator

CD – Circular Dichroism

$C_t$  – Concentração na saída do reator

D – Desdobrado

DD – Dímero dobrado

DTR – Distribuição do Tempo de Residência

GL – grau de liberdade

GMP – Glicomacropéptido

M – monômero

MG – “Molten Globule”

MQR - Média quadrada dos resíduos.

MQR - Média quadrada da regressão

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PDB – “Protein Data Bank”

Pdbid – Indicador PDB

PDCAA – “Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score”

CDNN – “Circular Dichroism analysis using Neural Networks”

HHP – Alta Pressão Hidrostática

scCO<sub>2</sub> – CO<sub>2</sub> supercrítico

SDS – “Dodecil Sulfato de Sódio”

SQep – Soma do quadrado do erro puro

SQfa - Soma dos quadrados da falta de ajuste

SQr - Soma dos quadrados dos resíduos

SQR - Soma dos quadrados da regressão

SQT - Soma dos quadrados total

TEMED – “N,N,N',N'-tetramethylenediamine”

TFA – Ácido trifluoracético

T<sub>m</sub> – Temperatura de Transição

WPC – Concentrado Proteico do Soro do Leite

WPI - Isolado Proteico do Soro do Leite

α-La – α-Lactalbumina

β-Lg – β-Lactoglobulina

## 1. INTRODUÇÃO

O soro do leite é um subproduto que durante anos foi descartado como resíduo ou aproveitado apenas para alimentação de animais. É uma substância com alta carga orgânica, apresentando demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 30.000 e 50.000 mg·L<sup>-1</sup> e demanda química de oxigênio (DQO) de 60.000 a 80.000 mg·L<sup>-1</sup>. Mais de 145 milhões de toneladas de soro são produzidas anualmente no mundo (MACWAN et al., 2016). Cerca de 40% do soro não é reaproveitado (PANGHAL et al., 2018), o que resulta numa quantidade significativa de nutrientes lácteos descartados, como proteínas, açúcar e sais, que poderiam ser utilizados. Adicionalmente, o descarte do soro sem o tratamento adequado é um problema de contaminação para o meio ambiente.

As informações científicas sobre a importância das propriedades biológicas do soro do leite despertaram o interesse no seu uso e na comercialização de seus produtos derivados. O tema é amplo e complexo devido às inúmeras aplicações dos derivados de soro e de seus compostos bioativos que podem ser obtidos por diferentes formas (concentrados e isolados) e com diferentes graus de pureza (MACWAN et al., 2016; PANGHAL et al., 2018). Vários métodos para recuperação de compostos do soro do leite, com destaque para as proteínas, já são aplicados, como nanofiltração, microfiltração, osmose reversa, ultrafiltração, hidrólise, eletrodialise, troca iônica, entre outros. As indústrias de laticínios utilizam principalmente processos de filtração para o tratamento de soro de leite (PARIMAL; JAYATO, 2016).

Dentre as proteínas do soro do leite – ou *whey protein* – presentes em maior quantidade estão a  $\alpha$ -Lactalbumina ( $\alpha$ -La) e  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg). Dentre as proteínas presentes em menor quantidade, as *minor proteins* e peptídeos, estão a albumina do soro bovino, a lactoferrina, a imunoglobulina e o glicomacropéptido (GMP) (MACWAN et al., 2016). Mediante as especificidades de cada uma das proteínas, surge a necessidade de desenvolvimento de metodologias sustentáveis e seguras de fracionamento, que permitam a aplicação na indústria com geração reduzida de resíduos e livre de produtos químicos. O fracionamento das proteínas majoritárias do *whey protein* ( $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg) a partir de técnicas baseadas na diferença no tamanho das moléculas torna-se inviável, dado à similaridade do tamanho das partículas. Assim, a separação por meio de precipitação é uma vertente de manuseio com potencial para aplicação industrial.

Solventes orgânicos podem ser utilizados para acidificação, e conseqüente precipitação da solução. No entanto, a indústria farmacêutica e de alimentos se apresentam cada vez mais exigentes em relação a aplicação de contaminantes que necessitem de tratamentos posteriores para a purificação dos produtos, dada a necessidade de investimento, tanto para obtenção de um produto puro quanto para atender normas ambientais.

O dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) é aplicado com diversas finalidades na indústria alimentícia e farmacêutica, tanto para fracionamento de compostos quanto para inativação de microrganismos por meio de acidificação do meio, entre outros (HOTCHKISS; LOSS, 2006). Dispensa a aplicação de técnicas para posterior remoção visto que é eliminado instantaneamente do produto após a despressurização do meio, além de apresentar diversas vantagens amplamente abordadas na literatura (JOKIĆ et al., 2017).

A utilização de reações em modo batelada ainda é muito aplicada na indústria. No entanto, o desenvolvimento de métodos contínuos tem despertado crescente interesse, dado as vantagens econômicas, de segurança, entre outros (WILES; WATTS, 2014).

## 1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar, em escala laboratorial, o fracionamento das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg a partir do isolado proteico do soro de leite utilizando scCO<sub>2</sub> em reator de fluxo contínuo.

Os objetivos específicos foram:

- Analisar a utilização do scCO<sub>2</sub> na precipitação da proteína do soro do leite  $\alpha$ -La;
- Desenvolver um reator de fluxo contínuo para utilização de altas pressões;
- Desenvolver uma metodologia de fracionamento de proteínas do soro do leite em fluxo contínuo empregando scCO<sub>2</sub> como solvente;
- Selecionar as melhores condições para o fracionamento de proteínas do soro do leite;
- Analisar, utilizando dicroísmo circular, a estrutura secundária das frações das proteínas do soro do leite obtidas no reator contínuo para verificação de possíveis desnaturações irreversíveis.

## **1.2 Estrutura do trabalho**

Este trabalho foi dividido em cinco sessões, sendo que a primeira proporciona uma visão geral da problemática, os objetivos a serem atingidos e a sua contribuição científica.

Na segunda sessão, introduz-se a revisão bibliográfica, descrevendo de forma geral o soro de leite e as principais proteínas que o compõe, metodologias de fracionamento de proteínas do soro do leite disponíveis na literatura e a utilização do CO<sub>2</sub> supercrítico neste cenário, além de discorrer a respeito do dicróismo circular como metodologia para determinação da estrutura das proteínas.

A terceira sessão apresenta as metodologias de fracionamento utilizadas nesta pesquisa, bem como a construção do reator de fluxo contínuo, análises quantitativas e qualitativas desenvolvidas e método de avaliação econômica.

Na quarta sessão está apresentado a análise crítica e discussão dos resultados obtidos e também são apresentadas recomendações para trabalhos futuros.

Por fim, na quinta sessão encontram-se as principais referências que contribuíram para a concretização deste trabalho.

## **1.3 Contribuição Científica do Trabalho**

As principais contribuições científicas deste trabalho são o desenvolvimento de reator, em modo contínuo, para fracionamento de proteínas a partir do isolado proteico do soro de leite e definição dos melhores parâmetros para produção de frações enriquecidas nas proteínas majoritárias do soro, a  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg, de forma a abrir precedentes para estudos mais aprofundados da técnica para possível aplicação na indústria de produtos lácteos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Soro do leite bovino**

O soro de leite é a fase remanescente na fabricação de queijos após a coagulação do leite e remoção da caseína (DRAGONE et al., 2009). Em 2014, a produção de leite de vaca no

Brasil foi de 33,12 bilhões de litros. A produção de queijo no mesmo ano foi de 42,3 mil toneladas (FAO, 2014). Para a produção de 1 Kg de queijo, 10 Kg de leite são processados, produzindo 9 Kg de soro de leite, ou seja, 90% do total do leite utilizado (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Portanto, estima-se que em 2014 a produção de soro de leite tenha sido de 380,7 mil toneladas no Brasil.

Tradicionalmente, soro de leite tem sido classificado, baseado nas condições de processamento, em soro de leite doce e soro de leite ácido. O soro doce é obtido pela coagulação enzimática da caseína e o soro ácido pela coagulação por bactérias lácteas. A principal distinção destes é o pH, sendo entre 6,0 e 6,5 para o soro de leite doce e de aproximadamente 4,5 do soro de leite ácido, seguido por pequenas, porém importantes, diferenças na composição (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; CHANDRAPALA et al., 2016; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015). Na Tabela 1 está disposta a composição do soro de leite doce e ácido a título de comparação entre eles. Essa composição pode variar diante de vários fatores na linha de produção (SMITH, 2014).

Tabela 1. Composição do soro de leite doce e ácido.

<b>Componente</b>	<b>Soro de leite doce</b>	<b>Soro de leite ácido</b>
Sólidos totais (%)	6,3	6,4
Proteínas (%)	0,8	0,5
Lactose (%)	4,9	4,4
Minerais (%)	0,5	0,6
Cálcio (mg/100g)	45	103
pH	~6,0	<5,5

O soro de leite é produzido em larga escala e ainda é frequentemente tratado como resíduo (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; SLUKOVA et al., 2016). Apresenta altos valores de demanda bioquímica de oxigênio, que varia entre 30 e 50 kg.m<sup>-3</sup>, e demanda química de oxigênio, entre 60 e 80 kg.m<sup>-3</sup> (MACWAN et al., 2016). O descarte dessas substâncias depende de investimentos que não trazem retorno financeiro para a indústria. Portanto, a busca pela melhoria dos processos para beneficiamento desses constituintes é importante e desperta o

interesse da indústria de lácteos, devido ao valor comercial atribuído, em especial as proteínas (YADAV et al., 2015).

Alguns dos componentes do soro do leite podem ser separados utilizando a tecnologia de separa o por membrana. O uso combinado de membranas com diferentes aplica es   comum (BALDASSO et al., 2011; KUMAR et al., 2013). Esta tecnologia pode ser utilizada para a obten o de queijo desnatado, redu o de cálcio, remo o de lactose, redu o de sólidos totais e concentra o das proteínas (KUMAR et al., 2013).

Os constituintes podem ter diversas aplica es na indústria. Produtos com baixo teor de lactose são direcionados para consumidores com intolerância ou alergia. No entanto, estudos recentes demonstram a aplica o deste aço no desenvolvimento de oleato de lactose como um intensificador de absor o intestinal e/ou um conservante biodegradável alternativo para aplica es farmacêuticas e de alimentos, como na produ o de galacto-oligossacarídeo, que   um alimento probiótico (JENAB et al., 2018; PERINELLI et al., 2018).

Mesmo com a aplica o da lactose na indústria, os constituintes do soro de leite com maior valor agregado são as proteínas. A proteína do soro do leite   comumente comercializada como suplemento alimentar em forma de concentrados proteicos (WPC) com teor de proteínas de até 89,5%, e de isolados proteicos (WPI) com teor de proteína superior a 89,5%. A seguir serão abordadas com maiores detalhes.

## **2.2 Proteínas do soro do leite bovino**

A Digestibilidade Proteica (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score – PDCAAS) representa a medida da % das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado. Se não hidrolisadas, elas serão excretadas pelas fezes ou utilizada como pr biotico. Este score pode variar entre 0 e 1, sendo que o PDCAAS das proteínas do soro do leite   igual a 1. Além disso, o valor biológico dessas proteínas   superior às proteínas da caseína do leite (DULLIUS et al., 2018). O alto valor biológico das proteínas do soro do leite   atribuído   presença de aminoácidos essenciais humanos (AAs) e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) (SMITHERS, 2015).

As proteínas do soro de leite são a  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, imunoglobulinas, albumina de soro bovino, lactoferrina, lactoperoxidase, proteo-peptona e glicomacropéptido. As características de cada tipo de proteína são diferentes, com características funcionais, fisiológicas e neutracêuticas específicas, visto que são formados por diferentes peptídeos (YADAV et al., 2015).

Os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas. Eles apresentam efeito positivo nas funções do corpo e influenciam a saúde. Os métodos para liberação dos peptídeos a partir das proteínas incluem hidrólise enzimática, fermentação microbiana por culturas proteolíticas ou durante a digestão gastrointestinal. Além disso, as tecnologias de DNA recombinante estão sendo investigadas para a obtenção de grandes quantidades de frações peptídicas altamente purificadas (REBOUILLAT; ORTEGA-REQUENA, 2015).

Alguns peptídeos derivados das proteínas do soro do leite são comercializados em fragmentos para redução da pressão sanguínea, prevenção de cáries dentais, coagulação sanguínea, bactericida, antiviral, relaxante e auxiliar do sono, redução de acne, redução dos sintomas da psoríase e propriedades antiinflamatórias (DULLIUS et al., 2018). Além disso, erradicam ou suprimem o crescimento de microrganismos e podem ter atividade similar a antibióticos (PRITCHARD; KAILASAPATHY, 2011). Podem apresentar ainda propriedades antimicrobianas, antioxidantes, opióides e antitrombóticas (ALAMDARI; EHSANI; AZAD, 2017; BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015). As principais proteínas do soro do leite serão apresentadas a seguir.

### **2.2.1 Alfa-lactalbumina**

A proteína  $\alpha$ -La, representada na Figura 1, é uma metaloproteína, pois ela se liga a um íon  $\text{Ca}^{2+}$  para cada mol de proteína em uma espécie de “bolsa”, contendo quatro resíduos do aminoácido asparagina (Asp). Consiste entre 120 e 142 aminoácidos e aproximadamente 14 kDa (FOX et al., 2015). Apresenta ponto isoelétrico entre 4,2 e 4,5 (FRYDENBERG et al., 2016; PRITCHARD; KAILASAPATHY, 2011; YADAV et al., 2015). É classificada como albumina de acordo com a solubilidade, ou seja, solúvel em água (JAIN, 2005).

Esta proteína é sintetizada e segregada pela glândula mamária. Contém quatro ligações dissulfeto e oito resíduos de cisteína. Foram identificadas três variantes genéticas (A, B e C). É a principal proteína no leite humano e representa 20% das proteínas do soro de leite bovino (FOX et al., 2015; PRITCHARD; KAILASAPATHY, 2011).

É rica no aminoácido triptofano, que auxilia na formação da serotonina. Esta proteína ajuda ainda na absorção de minerais, possui atividade antibacteriana, mostra efeitos imunomoduladores e atividade antitumoral (YADAV et al., 2015). Está sendo estudada como fármaco anticancerígeno e um adsorvente de glicose celular para evitar a diabetes tipo II (GILLESPIE et al., 2015; KALAIVANI; REGUPATHI, 2015). Além disso, o alimento enriquecido em  $\alpha$ -La é um complemento para dietas infantis ou para idosos (DATTA; TOMASULA, 2015).

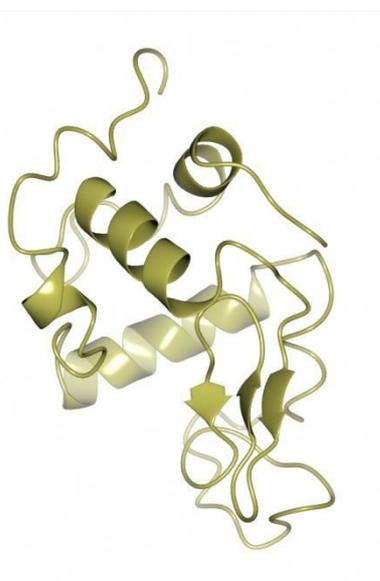


Figura 1. Representação da estrutura da proteína  $\alpha$ -Lactalbumina bovina obtida a partir das coordenadas espaciais depositadas em Protein Data Bank (pdbid: 1f6r) (CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000).

### 2.2.2 Beta-lactoglobulina

A proteína  $\beta$ -Lg, representada na Figura 2, é a proteína presente em maior quantidade no soro de leite bovino, representando cerca de 50% das proteínas totais, e é ausente no leite humano (MARTINEZ et al., 2016). É a proteína mais alergênica dentre as proteínas do leite,

portanto, deve ser ausente ou apresentar menores teores em alimentos para crianças (KALAIVANI; REGUPATHI, 2015; MARTINEZ et al., 2016).

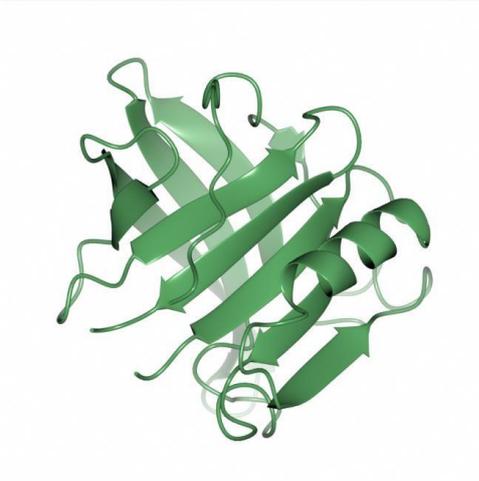


Figura 2. Representação da estrutura da proteína  $\beta$ -lactoglobulina bovina obtida a partir das coordenadas espaciais depositadas em Protein Data Bank (pdbid: 4gny) (GUTIÉRREZMAGDALENO et al., 2013).

É classificada como globulina, sendo solúvel em soluções diluídas de sal no pH 7,0 (JAIN, 2005). Consiste em uma cadeia contendo entre 160 e 180 aminoácidos com um peso molecular aproximado de 18 kDa (PRITCHARD; KAILASAPATHY, 2011; YADAV et al., 2015). Alguns trabalhos reportam o ponto isoelétrico próximo de 5,13, e outros entre 5,35 e 5,49 (FRYDENBERG et al., 2016; YADAV et al., 2015).

Contém aminoácidos sulfurados, contem 2 mols de cistina e 1 mol de cisteína por monômero de 18 KDa. A cisteína é especialmente importante, uma vez que reage, após desnaturação por aquecimento, com o dissulfeto de  $\kappa$ -caseína e afeta significativamente coagulação do coalho e as propriedades de estabilidade térmica do leite, sendo também responsável pelo sabor do leite aquecido (FOX et al., 2015).

No leite bovino apresenta as variantes genéticas A e B que se diferem em duas posições de aminoácidos; no entanto, cinco variantes genéticas foram identificadas (PRITCHARD; KAILASAPATHY, 2011).

O alto conteúdo de  $\beta$ -LG na WPI leva a propriedades funcionais melhoradas, como estabilidade da emulsão, atividade, viscosidade e propriedades de gelificação em comparação

com o WPC (YADAV et al., 2015). Alimentos enriquecidos com proteína  $\beta$ -Lg são importantes também para nutrição esportiva (DATTA; TOMASULA, 2015).

### 2.2.3 Glicomacropéptido

O GMP é um péptido produzido a partir da digestão da caseína durante o primeiro passo do processamento de queijo, enquanto as demais proteínas estão naturalmente presentes no soro (MARTINEZ et al., 2016; YADAV et al., 2015). Apresenta massa molar de aproximadamente 8 KDa (BRODY, 2000).

O GMP não possui o aminoácido fenilalanina e é fonte de aminoácidos para pacientes fenilcetonúricos (BRODY, 2000). É 100% solúvel em meio aquoso e resistente a aquecimento e baixo pH, sendo ideal para aplicação em bebidas (DATTA; TOMASULA, 2015).

Após a  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, o GMP é a proteína/péptido presente no soro do leite em maior quantidade, representando aproximadamente 20%. Nas últimas décadas a literatura destacou a capacidade do GMP de inibir a ligação da toxina da cólera ao seu receptor e inibir a hemaglutinação do vírus da gripe; exibe efeitos promotores de crescimento nos bifidobactérias, que conferem melhor modulação da microbiota intestinal e, portanto, do sistema imunológico (BRODY, 2000; DA SILVA et al., 2009).

A partir dos benefícios específicos de cada tipo de proteína, surge o interesse em obter produtos com alto teor de pureza. Será abordado a seguir alguns métodos de fracionamento presentes na literatura.

## 2.3 Fracionamento das proteínas

Existem diversos métodos para separar proteínas, incluindo precipitação ácida, isoeletrica e *salting out*; adsorção; cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida ou cromatografia de afinidade; e ainda por diferença de tamanho utilizando técnicas como diálise, eletroforese em gel, ou membranas de osmose reversa, nanofiltração, ultrafiltração e microfiltração (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2013; SCOPES, 2013; YADAV et al., 2015).

Um método utilizando coluna de troca iônica (Mono Q) e eluição gradiente de sal por aumento da força iônica do tampão (Tris-HCl 20 mM mais NaCl 0 a 1 M) permitiu recuperação de 60,5% de  $\beta$ -LG purificada a partir do WPC 80 (concentrado de whey protein com 80% de pureza). Para purificação de  $\alpha$ -La seria necessário um passo subsequente, separando das demais proteínas (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012). No entanto, os sistemas de cromatografia normalmente são caros e geram grandes volumes de efluentes contendo sais.

A ultrafiltração é utilizada para isolamento de proteínas do soro do leite, no entanto, não é capaz de fracionar proteínas com tamanhos similares. Ao colocar uma carga na membrana e ajustando o pH e a força iônica da solução, é possível excluir eletrostaticamente proteínas que carregam uma carga líquida semelhante à da membrana. Um estudo utilizou membranas de ultrafiltração carregadas positivamente em dois estágios para fracionamento de uma solução contendo uma mistura 50:50 de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, obtendo uma porção de  $\alpha$ -La com até 87% de pureza (ARUNKUMAR; ETZEL, 2013). Alguns passos são necessários ao utilizar este processo, como a adição de NaOH e  $H_3PO_4$  à solução e a limpeza da membrana a cada processo de fracionamento, nem sempre evitando a diminuição da permeabilidade da membrana, sendo que em alguns casos 20% da permeabilidade ficou comprometida.

O fracionamento por meio de precipitação normalmente é realizado ajustando o pH da solução próximo ao ponto isoelétrico de uma das proteínas. Quando o pH é ajustado entre 4,2 e 4,6, e temperatura entre 50 e 65 °C, a  $\alpha$ -La precipita e a  $\beta$ -Lg permanece solúvel, obtendo-se assim uma corrente precipitada rica em  $\alpha$ -La com menor teor de  $\beta$ -Lg e uma corrente solúvel rica em  $\beta$ -Lg e com menor teor de  $\alpha$ -La (YADAV et al., 2015). Foram realizadas precipitações também utilizando agentes flocculantes como a bentonita, carboximetilcelulose e quitosana (CASAL et al., 2006; YADAV et al., 2014).

Lucena et al. (2006) utilizou um concentrado proteico de soro de leite com 65% de proteínas (WPC 65) para obter uma suspensão enriquecida com  $\alpha$ -La. Primeiramente,  $\alpha$ -La foi precipitada juntamente com a albumina do soro bovino e imunoglobulina por adição de ácido láctico, em um pH em torno de 4,0. O processo de precipitação da  $\alpha$ -La foi considerado reversível, pois ao retornar ao pH original, a proteína voltou a ser solúvel. Foi proposto então um processo consistindo em precipitação (1), seguida de centrifugação (2), precipitação novamente (3) e outra centrifugação (4) e finalmente solubilização do precipitado (5). O resultado foi uma corrente enriquecida em  $\alpha$ -La com pureza de 74%, com recuperação de 86%

da  $\alpha$ -La original, sendo que mais de 99% de  $\beta$ -Lg foi removida (EUGENIA LUCENA et al., 2006).

O processo de múltiplas etapas de ultrafiltração seguida de hidrólise utilizando tripsina e ultrafiltração novamente resultou em uma recuperação de  $\alpha$ -La de 15% e 90 – 95% de pureza (KONRAD; KLEINSCHMIDT, 2008), e os métodos cromatográficos de troca iônica e de afinidade atingiram uma recuperação de 36% e 48%, respectivamente e recuperação também acima de 90% (EL-SAYED; CHASE, 2011).

A precipitação de  $\beta$ -Lg a partir de soro de leite doce, WPCs e WPIs foi realizada utilizando HCl, ácido cítrico e ácido láctico. Os dois ácidos orgânicos conseguiram complexar os íons  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, quando se usou ácido clorídrico, a precipitação de proteínas foi devido à desnaturação irreversível das proteínas (LUCENA et al., 2007).

O fracionamento das proteínas do soro do leite foi estudado recentemente por meio de precipitação da proteína  $\beta$ -Lg (MARCINIAK et al., 2018). Para isso, uma solução contendo  $\alpha$ La,  $\beta$ -Lg e caseína (1: 1: 1) foi preparada em meio aquoso, com concentração final de 0,75%. Dois tipos de caseína foram aplicados, a micelar e a isoeletrica, com a finalidade de agir como ligante, auxiliando na agregação da proteína  $\beta$ -Lg. A solução foi submetida a tratamento com alta pressão hidrostática (HHP) com pressões entre 200 e 600 MPa por 100, 200 e 300 segundos à temperatura ambiente em uma unidade descontínua. Após o tratamento, a amostra foi acidificada para pH próximo ao ponto isoeletrico da caseína (4,6) com a adição de ácido clorídrico (HCl). A combinação de 600 MPa de pressão 300 segundos gerou o maior grau de purificação  $\alpha$ -La (86%) e recuperação de proteína (77%) usando caseína isoeletrica.

As diversas etapas na qual é submetido o composto para obtenção de frações puras normalmente torna o processo oneroso e demorado. Além disso, é necessária a posterior limpeza do precipitado devido a adição dos sais e correção do pH.

Outras técnicas vêm sendo estudadas, resultando em tecnologias inovadoras no âmbito de separação de compostos valiosos com alta pureza. A utilização de  $\text{CO}_2$  em meio supercrítico é uma técnica promissora no fracionamento de proteínas. A principal vantagem deste método é que o pH retorna às condições ambientais com a despressurização e dispensa o uso de solventes e contaminantes adicionais, possibilitando a obtenção de produtos com alta pureza por meio de ajuste de parâmetros.

Em estudos anteriores, o CO<sub>2</sub> supercrítico foi utilizado para fracionamento da  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La a partir da proteína de soro de leite isolada (WPI). Foram produzidas frações mais ricas em cada um destes componentes (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012).

#### **2.4 Utilização do CO<sub>2</sub> em meio supercrítico no fracionamento de proteínas**

Cada proteína do soro de leite tem pontos de solubilidade e estabilidade diferentes no CO<sub>2</sub>. Desta forma, métodos que permitam atingir os pontos de insolubilidade de forma seletiva por meio de ajuste de parâmetros podem ser interessantes.

A 55 °C e 8 MPa, a precipitação das proteínas do soro de leite é quase inexistente; quando a pressão e temperatura são aumentadas, as suspensões de WPC e WPI começam a aglomerar e fracionar. A  $\alpha$ -La, lactoferrina, albumina do soro bovino e imunoglobulinas precipitam com temperatura em torno de 60 – 65 °C e pressão entre 8 – 31 MPa (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012; YVER et al., 2011), enquanto a  $\beta$ -Lg precipita em torno de 70 – 80 °C e 31 MPa. Nesta mesma faixa de temperatura e pressão o GMP permanece solúvel em toda a faixa de temperatura e pressão estudadas (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012).

Tomasula (1998) estudou a precipitação de  $\alpha$ -La a partir do WPC 75 (soro de leite concentrado, contendo 75% de proteínas) utilizando scCO<sub>2</sub>. Foram realizados experimentos cujas variáveis analisadas foram pressão de 27,6, 41,4 e 5,52 MPa; temperatura de 54, 60 e 64 °C, tempo de residência de 15 minutos e suspensão de WPC 75 com concentração de 7, 16 e 25%. O reator foi alimentado com a suspensão e posteriormente pressurizado pela adição de CO<sub>2</sub>. A precipitação máxima de  $\alpha$ -La foi obtida ao utilizar concentração da suspensão de 7% de WPC 75; 64 °C e a variação das pressões analisadas não revelaram efeito significativo (TOMASULA et al., 1998).

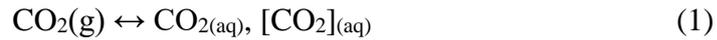
Yver et al. (2011) realizou a análise econômica do processo de fracionamento das proteínas  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La a partir do WPI utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. O desenvolvimento do fracionamento ocorreu sob condições ácidas de pH entre 4,4-5, temperatura de 60 a 65 °C e pressões 5,5 a 31 MPa por 2 horas. As suspensões foram preparadas com concentração de 5, 10 e 15 w% de WPI, utilizando água Milli-Q. Após a despressurização, a mistura proteica tratada foi centrifugada e a corrente sólida foi liofilizada para posterior análise. O WPI inicial apresentava aproximadamente três vezes mais  $\beta$ -Lg do que  $\alpha$ -La, e uma pequena quantidade de

*minor proteins*. Após o processamento, a corrente precipitada foi composta principalmente por  $\alpha$ -La e *minor proteins*, com uma quantidade negligenciável de  $\beta$ -Lg e ambas as frações líquida e sólida não apresentou sais e ácidos ou outros contaminantes. Entre as condições de processamento testadas, a pureza da corrente sólida  $\alpha$ -La variou de 39% a 61% (w/w), um enriquecimento de duas a três vezes em comparação com o WPI inicial, com recuperação de  $\alpha$ -La entre 60 e 98% na corrente sólida, e recuperação na corrente líquida de  $\beta$ -Lg e GMP de 63-89% e 88-97%, respectivamente.

O fracionamento das proteínas do soro de leite foi estudado em um reator batelada de alta pressão com  $s\text{CO}_2$  utilizando suspensões de isolado proteico do soro do leite (WPI). O procedimento experimental foi similar ao utilizado por Yver et al. (2011). Os parâmetros analisados foram concentração (2, 5, 7 e 10 wt%), temperatura (60 – 65 °C), pressão (8 – 31 MPa) e tempo de residência (26 – 270 min). A alta sensibilidade na cinética de agregação de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg aos parâmetros analisados (tempo, temperatura, concentração e pH) tornam os efeitos conflitantes para obtenção de condições adequadas no fracionamento das proteínas. Verificou-se o aumento da pureza dos produtos obtidos com o aumento do tempo de residência nas seguintes condições: C = 10% WPI, temperatura de reação de 60 °C, e pH 4,6, onde houve uma maior precipitação de  $\alpha$ -La, em relação a  $\beta$ -Lg, resultando em frações mais puras com razão  $\alpha/\beta$  de até 1,65 na corrente enriquecida com  $\alpha$ -La, e razão  $\alpha/\beta$  até 0,14 na corrente enriquecida com  $\beta$ -Lg. Neste estudo a proteína de soro de leite pura foi enriquecida até sete vezes para  $\alpha$ -La ou até 5 vezes para  $\beta$ -Lg e podem ser utilizadas em várias aplicações alimentares que promovem a saúde. Pode ainda receber pós-tratamento adicional como a lavagem e ultrafiltração para obter  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg, e GMP ainda mais puros (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012).

#### **2.4.1 $s\text{CO}_2$ em meio aquoso**

A concentração máxima possível de  $\text{CO}_2$  dissolvida em um líquido é obtida no equilíbrio termodinâmico e depende de parâmetros como pressão, temperatura e composição da solução. Essa adição de  $\text{CO}_2$  em soluções aquosas é chamada “carbonatação” e promove o abaixamento do pH decorrente da produção de ácido carbônico, bicarbonatos e íon hidrônio, de acordo com as equações a seguir (Equação 1 – 4) (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007):



A maior parte do  $\text{CO}_2$  dissolvido na água permanece na forma solvatada de  $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ . Uma pequena quantidade do  $\text{CO}_2$  reage com a água e forma ácido carbônico,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , e então uma porção de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dissocia em  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , o qual pode ainda dissociar em  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{H}^+$ . A constante de equilíbrio de todas as reações depende da pressão e da temperatura (HOTCHKISS; LOSS, 2006).

De acordo com a literatura, a água saturada com  $\text{CO}_2$  em condições atmosféricas tem o pH de aproximadamente 4,0. Há uma mudança no equilíbrio e a solubilidade do  $\text{CO}_2$  aumenta com o aumento da pressão e diminuição da temperatura, o que diminui o pH da solução gaseificada. A pressão também controla positivamente a taxa de dissolução de  $\text{CO}_2$  na solução e, acima do ponto crítico do  $\text{CO}_2$ , altas temperaturas diminuem a densidade de  $\text{CO}_2$  supercrítico e reduz as propriedades solventes (BRUNNER, 2009).

Por outro lado, o pH da solução de proteínas do soro de leite diminui de forma logarítmica com o aumento da pressão, mas aumenta com a concentração da proteína, devido às fortes propriedades de tamponamento das proteínas do soro. Pequenas variações na temperatura têm pouca influência no pH e na solubilidade de saturação do  $\text{CO}_2$  nessas soluções (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012; YVER et al., 2011).

O efeito dessa mudança de pH em soluções proteicas são reversíveis mediante a remoção do  $\text{CO}_2$  dissolvido, enquanto a injeção de grande quantidade de  $\text{CO}_2$  a altas temperaturas e pressões podem causar precipitações irreversíveis da caseína ou de outras proteínas do soro do leite (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012).

### 2.4.2 Precipitação da proteína $\alpha$ -La

Geralmente, em qualquer pH que seja diferente do ponto isoelétrico ocorre interações eletrostáticas entre a proteína e a água, resultando no aumento da solubilidade. Já no ponto isoelétrico normalmente a solubilidade em meio aquoso é mínima, visto que ocorrem interações hidrofóbicas que promovem interações proteína-proteína e resultam na redução da solubilidade. A maioria das proteínas encontradas em alimentos exibem uma solubilidade mínima na faixa de pH que vai de 4 a 5, e solubilidade máxima em pH alcalino (ROCHA, 2008).

Apesar da maioria das proteínas apresentarem solubilidade mínima no ponto isoelétrico, algumas proteínas, como a  $\beta$ -Lg e a BSA, são solúveis em seu ponto isoelétrico devido à grande proporção de resíduos hidrofílicos em relação aos resíduos hidrofóbicos em sua superfície. No ponto isoelétrico, as cargas positivas e negativas se anulam. No entanto, em módulo, essas cargas são iguais, e a proteína ainda possui cargas. Se a hidrofilicidade e as forças de repulsão na camada de hidratação, que podem surgir a partir desses resíduos carregados, forem maiores do que as interações proteína-proteína, então a proteína permanecerá solúvel em seu ponto isoelétrico (ROCHA, 2008).

Como dito anteriormente, a  $\alpha$ -La é ligada a um íon  $\text{Ca}^{2+}$  por cada molécula de proteína e o íon cálcio permanece no interior de uma estrutura tridimensional empacotada, ligado a quatro resíduos de Aspartato ( $\text{Asp}^-$ ). Quando ligada ao cálcio, a  $\alpha$ -La é a mais termoestável das proteínas do soro do leite. Em valores de pH menores que 5, os resíduos de Asp se tornam protonados e o íon  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado. Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , a estrutura terciária da  $\alpha$ -La se torna parcialmente desdobrada, e grupos hidrofóbicos do interior da proteína tornam-se acessíveis ao meio externo, e a  $\alpha$ -La torna-se insolúvel (FOX et al., 2015).

As proteínas  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg apresentam, portanto, características físico-químicas diferentes, o que permite sua separação por meio da acidificação promovida pela mistura de  $\text{CO}_2$  supercrítico à proteína em meio aquoso. Essa acidificação pode ser o resultado da remoção do cálcio ligado à proteína  $\alpha$ -La, promovendo sua desestabilização.

## 2.5 Estrutura das proteínas

Os níveis das estruturas em relação ao enovelamento em uma proteína podem ser classificados em primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Quando a estrutura tridimensional da proteína é alterada ocorre o processo de desnaturação, afetando sua atividade biológica.

As ligações covalentes que ligam resíduos de aminoácidos numa cadeia polipeptídica definem sua estrutura primária. A característica mais importante desta estrutura é a sequência de aminoácidos, a qual determina o dobramento tridimensional de uma proteína e conseqüentemente, sua função. A desnaturação não afeta a estrutura primária da proteína (LEHNINGER, 2012).

As estruturas secundárias conferem o aspecto tridimensional às proteínas e as mais importantes são as  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folhas. Quando um padrão regular não é encontrado a estrutura secundária é referida como indefinida ou como *random coil*. Apesar de existirem incontáveis variações nas estruturas tridimensionais das proteínas, cada proteína tem uma função química e estrutural única (LEHNINGER, 2012).

Os aminoácidos que estão distantes na sequência do polipeptídeo e estão em diferentes tipos de estrutura secundária podem interagir dentro da estrutura completamente dobrada de uma proteína. A estrutura terciária inclui o dobramento espacial da cadeia polipeptídica. Algumas proteínas possuem atividade biológica quando contêm ainda duas ou mais cadeias polipeptídicas separadas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. A disposição dessas subunidades proteicas em complexos tridimensionais constitui estrutura quaternária (LEHNINGER, 2012),

As proteínas de soro de leite são estruturas helicoidais globulares contendo resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos e são susceptíveis à desnaturação por calor, mas são estáveis em condições ácidas moderadas (PRITCHARD; KAILASAPATHY, 2011). A desnaturação térmica do sistema heterogêneo de proteínas do soro de leite é um conjunto de interações complexas entre as frações individuais, com as mudanças físico-químicas ocorrendo durante o tratamento por aquecimento (O'LOUGHLIN et al., 2015).

O aquecimento da  $\beta$ -Lg leva a degradação que acontece em dois passos: entre 70 e 75 °C esta proteína sofre desdobração e perda de solubilidade entre 10 a 20%, no entanto, esta insolubilidade aumenta em torno de 60% com a formação de agregados entre as temperaturas 78 e 82,5 °C. Este comportamento se deve a ativação dos grupos devido ao desdobração durante o tratamento térmico, resultando em uma diminuição da estabilidade da proteína que afeta sua solubilidade (SAVA et al., 2005).

Pritchard e Kailasapathy (2011) afirmaram que as proteínas do soro do leite apresentam estabilidade térmica a temperaturas inferiores a 75 °C. No entanto, Lee e Hong (2009) realizaram análise de DSC e as temperaturas de desnaturação resultantes foram 83 °C para  $\alpha$ -La e 91 °C para a  $\beta$ -Lg.

Sem adição de CO<sub>2</sub>, o tratamento a altas pressões tem mostrado alterar as características das estruturas secundárias e terciárias e algumas das propriedades funcionais das proteínas (FOEGEDING; DAVIS, 2011); entretanto, pressões acima de 300 MPa são requeridas para desnaturação irreversível (SPILIMBERGO; ELVASSORE; BERTUCCO, 2002).

Ao misturar o CO<sub>2</sub> supercrítico ao leite ou a soluções de proteínas do leite em altas concentrações e temperatura moderada a alta (40 a 80 °C), as proteínas podem desnaturar, desestabilizar e precipitar, devido a sua acidificação combinada com a atividade anti-solvente. O abaixamento do pH por meio de formação de ácido carbônico, em solução aquosa em scCO<sub>2</sub> pode mudar as interações iônicas e eletrostáticas com as micelas de caseína e com as proteínas do soro do leite e causar mudança na estrutura secundária e/ou terciária de algumas proteínas, desencadeando aglomeração e precipitação (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012). Portanto, mesmo aplicando pressões abaixo de 300 MPa, as alterações podem ocorrer devido a acidificação e propriedades de solvatação (DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

A injeção de CO<sub>2</sub> a temperaturas inferiores (5 – 20 °C) ou pressões até 0,7 MPa não causam precipitação das proteínas, a não ser que fique armazenada durante nove dias. No entanto, a desnaturação aumenta com a temperatura, pressão e concentração de CO<sub>2</sub> adicionado ao leite. Próximo ou acima do ponto crítico do CO<sub>2</sub> (temperatura entre 30 e 40 °C e pressão entre 7 e 10 MPa) e na presença de altas taxas de CO<sub>2</sub>, até 10% (w/w) do CO<sub>2</sub> adsorve nas misturas de caseína e ocorre a precipitação (TOMASULA et al., 1995). Quando a temperatura é aumentada a 60 °C ou mais, com pressões acima do ponto crítico, scCO<sub>2</sub> desencadeia a

precipitação de diferentes proteínas do soro de leite dependendo da temperatura e pressão (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012).

A  $\beta$ -Lg é altamente estruturada e medidas de dicroísmo circular e rotação óptica mostram que na faixa de pH 2 – 6,  $\beta$ -Lg consiste de 10 – 15%  $\alpha$ -hélice, 43% de  $\beta$ -folha e 47% de estrutura não-ordenada.  $\beta$ -Lg tem uma estrutura globular muito compacta em que  $\beta$ -folhas ocorrem em uma estrutura tipo  $\beta$ -barril ou cálice (FOX et al., 2015). É possível verificar a forma de assimetria estrutural em uma molécula por meio de diferença na absorção de luz polarizada. A medição dessa diferença é chamada de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (LEHNINGER, 2012). Por meio desta análise é possível verificar se houve desnaturação das proteínas devido à metodologia utilizada.

### **2.5.1 Dicroísmo Circular**

Qualquer forma de assimetria estrutural em uma molécula dá origem a diferenças na absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. A medição dessa diferença é chamada de espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Uma estrutura ordenada, como uma proteína dobrada, dá origem a um espectro de absorção que pode ter picos ou regiões com valores positivos e negativos. Para proteínas, os espectros são obtidos na região UV distante (190 a 250 nm). A entidade absorvente de luz, ou cromóforo, nesta região é a ligação peptídica; um sinal é obtido quando a ligação peptídica está em um ambiente dobrado. A diferença nos coeficientes de extinção molar para a luz polarizada circularmente à esquerda e à direita é representada em função do comprimento de onda. A  $\alpha$ -hélice e a  $\beta$ -folha têm espectros de CD característicos como é possível ver na Figura 3 (NELSON E COX, 2012).

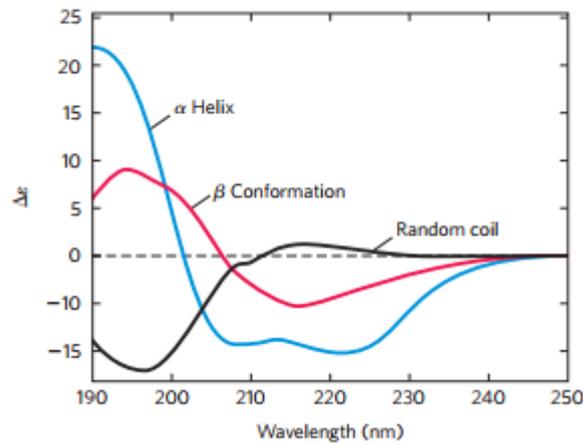


Figura 3. Espectros de dicroísmo circular característicos da proteína

Usando os espectros de CD, é possível determinar se as proteínas estão dobradas e monitorar as transições entre os estados dobrados e desdobrados. O espectro de CD da proteína nativa pode servir como referência para o estado dobrado, permitindo monitorar a desnaturação ou mudanças conformacionais provocadas por mudanças nas condições da solução (JOHNSON, 1990; LEHNINGER, 2012). A diferença da estrutura da proteína altera a função de cada uma, levando a possibilidade de aplicações específicas (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

## 2.6 Precipitação da proteína $\alpha$ -La em meio supercrítico utilizando o reator contínuo

Os processos contínuos em geral apresentam diversas vantagens em relação ao processo em batelada, dentre elas estão obtenção de produto com qualidade mais alta, redução do custo de fabricação, melhoria da utilização de ativos, redução de resíduos, menor necessidade de espaço, mão de obra e recursos (MALHOTRA, 2005; WILES; WATTS, 2014). Apresenta maior área em relação ao volume do reator, o que torna a planta mais segura devido a um acúmulo menor de solventes no reator e melhoria da transferência de calor, promovendo manuseio seguro de reações altamente exotérmicas. Essas características melhoram a rentabilidade do processo (SCHABER et al., 2011).

A indústria farmacêutica ainda é dominada por processos em batelada. No entanto, estes processos possuem inconvenientes como a má compreensão do processo, o rendimento, a escalabilidade e a ineficiência de energia. A vantagem do processo em batelada é a flexibilidade para aplicação em diversas finalidades, mas esta flexibilidade também vem sendo buscada nos processos contínuos (MALHOTRA, 2005; SINGH; IERAPETRITOU; RAMACHANDRAN, 2012).

O investimento em tecnologia de fluxo contínuo apresenta uma oportunidade para aprimorar a indústria farmacêutica e de alimentos e, portanto, foi investigado neste trabalho para o fracionamento das proteínas do soro do leite.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O dióxido de carbono (95% de pureza) foi adquirido da White Martins S.A. (Osasco, SP, Brasil). Foram adquiridos dois lotes de isolado proteico do soro do leite (WPI), de 1 kg cada, produzidos pela Farmácia de Manipulação Medicinal Ltda (Maringá, PR, Brasil) em forma de pó para ser utilizado como matéria-prima. Não foi realizado tratamento prévio ao fracionamento.

A composição da suspensão de 1% de WPI utilizada para o fracionamento no primeiro planejamento experimental foi determinada pelos métodos:

- Umidade: secagem direta em estufa a 105 °C – Método 012 / IV do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008);
- Cinzas: incineração em mufla a 550 °C - Método 018 / IV (IAL, 2008);
- Lipídios: Método 039 / IV modificado (IAL, 2008);
- Proteínas totais: Método de Kjeldahl modificado – Método 037 / IV (IAL, 2008);
- Lactose: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando coluna Supelcogel™ Ca (300 x 7.8 mm), água ultrapura como solvente e um fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> a 80 °C;
- Conteúdos de  $\alpha$ -La e de  $\beta$ -Lg: HPLC, cuja metodologia está descrita a seguir, neste capítulo;
- Teores de GMP: HPLC, cuja metodologia está descrita a seguir, neste capítulo.

Os padrões analíticos das proteínas do soro de leite bovino  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA, pureza > 85 e > 90%, respectivamente). O GMP (pureza > 80%) foi doado pela Davisco Foods International (Eden Prairie, MN, EUA). Foi utilizado ácido trifluoracético (TFA, grau analítico, Merck, Brasil) e acetonitrila (grau HPLC, Merck, Alemanha) para as análises cromatográficas.

Para a realização das quantificações, os sistemas proteicos foram suspensos em tampão fosfato preparado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (PA, Vetec, Brasil) 0,2 M e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (PA, Vetec, Brasil) 0,2 M com pH 7,0, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Soluções de tampão fosfato.

<b>Solução <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,2 M</b>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (fosfato de potássio monobásico)	1,37 g
$\text{H}_2\text{O}$ q.s.p.	50,00 mL
<b>Solução <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math> 0,2 M</b>	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (fosfato de sódio bibásico)	2,69 g
$\text{H}_2\text{O}$ q.s.p.	50,00 mL
<b>Tampão Fosfato de Potássio 10 mM, pH 7,0</b>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,2M	967 $\mu\text{L}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2M	1532 $\mu\text{L}$
Ajustar o pH para 7,0 utilizando NaOH ou NaCl	
$\text{H}_2\text{O}$ q.s.p.	50,00 mL

### 3.1 Reação de fracionamento em batelada

Testes preliminares para avaliar o fracionamento das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram realizados em reator batelada, utilizando suspensões de WPI com concentração de 5%, antes da construção do reator para fracionamento contínuo. O aparato empregado está representado na Figura 3 e foi o mesmo utilizado em experimentos de estudo de comportamento de fases em

pesquisas anteriores no Laboratório de Tecnologia Supercrítica da UEM (ZANETTE et al., 2014).

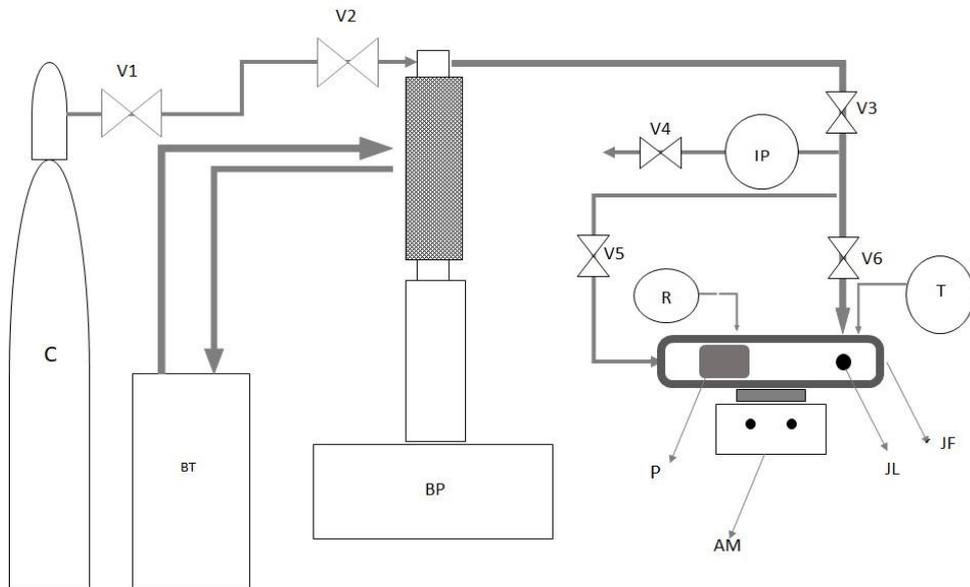


Figura 4. Aparato utilizado na reação em batelada para o fracionamento das proteínas do soro de leite bovino  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg.

O aparato consiste em:

- C: Cilindro de CO<sub>2</sub> para armazenagem do solvente durante os experimentos em temperatura ambiente e pressão em torno de 5 MPa;
- BT: Banho termostático (Tecnal, modelo TE-184);
- BP: Bomba de alta pressão tipo seringa (ISCO, modelo 260D com capacidade máxima de 260 mL e 50 MPa de pressão);
- V1 a V6: válvulas
- IP: Indicador de pressão (Smar HT2) que recebe um sinal digital de um transdutor de pressão ligado a linha proveniente da bomba (Smar LD 301) e que indica a pressão na linha;
- P: Pistão inserido dentro do reator e que possui dois anéis BUNA N90 nas extremidades permitindo o ajuste para o deslizamento dentro da célula;
- AM: Agitador magnético (IKA C-MAG HS 7) que permite a agitação do sistema acionando a barra magnética dentro do reator;
- T: Termopar;

- JF: Janela de safira para observação frontal;
- JL: Janela lateral para entrada de luz;
- R: Reator batelada de aço inox 316, com capacidade máxima de 25 mL.

Foi preparada uma suspensão de WPI com concentração de 5%. O reator foi alimentado com 7,5 mL desta suspensão. Uma barra magnética foi utilizada no interior do reator, permitindo a agitação da mistura durante todo o experimento por meio de agitador magnético colocado abaixo da unidade. Na parte anterior do reator foi colocado um anel de teflon, uma janela de safira, um anel de cobre e então o reator foi fechado. Uma janela de safira na parte lateral permitiu a iluminação do sistema utilizando uma lanterna como fonte de luz. A linha de alimentação de CO<sub>2</sub> e o termopar foram conectados na célula.

O gás CO<sub>2</sub> foi adicionado ao sistema por meio de diferença de volume na bomba seringa até atingir a proporção mássica de 1:1 (CO<sub>2</sub>: suspensão de WPI). O volume do CO<sub>2</sub> foi calculado relacionando a densidade de alimentação e densidade do CO<sub>2</sub> no interior do reator, nas condições de reação, sendo que a temperatura na alimentação (temperatura na bomba seringa) foi controlada por meio do banho termostático a 20 °C. As temperaturas utilizadas nas reações foram 59, 62 e 65 °C. A mistura foi aquecida por meio de resistência.

O reator possui volume variável, ou seja, o pistão se move ao longo da célula para permitir a variação do volume e conseqüentemente da pressão. O pistão é empurrado pelo CO<sub>2</sub> na parte posterior, diminuindo o volume da célula e pressurizando o sistema até a pressão da reação, que foi de 6, 15 e 20 MPa. O sistema permaneceu nas condições de temperatura e pressão durante 50 minutos. A precipitação foi observada através da janela de safira. Na Tabela 3 está disposto o planejamento experimental realizado.

Após a despressurização e resfriamento do sistema, a linha de alimentação foi aberta para retirada do CO<sub>2</sub>.

A formação de espuma dificultou a coleta do material. As frações obtidas no reator em batelada foram coletadas e centrifugadas em tubos tipo Falcon (centrífuga Quimis - Q222TM) a 1465 g durante 40 minutos. A corrente solúvel, ou o sobrenadante, foi a corrente rica em proteína β-Lg. A corrente precipitada foi a corrente rica em proteína α-La.

Tabela 3. Planejamento experimental – ensaios preliminares no reator batelada.

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
6	59
6	62
6	65
15	59
15	62
15	65
20	59
20	62
20	65

Os sistemas centrifugados foram armazenados sob refrigeração até a finalização de todas as reações, que duraram em torno de 4 dias e então foram realizadas as análises qualitativas.

### **3.2 Determinação de proteínas por eletroforese em gel**

As frações solúveis e precipitadas dos sistemas obtidos nas nove condições experimentais utilizadas nas reações em batelada foram analisadas qualitativamente para determinar o conteúdo de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg e assim verificar o fracionamento das proteínas.

A técnica utilizada foi eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com adição de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg padrão Sigma foram utilizadas como referências. O aparato de eletroforese utilizado foi de migração vertical e está apresentado na Figura 4 e encontra-se disponível no laboratório do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama.

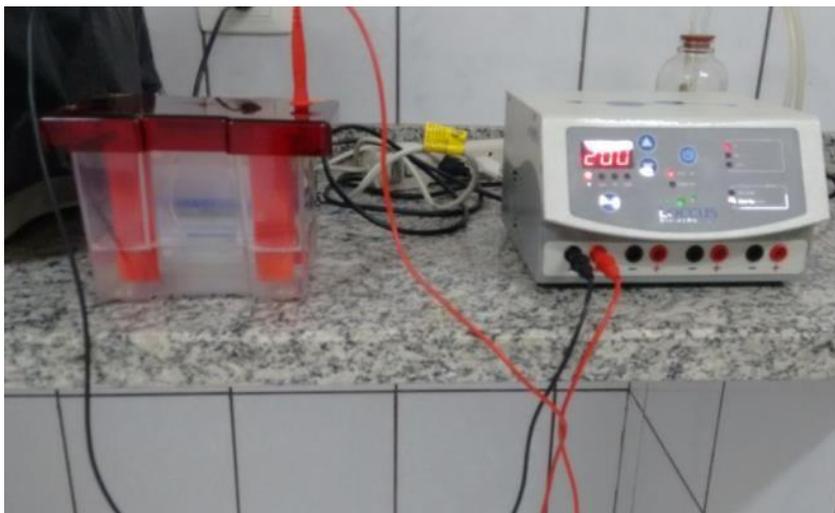


Figura 5. Aparato para análise de eletroforese em gel (SDS-PAGE).

Para a preparação das amostras para análise eletroforética foram adicionados em um microtubo cerca de 5  $\mu$ L das amostras de proteína e 40  $\mu$ L da solução tampão. Após a suspensão, as amostras foram aquecidas em um banho a 65 °C durante 10 minutos. A solução tampão consistiu em uma mistura de 10% de SDS, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% de glicerol, 0,2 M de Tris-HCl (pH = 6,8) e 0,05% de azul de bromofenol.

Um espaçador de 1,5 mm de espessura foi colocado entre o par de placas durante a montagem e presilhas foram aplicadas nas laterais e na parte inferior para vedá-las.

O gel de poliacrilamida foi definido em termos de porcentagem total da acrilamida presente, sendo que menores porcentagens resultam em géis com tamanho de poro maior. O tamanho do poro a ser obtido está relacionado ao tamanho da proteína a ser analisada, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Composição do gel de poliacrilamida.

<b>Gel</b>	<b>Massa molecular das proteínas</b>
7%	50 kDa - 500 kDa
10%	20 kDa - 300 kDa
<b>12%</b>	<b>10 kDa - 200 kDa</b>

A metodologia para preparação dos géis de separação e concentração/empilhamento está disponível no material suplementar. A concentração do gel de separação foi determinada

em 12%, de acordo com a Tabela 4, visto que a massa molecular da proteína  $\alpha$ -La é de 14,2 kDa e da proteína  $\beta$ -Lg é de 18,4 kDa.

O gel de separação foi então adicionado entre as placas de vidro e, em seguida, acrescentou-se solução butamol:água 50% na parte superior para remoção das bolhas na superfície do gel. Após a polimerização, o molde foi inclinado cuidadosamente para remoção da solução de butamol.

A solução de empilhamento foi preparada e, em seguida, foi adicionada lentamente sobre o gel de separação polimerizado. Um molde de plástico em forma de pente foi acomodado na solução de empilhamento, com o objetivo de formar poços que permitiam a aplicação das amostras. Novamente, aguardou-se a polimerização do gel por aproximadamente 30 minutos.

Após a polimerização do gel de empilhamento, retirou-se o pente, adicionou-se solução tampão de corrida para preencher os poços e retirar as bolhas de ar. Qualquer variação no pH pode afetar a carga líquida e, portanto, a mobilidade da partícula. Essa solução foi preparada com a mistura de 25 mM de tris-HCl, 200 mM de glicina e 0,1% de SDS e colocada dentro da cuba de eletroforese.

Com ajuda de uma micropipeta, aplicou-se 10  $\mu$ L de cada amostra. O primeiro poço foi destinado ao padrão de  $\alpha$ -La e o segundo ao padrão de  $\beta$ -Lg, que foram utilizados como marcador de peso molecular. Os demais poços foram utilizados para as amostras, totalizando 11 amostras por gel, sendo duas do padrão e 9 das amostras obtidas.

Uma vez aplicadas todas as amostras, foi ligada a fonte de tensão, utilizando uma corrente elétrica constante de 200 V. Quando o corante atingiu a extremidade do gel, a corrente (fonte de tensão) foi desligada.

O gel foi retirado da cuba e colocado em uma solução de coloração com 0,25 g de azul de cromossie, dissolvido em uma mistura de 45 mL de metanol, 45 mL de água mili-Q e 10 mL de ácido acético glacial. Após a fixação do corante o gel foi imerso em uma solução de descoloração composta por 20% de metanol e 10% de ácido acético. A solução de descoloração remove o corante que não se ligou as proteínas, deixando visíveis as bandas de proteínas coradas em azul em um gel transparente.

Na Figura 5 está disposto uma ilustração de como a separação das proteínas ocorre na análise de eletroforese em gel.

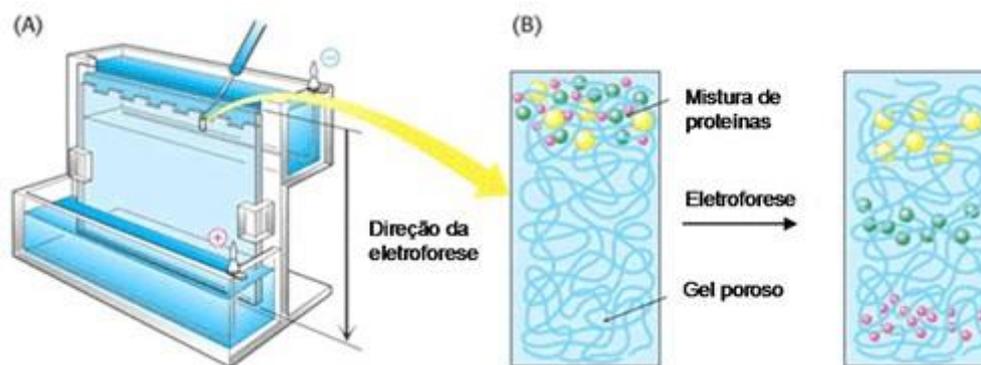


Figura 6. Esquema representativo da técnica de SDS-PAGE.

### 3.3 Determinação do pH da suspensão no ambiente reacional

O pH durante a reação é o principal precursor da desestabilização da proteína  $\alpha$ -La na solução e consequente precipitação e fracionamento. O pH pôde ser estimado mediante a equação 5, desenvolvida em trabalhos anteriores (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012).

$$pH(P, C) = -0,248 \ln(P) + 0,216 \ln(C) + 9,365 \quad (5)$$

Onde, P é a pressão (Pa) no meio reacional e C é a concentração da suspensão ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de WPI no meio aquoso.

A concentração da suspensão de WPI utilizada nas reações de fracionamento foi determinada a partir do cálculo do pH, obedecendo ao limite de pressão do equipamento, equivalente a 25 MPa. O pH da reação deve ser próximo ao ponto isoelétrico da proteína  $\alpha$ -La.

Depois da despressurização do sistema, o pH foi também aferido utilizando medidor de pH de bancada (Hanna-HI-5521).

#### 3.3.1 Determinação da distribuição do tempo de residência

Após a construção do reator em fluxo contínuo, foi realizado o experimento para determinação da distribuição do tempo médio de residência, DTR (LEVENSPIEL, 1999).

Foi utilizada a técnica de estímulo – resposta que consiste na injeção de uma substância química inerte, denominada como traçador, na entrada do reator. Foi aplicado o método degrau, que consiste na injeção do traçador de forma contínua na corrente de alimentação do reator. A saída desta substância foi analisada em termos de absorvância. O traçador utilizado foi solução de violeta genciana com concentração  $0,05 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Foram testadas as vazões  $3, 6$  e  $8 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ , obtidas por meio do uso de bomba isocrática.

Uma curva analítica foi determinada pela relação entre a concentração da solução de violeta genciana e a absorvância, totalizando 10 pontos com concentração variando entre  $0,01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $0,05 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A equação de uma reta foi utilizada para determinar a concentração na saída do reator e o coeficiente de determinação da reta foi igual a  $0,997$ .

O reator foi preenchido com água e, em seguida, iniciou-se a injeção da solução de violeta genciana. O cronômetro foi acionado instantaneamente ao início da injeção e alíquotas do efluente foram coletadas na saída do reator, com periodicidade de 1 minuto, e analisadas em espectrofotômetro, com comprimento de onda fixado em  $512 \text{ nm}$ .

Foi realizado o cálculo da razão entre a concentração na saída ( $C_t$ ) e no início do reator ( $C_0$ ). As amostras foram coletadas até que a concentração do efluente fosse igual à concentração da suspensão inicial, ou seja,  $C_t/C_0 = 1,0$ . A Figura 6 ilustra o esquema utilizado no experimento. A partir da determinação da DTR, as vazões de alimentação de suspensão de WPI e  $\text{CO}_2$  foram estipuladas.

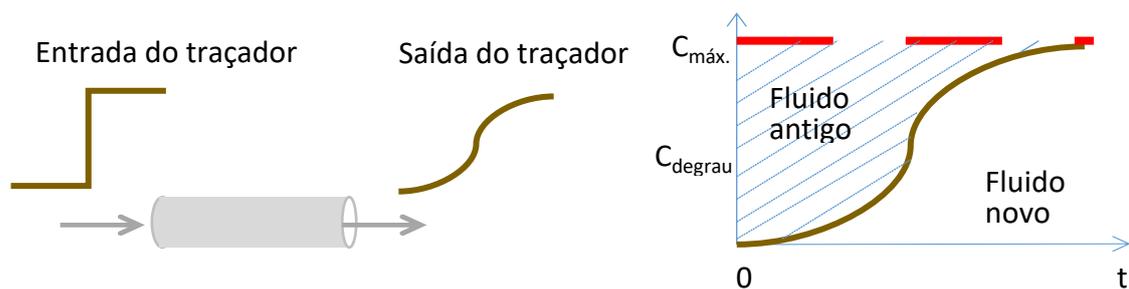


Figura 7. Experimento de determinação da distribuição do tempo de residência utilizando método degrau.

### 3.4 Planejamento Experimental

O planejamento dos experimentos foi realizado de forma a analisar a influência da pressão e da temperatura no fracionamento, em meio supercrítico, das proteínas do WPI  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg. Foi utilizado um *design* fatorial de três níveis com dois fatores, resultando em nove experimentos (3<sup>2</sup>). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. As variáveis analisadas foram temperatura e pressão, sendo elas 55, 60 e 65 °C e 8, 16 e 24 MPa, respectivamente.

Os teores de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram analisados nas correntes solúveis e nas correntes precipitadas. A principal variável resposta analisada mediante o planejamento experimental proposto foi a razão  $\alpha/\beta$ , ou seja, a relação entre a concentração da proteína  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg presente, na corrente precipitada e na corrente solúvel. Esta razão forneceu a informação do quão seletivo foi o fracionamento em termos das proteínas majoritárias do WPI. Portanto, era esperado a maior razão  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg possível na corrente precipitada (enriquecida em proteína  $\alpha$ -La) e a menor razão possível na corrente solúvel (enriquecida com  $\beta$ -Lg).

Foram utilizadas suspensões de WPI de 1 e 5%, sendo que para cada concentração foi realizado um planejamento experim., que está disposto na Tabela 5. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software Statistica<sup>®</sup> 8.0. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 5. Planejamento experimental.

Pressão (MPa)	Temperatura (°C)
8 (-1)	55 (-1)
8 (-1)	60 (0)
8 (-1)	65 (1)
16 (0)	55 (-1)
16 (0)	60 (0)
16 (0)	65 (1)
24 (1)	55 (-1)
24 (1)	60 (0)
24 (1)	65 (1)

O gráfico de Pareto foi utilizado para analisar se as variáveis tiveram efeito significativo no fracionamento.

Para examinar se o modelo estatístico teve um bom ajuste aos dados experimentais, um teste de significância para o modelo de regressão foi desenvolvido e a Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada nos dados de resposta, sendo considerado significativo o p-valor  $< 0.05$ . Os dados experimentais foram ajustados com uma equação polinomial de segunda ordem.

Após isso, foi realizado o teste-F para obter a relação matemática entre a variável dependente e as independentes. Este teste permite avaliar se o modelo apresenta uma regressão significativa ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ) e, portanto, uma falta de ajuste não significativa. Ou seja, nestes termos a equação de regressão descreve a maior parte da variação total das observações em torno da média, enquanto o restante fará parte dos resíduos. Dentro dos resíduos, o erro puro representa o erro aleatório intrínseco ao procedimento experimental e a falta de ajuste está diretamente relacionada com o modelo (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A Soma dos quadrados total (SQT) é decomposta em soma dos quadrados da regressão (SQR), associada a um efeito dos grupos, e em soma dos quadrados dos resíduos (SQr), que é associado ao erro aleatório medido dentro dos grupos. A SQr é a soma dos quadrados da falta de ajuste (SQfa) e do erro puro (SQep). A divisão do SQT pelos seus graus de liberdade (GL) fornecerá uma estimativa da variância entre os grupos. O mesmo deve ser feito com a SQr e seus GL, afim de determinar a variância dentro dos grupos. O F calculado é obtido por meio da divisão da média quadrada da regressão (MQR) pela média quadrada dos resíduos (MQr). Se não houver efeito dos grupos, F calculado será próximo de 1. Caso haja efeito, F calculado será maior que 1 (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Na Tabela 6 está disposto um resumo dos cálculos realizados para a análise de variância.

Tabela 6. Cálculo da Análise de Variância.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>
<b>Regressão</b>	SQR (SQT-SQr)	GLR (GLT - GLr)	MQR = SQR/GLR	MQR/MQr
<b>Resíduo</b>	SQr (SQfa + SQep)	GLr (GLfa + GLep)	MQr = SQr/GLr	
<b>Falta de ajuste</b>	SQfa ( <i>Statística 8.0</i> )	( <i>Statística 8.0</i> )		
<b>Erro puro</b>	SQep ( <i>Statística 8.0</i> )	( <i>Statística 8.0</i> )		
<b>Total</b>	SQT ( <i>Statística 8.0</i> )	GLT = ( <i>Statística 8.0</i> )		
<b>R<sup>2</sup></b>	SQR/SQT			

É esperado que o coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) seja o mais próximo de 1, sendo que só será igual a 1 se não houver nenhum resíduo, portanto, toda a variação em torno da média seria explicada pela regressão

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para ilustrar a influência das variáveis pressão e temperatura no fracionamento seletivo das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg.

### 3.5 Reação de fracionamento das proteínas

#### 3.5.1 Equipamento

A unidade experimental utilizada no fracionamento das proteínas foi desenvolvida no Departamento de Engenharia Química da UEM e está representada na Figura 7.

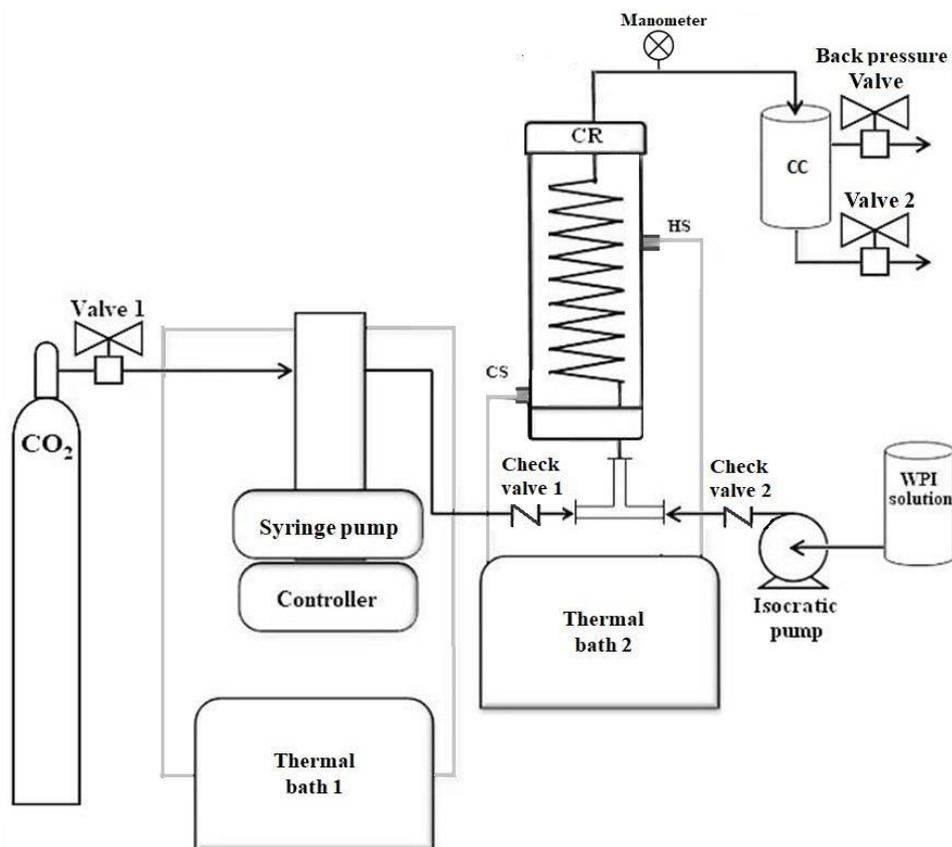


Figura 8. Representação do aparato de fracionamento de proteínas em meio supercrítico. HS: corrente aquecida; CS: corrente resfriada; CR: reator contínuo; CC: Elutriador.

A unidade consiste em:

- Cilindro de CO<sub>2</sub>;
- Válvula 1 para permitir a passagem de CO<sub>2</sub> do cilindro para a bomba;
- Bomba seringa (Isco Syringe pump – 260D);
- Bomba peristáltica (Teledyne Isco Model ReaXus 6010R.).
- Válvula de via única 1 e 2, para evitar o retorno de CO<sub>2</sub> e suspensão de WPI, respectivamente;
- Dois banhos termostáticos (Fisatom Model 860), sendo um para o controle de temperatura da alimentação de CO<sub>2</sub> (*thermal bath 1*) e outro para controle da temperatura no meio reacional (*thermal bath 2*). (Incerteza: 0,05 °C);
- Manômetro;
- Reator encamisado, construído utilizando barras tubulares de aço inox com comprimento total de 12 m, diâmetro interno de 10 mm e volume interno de 97 mL, disposto em forma de serpentina;
- Elutriador (CC) de 90 mL;
- Válvula back pressure - BPR (Swagelok, EUA);
- Válvula para exaustão do elutriador (CC) no final da reação.

O controle da pressão foi realizado por meio de manômetro localizado na linha logo após o reator. A pressurização do sistema foi feita por meio da válvula BPR.

### **3.5.2 Desenvolvimento do fracionamento das proteínas no reator contínuo**

Foi preparada uma suspensão de WPI em água destilada com concentração 1% (10 g·L<sup>-1</sup>) para o primeiro planejamento e com 5% (50 g·L<sup>-1</sup>) para o segundo planejamento. As suspensões foram mantidas sob agitação durante 2 horas antes dos experimentos.

A bomba seringa foi preenchida com CO<sub>2</sub> e a temperatura foi controlada a 20 °C, garantindo a permanência do CO<sub>2</sub> no estado de líquido comprimido dentro da bomba. A suspensão de WPI foi direcionada pelo reator por meio da bomba isocrática. A vazão mássica de suspensão de WPI foi 3 g·min<sup>-1</sup> e de CO<sub>2</sub> foi 3 g·min<sup>-1</sup>, totalizando o fluxo em 6 g·min<sup>-1</sup>. A vazão volumétrica alimentada pela bomba seringa foi corrigida de acordo com a sua densidade

na reação, para que fosse mantida a proporção mássica de suspensão de WPI:CO<sub>2</sub> = 1. Na Tabela 7 está disponível a vazão de alimentação de CO<sub>2</sub> nas condições reacionais operadas. Já a densidade da suspensão de WPI foi considerada igual a 1 g·L<sup>-1</sup>.

Tabela 7. Vazão de alimentação do CO<sub>2</sub> na reação de acordo com a densidade.

<b>Temperatura do banho (°C)</b>	<b>Pressão (MPa)</b>	<b><math>\rho</math> CO<sub>2</sub> (g·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vazão CO<sub>2</sub> (mL·min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vazão WPI (mL·min<sup>-1</sup>)</b>
<b>20</b>	24	0,9587	3,129	3,00
<b>20</b>	16	0,9118	3,290	3,00
<b>20</b>	8	0,8277	3,625	3,00

A mistura do CO<sub>2</sub> e da suspensão de WPI foi feita na entrada do reator. Após percorrer todo o reator, a mistura passava por um recipiente cilíndrico de 97 mL com o objetivo de conter uma parte do precipitado, e seguia para a saída do aparato. A mistura WPI + CO<sub>2</sub> foi pressurizada por meio da BPR nas pressões estabelecidas no planejamento experimental.

Ao passar pela BPR, a amostra retornava à pressão ambiente e era coletada em frascos com intervalos de 15 minutos, sendo coletadas duas amostras. Após o tempo da reação, que durou 30 minutos, o elutriador foi aberto e foi coletada também a corrente que ficava antes da BPR, dentro do elutriador (CC).

As amostras coletadas antes e após a BPR foram centrifugadas, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.1. Após a centrifugação, a amostra foi separada em corrente precipitada e corrente sobrenadante (solúvel). Portanto, cada reação resultou em 6 amostras, sendo 4 após a BPR (2 frações solúveis e 2 precipitadas) e 2 antes da BPR (1 solúvel e 1 precipitada).

### 3.5.3 Liofilização

A suspensão precipitada rica em  $\alpha$ -La foi ressuspensa em água para transferência para um recipiente de plástico. Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas durante 24 horas em um equipamento igual ao ilustrado na Figura 8 (Terroni Enterprise I).



Figura 9. Liofilizador de bancada.

Após a liofilização, as amostras foram pesadas e armazenadas em microtubos sob refrigeração, até o momento da análise. As massas das amostras liofilizadas foram anotadas para posterior cálculo do rendimento da reação.

### 3.6 Análises experimentais

#### 3.6.1 Determinação do teor das proteínas $\alpha$ -lactalbumina e $\beta$ -lactoglobulina

A determinação dos teores de proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg nas correntes obtidas com as reações realizadas com suspensão de WPI 1% foram realizadas no Laboratório de Biocombustíveis na Universidade Federal de Viçosa (MG). Já as reações com WPI com concentração de 5% foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da UEM. No entanto, as metodologias utilizadas foram as mesmas.

A metodologia de Cromatografia Líquida foi realizada em um sistema HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão), com auto injetor (SIL- 20A) equipado com degaseificador (DGU 20A5), integrador (CBM 20A), detector UV/VIS por arranjo de diodos (SPD-M20A) e software LC solution SP1 1,22. Foi utilizada uma coluna C18 Shimadzu (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de 5  $\mu$ m de diâmetro. A fase móvel usada era composta por água + 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) (fase A) e acetonitrila + 0,1% TFA (fase B).

A eluição da fase B foi em gradiente, sendo que a corrida iniciou com 30% de B e foi até 50% de B, entre 0 e 35 minutos, e a seguir retornou à condição inicial de 30% de B, no tempo de 35 e 40 minutos. O fluxo foi  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . O comprimento de onda analisado foi 215 nm. A injeção de  $20 \mu\text{L}$  de volume foi automatizada.

Todas as amostras e padrões foram suspensas em solução tampão fosfato 10mM, com concentração  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , aquecidas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  para garantir completa solubilização durante 15 minutos e posteriormente filtradas em filtro seringa PVDF  $0,22 \mu\text{m}$ .

A curva analítica foi determinada com a injeção dos padrões das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg com razão de concentração  $\beta\text{-Lg}/\alpha\text{-La} = 2$ , por ser a razão usualmente encontrada no soro de leite. A solução-mãe foi preparada com uma mistura das proteínas com concentração de 5,0 e  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La respectivamente. A partir dessa solução, foram realizadas diluições, a fim de obter 10 concentrações diferentes, com valores de  $\beta$ -Lg entre 1,0 e  $5,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $\alpha$ -La entre 0,5 e  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Foi montado um gráfico de dispersão (área do pico x concentração da proteína). A equação da reta foi utilizada para determinação da concentração das amostras resultantes no fracionamento. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das curvas padrões foram superiores a 0,999, tanto para a proteína  $\alpha$ -La, quanto para  $\beta$ -Lg.

Os picos cromatográficos referente às proteínas de interesse das amostras obtidas no fracionamento foram identificados por comparação do tempo de retenção com a amostra padrão.

A análise para quantificação de teores de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram realizadas nas duas frações coletadas após a BPR (15 minutos) e antes da BPR (coleta ao final da despressurização). As amostras obtidas antes da BPR (elutriador) foram analisadas, afim de determinar se houve interferência no fracionamento.

A recuperação individual da proteína  $\alpha$ -La na corrente precipitada ( $rec_\alpha$ ), foi calculada como a razão de massa de proteína  $\alpha$ -La recuperada no precipitado, dividida pela quantidade de proteína  $\alpha$ -La na suspensão inicial de WPI, de acordo com a Equação 13:

$$rec\alpha = (x\alpha_{prec} \times m_{prec.}) / (x\alpha_{WPI} \times m_{WPI}) \quad (13)$$

onde  $m_{prec}$  e  $m_{WPI}$  são a massa total de proteína precipitada e WPI inicial alimentada durante o tempo de coleta (15 minutos), respectivamente; e  $x\alpha_{prec}$  e  $x\alpha_{WPI}$  são as concentrações da proteína  $\alpha$ -La na corrente precipitada e WPI inicial, respectivamente, determinado via HPLC.

A recuperação de  $\beta$ -Lg na corrente precipitada foi calculada utilizando a mesma equação (13), substituindo apenas os resultados referentes a proteína  $\alpha$ -La pelos referentes a proteína  $\beta$ Lg no precipitado. A recuperação de  $\beta$ -Lg na corrente solúvel foi considerada como toda a proteína  $\beta$ -Lg que não precipitou ( $1-rec\beta$  no precipitado).

### 3.6.2 Determinação do teor de glicomacropéptido

As análises utilizadas para determinar os teores das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg não foram eficientes para a separação do pico cromatográfico do GMP. Portanto, foi necessário utilizar outra metodologia cromatográfica para este composto. Todas as análises dos teores de GMP foram realizadas no Departamento de Engenharia Química na UEM.

O GMP foi quantificado no WPI antes e após o fracionamento com  $scCO_2$ . Foi utilizado cromatografia líquida de fase reversa em equipamento (Varian 920-LC RP-HPLC) acoplado com detector UV-VIS. A coluna utilizada foi a Gemini C18 (110 Å, 250 × 4.6 mm, tamanho de partícula 5  $\mu$ m) e coluna de guarda (Security Guard™). O volume de injeção foi de 50  $\mu$ L e temperatura de 30 °C. A absorvância foi 220 nm. As amostras foram dispersas em solução tampão fosfato (Tabela 2) com concentração 5  $mg \cdot mL^{-1}$ .

A fase móvel A foi composta por uma mistura de solventes, contendo acetonitrila:água:TFA (100:900:1, v:v:v). A fase B continha os mesmos componentes, com concentrações diferentes (900:100:0,8). A eluição foi gradiente e está descrito na Tabela 8, utilizando adaptação do método descrito em trabalho anterior (MINKIEWICZ et al., 1996).

Todas as análises foram realizadas em duplicata. A curva analítica de GMP foi determinada com concentração variando de 0,125 a 1,5  $mg \cdot mL^{-1}$ , com 10 concentrações diferentes. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da curva padrão foi 0,99.

Tabela 8. Gradiente empregado na determinação analítica do GMP.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase móvel B (%)</b>
<b>0 - 13</b>	15 - 28
<b>13 - 22</b>	28 - 32
<b>22 - 25</b>	32 - 70
<b>25 - 30</b>	70 - 70
<b>30 - 32</b>	70 - 15
<b>32 -40</b>	15 - 15

### 3.6.3 Análise de dicroísmo circular

A análise para estimativa da estrutura secundária das proteínas foi realizada por meio de dicroísmo circular (CD) em um espectropolarímetro (JASCO J-815, Japão) com controle de temperatura via sistema peltier (PTC-4235/15) e caminho óptico 0,5 mm (Figura 9). O equipamento encontra-se disponível na Central de Produtos Naturais – Comcap – UEM.



Figura 10. Equipamentos utilizados para análise de dicroísmo circular.

As amostras submetidas a esta análise foram os padrões  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg e as frações enriquecidas por meio de fracionamento em meio supercrítico utilizando as condições experimentais 65 °C e 24 MPa e concentração de WPI de 1%.

Nesta análise, foram determinados o conteúdo de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha e comportamento de desnaturação térmica nas temperaturas entre 25 e 94 °C ( $\Delta t = 3$  °C) na região far-UV (190 a 260 nm). A concentração da amostra foi 0,2 mg·mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato 10mM. A determinação dos parâmetros estruturais pesquisados foi realizada acompanhando o perfil da banda em 222 nm para a corrente rica em  $\alpha$ -La e para a  $\alpha$ -La Sigma e em 205 nm para a corrente rica em  $\beta$ -Lg e para a  $\beta$ -Lg Sigma.

A percentagem dos elementos da estrutura secundária foi estimada por deconvolução do espectro de CD obtido em condições não desnaturantes (pH 7,0, 25 °C) por meio do programa CDNN (Circular Dichroism analysis using Neural Networks). Nesta análise, o espectro experimental foi comparado com um banco de dados contendo 23 espectros de CD obtidos a partir de proteínas com estruturas tridimensionais conhecidas.

Para fins de comparação, a percentagem de elementos da estrutura secundária obtidos a partir de uma estrutura cristalográfica foi calculada dividindo o número de resíduos que compõem uma determinada conformação ( $\alpha$ -hélices ou  $\beta$ folhas) pelo número total de resíduos de proteína.

### **3.7 Análise e simulação econômica**

Um projeto para determinação da análise econômica do processo foi proposto, conforme Figura 10. As correntes de produção estão demonstradas em numeração de 1 a 9 no fluxograma simplificado. No fluxograma, estão incluídos os seguintes equipamentos básicos: um reator tubular contínuo; um tanque para receber e quebrar a espuma que se forma durante a despressurização à pressão atmosférica; um loop de reciclagem para trazer o CO<sub>2</sub> que escapa da mistura de volta para o reator; uma centrífuga de alta velocidade para separar as partículas precipitadas de  $\alpha$ -La da suspensão rica em  $\beta$ -Lg e equipamentos de secagem das proteínas.

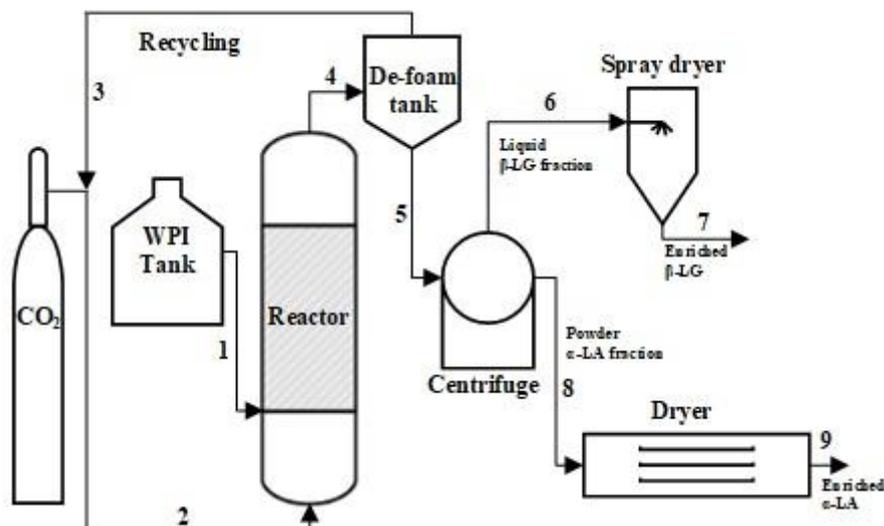


Figura 11. Fluxograma simplificado para o processo contínuo de fracionamento de proteína a partir do WPI utilizando scCO<sub>2</sub>.

Foram necessárias algumas considerações em relação ao processo para realização do estudo de análise econômica. As considerações foram feitas de forma a permitir a comparação com metodologia similar já existente em batelada. Foi considerado o custo de WPI igual a \$ 10,70/kg (Yver et al.).

A modelagem foi realizada considerando uma linha de processamento de tamanho médio, com produção total de 9,7 kg/h (i.e., as correntes ricas em  $\alpha$ -La e ricas em  $\beta$ -Lg) para as frações secas, correspondendo a uma suspensão de alimentação (suspensão WPI) composta por 9,7 kg/h de WPI com 960,3 kg/h de água para a concentração de WPI = 1% e 48,5 kg/h de WPI com 921,5 kg/h de água, quando a concentração de WPI = 5%.

Nas correntes 3, 4 e 5, apresentadas na Figura 11, as vazões foram estimadas utilizando dados experimentais para a solubilidade do CO<sub>2</sub> em suspensão WPI, e assumindo a vaporização completa, remoção e reciclagem do CO<sub>2</sub> dissolvido (YVER et al., 2011). Foi considerado que não há perdas de produto por meio de arraste do CO<sub>2</sub> reciclado ou na secagem das amostras.

Para o cálculo das vazões nas correntes 6 e 8, foram realizados os balanços de massa utilizando as recuperações de proteínas individuais experimentais, obtidas por análises de HPLC.

Durante a depressurização nas reações até a pressão atmosférica, o CO<sub>2</sub> dissolvido e as proteínas formam uma espuma que colapsa no tanque do elutriador. Nesta etapa, uma

quantidade insignificante de CO<sub>2</sub> permanece solubilizada após o colapso da espuma. Essa porção foi negligenciada nos cálculos de balanço de massa e foi assumida a recuperação total de CO<sub>2</sub>. Uma vez que o processo tenha atingido o estado estacionário, o CO<sub>2</sub> circula no circuito de reciclagem (corrente 3).

O tamanho do reator, custo, principais características e consumo de utilidades de cada equipamento foram determinados de acordo com as condições operacionais de vazão mássica, volume do produto e da alimentação, temperatura e pressão no reator e concentração de WPI.

Para fins de comparação da avaliação econômica o volume do tanque de remoção da espuma (*de-foam tank*) também foi considerado o mesmo de Yver et al. (2011), sendo no mínimo de 400 L, com tempo de permanência de 34 minutos. A velocidade a ser utilizada na centrífuga foi considerada 10000 g.

A abordagem de avaliação econômica é baseada no processo contínuo e foi projetada na simulação de processo em estado estacionário utilizando o Analisador Econômico de Processo da Aspen (APEA), que é um software de estimativa de custos que fornece despesas de capital (CAPEX) e despesas operacionais (OPEX) para comparar e selecionar múltiplos esquemas de processo. O processo projetado é avaliado para uma planta de 20 anos de duração, operando 8600 h/ano com uma taxa de juros anual de 12,65% (TURTON et al., 2012)

Para determinação das quantidades de proteínas produzidas nas correntes de produtos, foi realizado o balanço de massa por meio do seguinte equacionamento:

$$F_{WPI} = F_{\alpha} + F_{\beta} \quad (6)$$

$$x_{\alpha}^{WPI} F_{WPI} = x_{\alpha}^{\alpha} F_{\alpha} + x_{\alpha}^{\beta} F_{\beta} \quad (7)$$

$$x_{\beta}^{WPI} F_{WPI} = x_{\beta}^{\alpha} F_{\alpha} + x_{\beta}^{\beta} F_{\beta} \quad (8)$$

Onde  $F_{WPI}$  é a vazão de alimentação de WPI;  $F_{\alpha}$  é a corrente rica em  $\alpha$ -La produzida e  $F_{\beta}$  é a corrente rica em  $\beta$ -Lg produzida.  $x_{\alpha}^{WPI}$  representa a fração mássica de proteína  $\alpha$ -La no WPI inicial;  $x_{\alpha}^{\alpha}$  é a fração mássica de proteína  $\alpha$ -La na corrente rica em  $\alpha$ -La;  $x_{\alpha}^{\beta}$  é a fração mássica de  $\alpha$ -La na corrente rica em  $\beta$ -Lg.  $x_{\beta}^{WPI}$  representa a fração mássica de proteína  $\beta$ -Lg no WPI inicial;  $x_{\beta}^{\alpha}$  é a fração mássica de proteína  $\beta$ -Lg na corrente rica em  $\alpha$ -La;  $x_{\beta}^{\beta}$  é a fração mássica de  $\beta$ -Lg na corrente rica em  $\beta$ -Lg.

Substituindo as equações anteriores, é possível alcançar a equação 9 para a

determinação da corrente rica em proteína  $\alpha$ -La.

$$F_{\alpha} = \frac{(x_{\alpha}^{WPI} F_{WPI} - x_{\alpha}^{\beta} F_{WPI})}{(x_{\alpha}^{\alpha} - x_{\alpha}^{\beta})} \quad (9)$$

$$F_{\beta} = F_{WPI} - F_{\alpha} \quad (10)$$

Em seguida, a partir das quantidades de proteínas produzidas foi possível estimar os custos para produção das vazões ricas em  $\alpha$ -La e ricas em  $\beta$ -Lg.

Não é possível dissociar os custos da produção da corrente rica em  $\alpha$ -La ou  $\beta$ -Lg. Portanto, as equações 11 e 12 foram utilizadas para determinar o custo de produção da corrente rica em  $\alpha$ -La, juntamente com uma determinada quantidade da corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg, que varia de acordo com a condição de operação. Esta quantidade da corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg foi determinada a partir da equação global (Equação 6). O mesmo cálculo foi realizado considerando 1 kg da corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg juntamente com determinada quantidade de corrente rica em proteína  $\alpha$ -La.

$$C_{\alpha}^{prod} = \frac{C_{\$/h}^{processo}}{F_{\alpha, Kg/h}} \quad (11)$$

$$C_{\beta}^{prod} = \frac{C_{\$/h}^{processo}}{F_{\beta, Kg/h}} \quad (12)$$

Onde  $C_{\alpha}^{prod}$  representa o custo de produção da corrente rica em proteína  $\alpha$ -La,  $C_{\$/h}^{processo}$  é o custo por hora de processamento e  $F_{\alpha, Kg/h}$  é a vazão mássica rica em proteína  $\alpha$ -La por hora. O mesmo se aplica para as variáveis da equação do custo de produção da corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados Preliminares

A seguir estão descritos os resultados de alguns dos testes e cálculos realizados antes do início dos experimentos de fracionamento no reator de fluxo contínuo. Estes testes foram essenciais para conhecimento de como proceder no desenvolvimento desta metodologia.

#### 4.1.1 Determinação da composição do WPI antes do fracionamento

A determinação da composição do WPI inicial utilizado no fracionamento de 1% foi realizada conforme as metodologias relacionadas no capítulo de Materiais e Métodos, afim de estimar os constituintes presentes e, principalmente, qual o teor de  $\alpha$ La,  $\beta$ -Lg e GMP, que são as proteínas chaves para o presente trabalho. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Composição do WPI antes do fracionamento das proteínas.

Elementos	Composição (%)
Umidade	5,9±0,09
Proteínas	89,6±0,08
<b><math>\alpha</math>-Lactalbumina</b>	16,0±0,02
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	43,0±0,05
<b>Glicomacropéptido</b>	17,8±0,03
Cinzas / minerais	3,7±0,06
Lactose	0,9±0,00
Gordura	-

O WPI sem tratamento era livre de gorduras. O teor de proteína foi de 89,6%, os quais 16%, 43% e 17,8% correspondem a  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg e GMP, respectivamente. Os outros componentes (12,8%) são provavelmente as *minor proteins*, imunoglobulinas, albumina do soro bovino, lactoferrina e fragmentos da caseína (YVER et al., 2011).

#### 4.1.2 Reação em batelada

A presença da janela de safira no reator em batelada possibilitou a visualização da precipitação de parte das proteínas antes mesmo do fim do experimento. A Figura 12 é a imagem do experimento conduzido à 15 MPa e 59 °C com 5% de WPI.



Figura 12. Precipitação de parte do material da suspensão aquosa de WPI em reator batelada.

No entanto, era necessário maior conhecimento a respeito dessa precipitação. As amostras obtidas nos experimentos preliminares em reator batelada foram submetidas a análise de eletroforese em gel. Esta análise foi realizada qualitativamente, a fim de determinar se a precipitação foi seletiva, qual tipo de proteína havia precipitado e se as variáveis utilizadas haviam influenciado nos resultados. Os géis resultantes das análises estão dispostos nas Figuras 12 e 13, referentes as frações em suspensão e precipitadas, respectivamente.

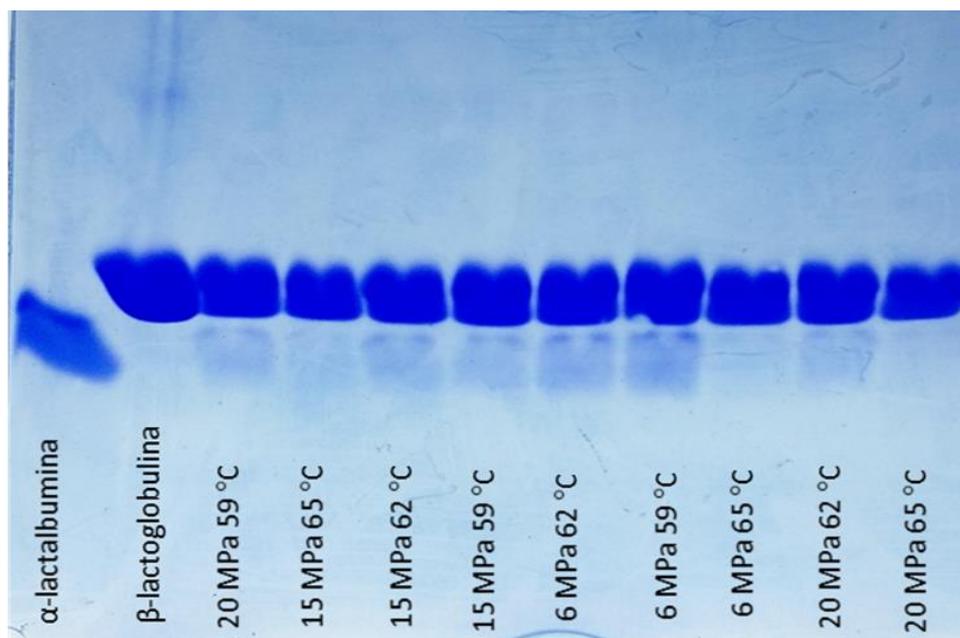


Figura 13. Gel resultante da análise eletroforética - corrente solúvel das proteínas do WPI.

Os poços 1 e 2 são referentes aos padrões  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg respectivamente, para fins de comparação. Os demais poços são referentes as amostras resultantes da reação em batelada, na corrente solúvel. Nota-se que a proteína em evidência nessas frações é a  $\beta$ -Lg, devido a coloração mais escura atribuída a melhor fixação do corante. A impressão do corante no local correspondente a proteína  $\alpha$ -La possui coloração mais fraca. Este gel indica que possivelmente a maior parte da proteína  $\alpha$ -La não permaneceu em suspensão após a reação, principalmente ao utilizar a pressão 20 MPa e 65 °C, onde quase não é possível observar a presença de  $\alpha$ -La.

Na Figura 14 está apresentado o gel obtido na análise das frações precipitadas. A coloração está mais clara visto que a quantidade de amostra aplicada em cada poço foi menor (5  $\mu$ L), afim de permitir melhor visualização das amostras.

A proteína  $\alpha$ -La neste caso apresentou coloração mais intensa do que a proteína  $\beta$ -Lg. É importante lembrar que a concentração inicial de  $\beta$ -Lg é mais do que o dobro da concentração de  $\alpha$ -La, e portanto, a coloração não ter tanta discrepância entre as duas proteínas indica que a maior parte da proteína  $\beta$ -Lg do WPI inicial permaneceu solúvel, enquanto a proteína  $\alpha$ -La precipitou.

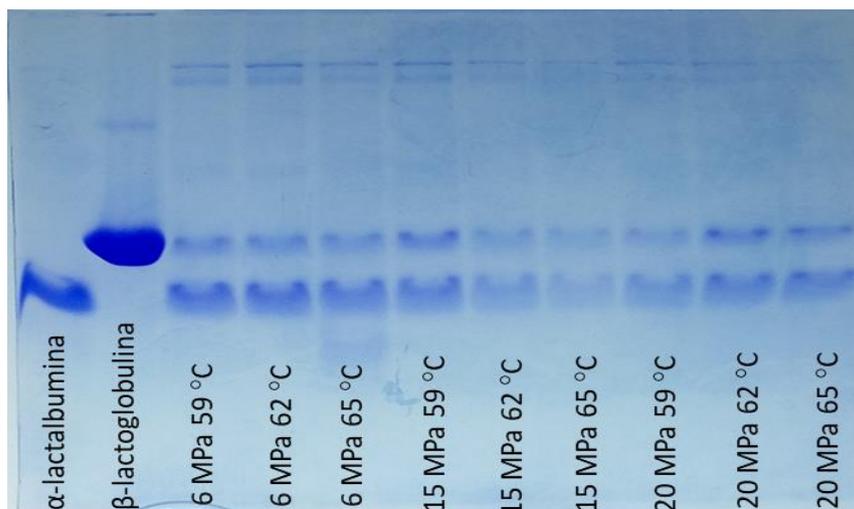


Figura 14. Gel resultante da análise eletroforética - corrente precipitada das proteínas do WPI.

Enquanto é possível observar também que há outros traços nas camadas superiores, que não é referente as proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg. Estes traços provavelmente correspondem à outras proteínas em menor concentração no WPI.

A conclusão obtida a partir da análise em eletroforese em gel é de que houve fracionamento das proteínas. A metodologia em modo contínuo pode, portanto, ser uma técnica viável. A partir desta conclusão, iniciou-se a construção do equipamento de fracionamento de proteínas utilizando  $\text{CO}_2$  supercrítico em meio aquoso em modo contínuo.

#### 4.1.3 Determinação da distribuição do tempo de residência

Na determinação da DTR, foram coletadas amostras da suspensão efluente do reator com periodicidade de 1 minuto. A função  $F(t)$ , também conhecida como curva F de Danckwerts, obtida ao utilizar a vazão de  $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  na determinação da DTR está ilustrada na Figura 14 a. Na Figura 14 b estão dispostos os dados experimentais e a deconvolução da curva  $E(t)$ .

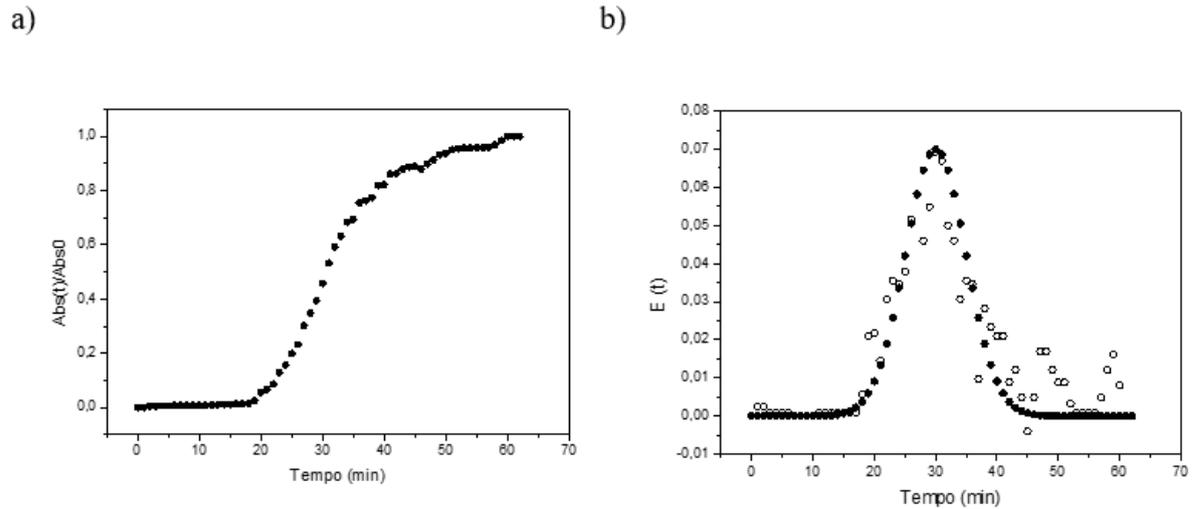


Figura 15. Determinação da distribuição do tempo de residência - a) Curva F. b) Curva E. ○: E(t); ●: Distribuição Gauss.

Foram utilizadas três vazões de alimentação. O cálculo do tempo médio de residência referente a cada vazão foi realizado a partir da integral de  $t.E(t)$  e está disposto na Tabela 10.

Tabela 10. Tempo de residência referente as vazões testadas.

Vazão de alimentação	Tempo de residência
$3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	65,4 min
$6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	34,2 min
$8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	32,3 min

A partir do cálculo da DTR foi determinado que o tempo de residência utilizado nos experimentos seria o de 34,3 minutos, ou seja, vazão de  $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Nesta vazão, a curva E(t) obtida foi a mais próxima de um reator ideal, ou seja, curva gaussiana com menor base no gráfico.

#### 4.1.4 Determinação da concentração baseada nos cálculos do pH

A Equação 5 foi utilizada para determinação do pH da suspensão em relação à concentração do WPI e à pressão. Os resultados estão ilustrados na Figura 15.

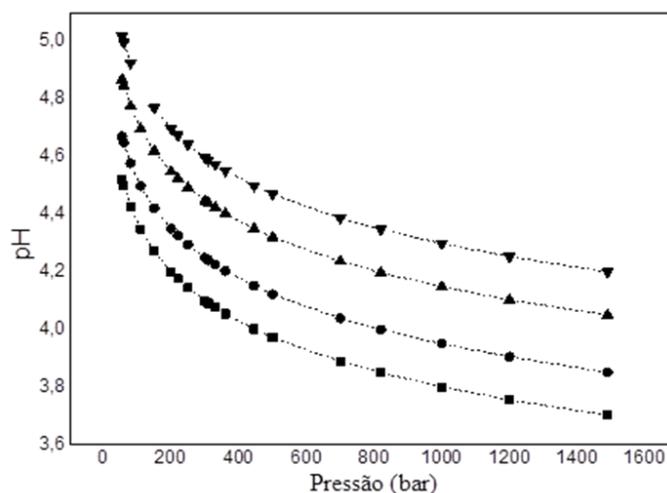


Figura 16. Influência da concentração do WPI e da pressão no pH da suspensão. ■: 1% WPI; ●: 2% WPI; ▲: 5% WPI; ▼: 10% WPI.

Como mencionado anteriormente, a desestabilização da proteína ocorre no ponto isoelétrico. Visto que o PI da proteína  $\alpha$ -La está entre 4,2 e 4,5, com o auxílio da equação proposta por Bonnaillie e Tomasula (2012) - Equação 5 - foi possível estimar as pressões necessárias para atingir esse pH.

De acordo com a Figura 15, quanto maior a concentração da suspensão de WPI, maior a pressão necessária para atingir menores valores de pH. Ao considerar a concentração da suspensão de WPI igual a 10%, a pressão necessária para atingir pH 4,2 chega a 149 MPa, conforme Tabela 11.

Tabela 11. Pressões necessárias para atingir o ponto isoelétrico da proteína  $\alpha$ -La nas concentrações pré-determinadas.

Concentração WPI	Pressão para atingir pH 4,5	Pressão para atingir pH 4,2
1 %	6 MPa	20 MPa
2 %	11 MPa	36 MPa
5 %	25 MPa	82 MPa
10 %	44,5 MPa	149 MPa

O limite de pressão do equipamento é equivalente a 25 MPa. A partir desta limitação foi determinada a concentração da suspensão de WPI a ser utilizada nos experimentos de fracionamento, possibilitando atingir valores de pH próximos a 4,2 e 4,5. As concentrações das suspensões de WPI utilizadas foram de 1% e 5%, e pressões entre 8 e 25 MPa.

No fim da reação o pH da solução foi aferido e foi constatado que atinge condições de neutralidade (pH próximo a 6,5) devido a retirada do  $\text{scCO}_2$  do meio.

## **4.2 Quantificação de $\alpha$ -Lactalbumina e $\beta$ -Lactoglobulina por cromatografia líquida**

As análises das amostras obtidas antes da BPR (elutriador) e após a BPR não apresentaram diferenças significativas, portanto serão abordados os resultados obtidos apenas após a BPR. O objetivo foi obter parâmetros que permitam a obtenção de proteína mais pura, portanto, a razão entre as principais proteínas (razão  $\alpha/\beta$ ) foi calculada a fim de determinar a seletividade do processamento. Foram realizados dois planejamentos, um para as amostras realizadas com suspensão de 1% de WPI e outro para 5% de WPI. Os resultados estão dispostos nos subitens 4.2.1 e 4.2.2 a seguir.

### **4.2.1 Composição das frações obtidas por meio da suspensão 1% WPI**

Na Tabela 12 estão dispostos os teores de  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg e GMP nas amostras obtidas a partir das reações de fracionamento.

Tabela 12. Composição das frações após a reação – 1% WPI.

	Corrente rica em $\alpha$ -La (precipitada)							Corrente rica em $\beta$ -Lg (suspensão)							
	P/MPa	T/°C	pH <sup>1</sup>	R prec/%	$\alpha$ -La/%	$\beta$ -Lg/%	Rec $\alpha$ /%	Rec $\beta$ /%	GMP/%	$\alpha/\beta$	$\alpha$ -La/%	$\beta$ -Lg/%	1-Rec $\beta$ /%	GMP/%	$\alpha/\beta$
<b>WPI<sup>2</sup></b>					<b>16</b>	<b>43</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>18</b>	<b>0,37</b>	<b>16</b>	<b>43</b>	<b>100</b>	<b>18</b>	<b>0,37</b>
<b>1</b>	8 (-1)	55 (-1)	4,47	20,9±0,00	40,5±0,8	9,9±0,2	52,9	4,9	0,1±0,0	<b>3,84</b>	7,5±1,0	61,2±1,1	95,1	17,6±0,2	<b>0,12</b>
<b>2</b>	8 (-1)	60 (0)	4,47	20,7±0,01	39,4±0,8	12,3±0,1	51,2	5,8	0,5±0,5	<b>3,06</b>	6,3±0,4	61,5±0,6	94,2	18,5±1,4	<b>0,10</b>
<b>3</b>	8 (-1)	65 (1)	4,47	16,1±0,01	33,5±1,0	13,4±0,4	33,8	5,1	2,7±0,7	<b>2,59</b>	8,0±0,5	59,7±1,4	94,9	17,6±0,5	<b>0,13</b>
<b>4</b>	16 (0)	55 (-1)	4,29	14,9±0,03	42,2±0,7	9,4±0,3	39,6	3,3	1,1±0,2	<b>4,01</b>	9,6±0,4	58,1±4,1	96,7	11,2±0,5	<b>0,18</b>
<b>5</b>	16 (0)	60 (0)	4,29	23,9±0,01	37,7±0,6	12,3±0,2	59,1	6,7	2,2±0,5	<b>2,82</b>	6,6±0,7	51,3±1,1	93,3	18,1±0,6	<b>0,12</b>
<b>6</b>	16 (0)	65 (1)	4,29	18,7±0,00	34,3±0,6	17,3±0,0	40,4	7,4	1,6±0,4	<b>1,90</b>	6,8±0,3	60,3±1,0	92,6	17,6±0,5	<b>0,13</b>
<b>7</b>	24 (1)	55 (-1)	4,19	6,6±0,00	34,5±0,2	17,4±4,3	14,5	7,2	2,5±0,1	<b>2,70</b>	6,8±0,6	58,0±0,2	92,8	14,8±1,7	<b>0,13</b>
<b>8</b>	24 (1)	60 (0)	4,19	18,8±0,00	37,9±0,8	11,5±0,8	44,7	13,5	0,8±0,0	<b>2,69</b>	6,9±0,5	56,6±1,4	86,5	16,6±0,3	<b>0,13</b>
<b>9</b>	24 (1)	65 (1)	4,19	7,0±0,00	29,2±2,4	15,8±2,8	13,0	7,0	<0,1	<b>1,79</b>	8,4±0,4	57,3±0,1	93,0	15,7±0,8	<b>0,19</b>

P, T = pressão e temperatura da reação, respectivamente; R prec = rendimento precipitado (corrente rica em  $\alpha$ -La); Rec- $\alpha$  e Rec- $\beta$  = recuperação 3 das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg na corrente rica em proteína  $\alpha$ -La;  $\alpha/\beta$  = razão entre a proteína  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg na corrente; 1-Rec- $\beta$  = recuperação da 4 proteína  $\beta$ -Lg na corrente rica em  $\beta$ -Lg.

<sup>1</sup> O pH foi calculado de acordo com a Equação (5).

<sup>2</sup> Esta linha se refere a composição inicial da suspensão de 1% de WPI.

A razão  $\alpha/\beta$  inicial foi de 0,37 e aumentou na corrente rica em proteína  $\alpha$ -La (precipitada) e diminuiu na corrente rica em  $\beta$ -Lg (solúvel). Estes resultados indicam que todas as variáveis utilizadas nos experimentos propiciaram fracionamento das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg. A seletividade da corrente rica em  $\alpha$ -La aumentou entre 4,7 e 9,7 vezes em relação a razão  $\alpha/\beta$  inicial. Já a corrente rica em  $\beta$ -Lg aumentou a seletividade entre 1,6 e 3,4 vezes.

As condições de reação que obtiveram maior seletividade no fracionamento da proteína  $\alpha$ -La foram 16 MPa / 55 °C ( $\alpha/\beta = 4,01$ ) e 8 MPa / 55 °C ( $\alpha/\beta = 3,84$ ). Já no fracionamento da proteína  $\beta$ -Lg, as condições que apresentaram mais seletividade no fracionamento foram 8 MPa / 60 °C ( $\alpha/\beta = 0,10$ ), 16 MPa / 60 °C e 8 MPa / 55 °C ( $\alpha/\beta = 0,12$ ).

A razão  $\alpha/\beta$  na corrente rica  $\alpha$ -La neste fracionamento variou entre 1,79 e 4,01. No fracionamento desenvolvido por Bonnaillie et al. (2012) está razão variou entre 0,73 e 2,84; para Yver et al. (2011) a mesma encontrou-se na faixa entre 0,79 e 2,54. Portanto, este fracionamento obteve corrente rica em  $\alpha$ -La mais pura. A razão  $\alpha/\beta$  na corrente rica em  $\beta$ -Lg obtida variou entre 0,10 e 0,19. Bonnaillie et al. (2012) relataram valores entre 0,067 e 0,280 para a fração solúvel ( $\beta$ -Lg). Os principais diferenciais entre a metodologia utilizada no presente estudo foi a menor concentração de WPI (1%), enquanto os demais trabalhos utilizaram entre 2 e 10%, e tipo de reação em fluxo contínuo, enquanto os demais utilizaram reator batelada.

Em todas as variáveis analisadas, a maior parte do GMP permaneceu em suspensão após a reação, ou seja, na corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg. Este fenômeno é atribuído ao fato de que o ponto isoelétrico do GMP é inferior a 3,8. O menor pH atingido nas reações foi de 4,1 (cálculo teórico), portanto, não houve a desestabilização do glicomacropéptido. Portanto, a obtenção da proteína  $\alpha$ -La foi livre de GMP e outras técnicas podem ser aplicadas para fracionamento do GMP a partir da suspensão.

O rendimento precipitado variou entre 6,6 e 23,9%. O maior rendimento foi obtido na condição de fracionamento utilizando 16 MPa e 60 °C. A utilização de menores pressão e temperatura (8 MPa / 55 °C) resultou no segundo maior rendimento precipitado (20,9%). Os resultados são semelhantes aos experimentos com suspensão 2% de WPI disponíveis na literatura (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012).

A recuperação de  $\alpha$ -La na corrente precipitada variou de 29,9 a 42,2%. Apesar de representar menor eficiência que outros trabalhos (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012; YVER et al., 2011), deve-se observar que o tempo de residência neste trabalho foi de apenas 34,2 min, enquanto reações de até 270 min foram realizadas nos trabalhos acima relacionados.

A recuperação de  $\beta$ -Lg no presente estudo foi entre 86,5 e 96,7%. Os resultados indicam que a proteína  $\beta$ -Lg permaneceu solúvel em todos os experimentos, o que justifica sua baixa concentração na corrente precipitada (rica em  $\alpha$ -La).

A partir dos resultados obtidos foi possível realizar a análise estatística dos experimentos. Primeiramente, os gráficos de Pareto da razão  $\alpha/\beta$  foram plotados tanto para a corrente precipitada quanto para a corrente em suspensão. As barras que cruzam a linha de referência ( $p = 0,05$ ) são estatisticamente significativas. A partir do sinal que acompanha o coeficiente em cada barra é possível verificar se o efeito foi positivo ou negativo. Na Figura 16 está apresentado no gráfico plotado com os resultados obtidos na corrente precipitada.

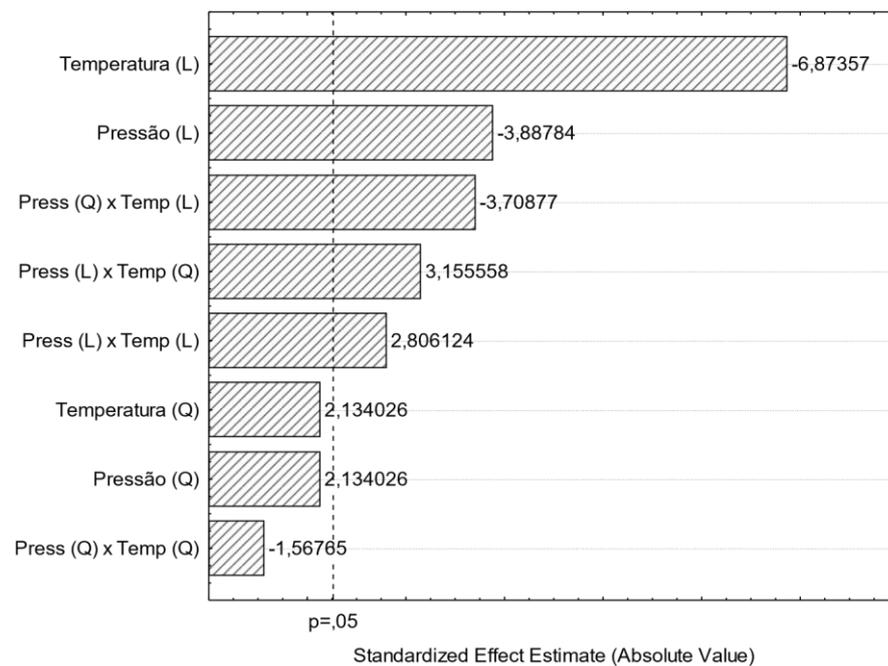


Figura 17. Gráfico de Pareto - corrente rica em proteína  $\alpha$ -La – suspensão 1%.

A variável que apresentou maior efeito significativo foi a temperatura. Este efeito foi negativo, ou seja, menores temperaturas são favoráveis para o fracionamento da proteína  $\alpha$ -La

de forma seletiva, provavelmente devido a influência desta variável no pH da reação, visto que o aumento da temperatura é desfavorável à absorção de CO<sub>2</sub> na água (Equação 1).

Por outro lado, considerando que a absorção de CO<sub>2</sub> na água é favorável para altas pressões, o efeito de aumentar a temperatura em elevadas pressões favorece a formação de íons H<sup>+</sup>, de acordo com a decomposição endotérmica de espécies de bicarbonato (Equação 3) (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). Assim, a interação entre pressão e temperatura é positiva pois resulta na diminuição do pH da suspensão e o ponto isoelétrico da proteína pode ser alcançado. No entanto, o aumento excessivo de temperatura e pressão também pode resultar em pH inferior ao ponto isoelétrico da proteína  $\alpha$ -La. Este efeito foi observado para o binômio 24 MPa / 65 °C (experimento 9, Tabela 12), onde a razão  $\alpha/\beta$  diminuiu.

Em temperatura constante, o aumento da pressão tem um efeito negativo. Isto pode ser explicado pela Equação 5 e visualizado na Figura 16. Ao considerar a suspensão de 1% de WPI, pressões muito altas atingem valores de pH abaixo do ponto isoelétrico. Nos experimentos com 1% de WPI, o pH que permitiu maior precipitação de  $\alpha$ -La foi entre 4,29 e 4,47 (experimento 1 a 6, Tabela 12).

A interação entre os termos linear e quadrático foi significativa e, portanto, atribuiu a curvatura à superfície de resposta. É possível concluir que mudanças nessas variáveis estão associadas à variável resposta, mas a associação não é linear. Já a interação entre os termos quadráticos de pressão e temperatura não teve efeito significativo (p-valor > 0,05).

Na Figura 17 está disposto o gráfico de Pareto para avaliação dos efeitos das variáveis utilizadas na obtenção de  $\beta$ -Lg de forma seletiva. As variáveis são apresentadas em termos quadráticos (Q) e lineares (L).

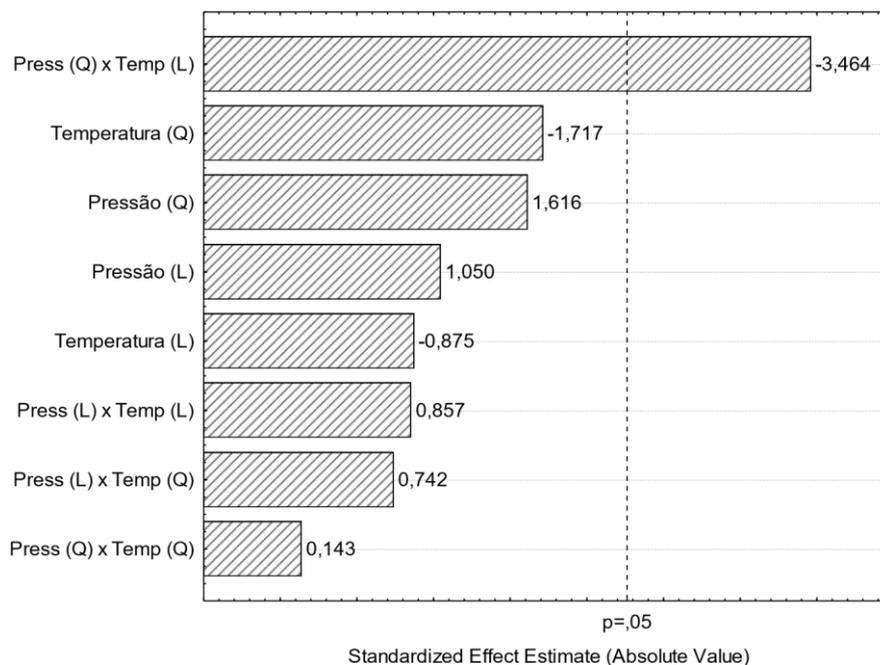


Figura 18. Gráfico de Pareto - Corrente solúvel (rica em  $\beta$ -Lg) – 1% WPI.

Em todos os experimentos realizados foram obtidos resultados semelhantes para todas as frações ricas em  $\beta$ -Lg, independente das variáveis utilizadas (Tabela 12). O gráfico de Pareto confirma que não houve diferença significativa entre as amostras obtidas (Figura 17). Apenas a interação entre os termos quadráticos de pressão versus temperatura linear apresentou significância estatística (p-valor <0,05). Portanto, estes efeitos não foram analisados de forma mais aprofundada.

A condição que obteve menor razão  $\alpha/\beta$  na corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg foi o binômio 8 MPa / 60 °C ( $\alpha/\beta = 0,10$ ). No entanto, considerando os custos de energia e visto que as variáveis 8 MPa e 55 °C resultou na segunda melhor razão  $\alpha/\beta$  (0,12), e com grande recuperação de  $\beta$ -Lg (95,1%) estas variáveis foram sugeridas como preferencial no fracionamento da proteína  $\beta$ -Lg.

Após analisar quais variáveis são significativas, a análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar os efeitos estatísticos sobre o fracionamento de  $\alpha$ -La. Para verificar o ajuste de um modelo é importante a avaliação dos resíduos. A característica de um modelo ideal seria que todas as previsões coincidisse exatamente com os valores observados. Ainda, um

grande desvio entre estes valores indica que o modelo não se ajustou aos dados experimentais. Portanto, é sempre favorável obter valores de desvio tão pequenos quanto for possível.

Os gráficos dos valores preditos x valores observados foram plotados na Figura 18, afim de observar a qualidade do ajuste do modelo linear (a) e quadrático (b) e determinar qual o melhor modelo para este caso. A partir da análise de ambos os gráficos é possível concluir que o modelo quadrático foi melhor ajustado aos resultados experimentais, visto que há uma menor dispersão nos dados plotados. A partir desta conclusão, as posteriores análises estatísticas foram realizadas considerando o modelo quadrático.

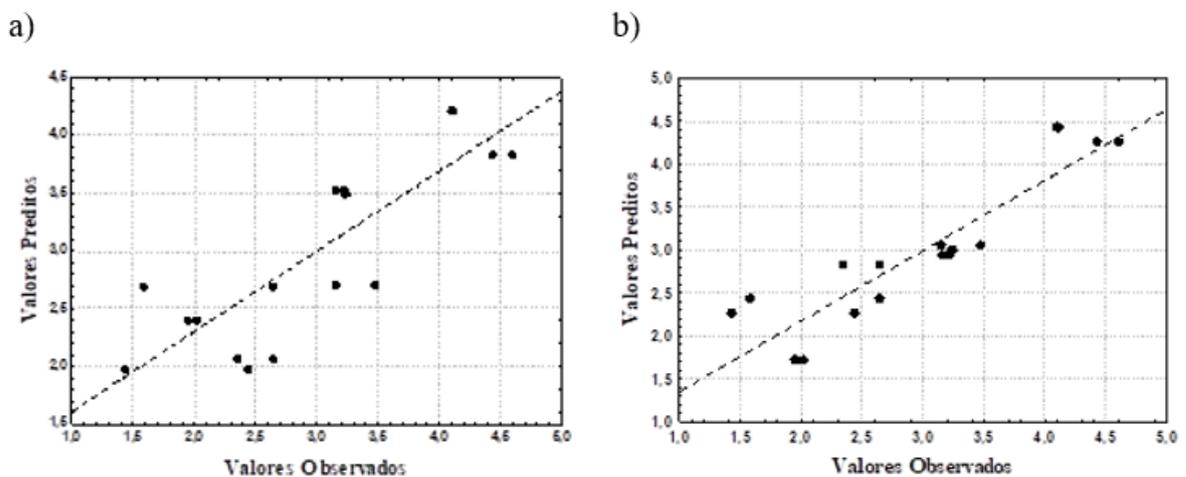


Figura 19. Valores preditos x valores observados na corrente fca em  $\alpha$ -La - suspensão 1% WPI a) modelo linear b) modelo quadrático.

Por meio da função polinomial linear é possível identificar a direção da ocorrência do fenômeno estudado. Já a função quadrática permite a observação do ponto máximo, em diferentes superfícies gráficas. Normalmente o modelo quadrático é mais adequado para descrever o ponto crítico na superfície de resposta, pois o mesmo pode se adequar a uma grande variedade de pontos. Isso justifica o fato do modelo quadrático se ajustar melhor a variável dependente, conforme é possível notar nas Figuras 18 a e b.

Os resultados obtidos na ANOVA encontram-se disponíveis na Tabela 13. Como descrito na sessão da metodologia (Planejamento experimental), se  $F$  calculado  $>$   $F$  tabelado, há diferença significativa entre os resultados obtidos relacionados às diferentes variáveis analisadas. O  $F$  calculado e tabulado (obtido no software Statistica) foram 10,96 e 3,14,

respectivamente. Como F calculado foi maior que F tabelado, houve diferença significativa entre os experimentos realizados. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,82, considerado baixo.

Tabela 13. Análise de Variância – 1% WPI.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>
<b>Regressão</b>	12,2842	5	2,456848	10,96	3,14 95%
<b>Resíduo</b>	2,6891	12	0,224089		
<b>Falta de ajuste</b>	1,51227	3			
<b>Erro puro</b>	1,17680	9			
<b>Total</b>	14,97331	17		$F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$	
<b><math>R^2</math></b>	82,04%				

O coeficiente da equação para cada variável preditora foi estimado com base nos dados amostrais. Essas estimativas são exibidas na Tabela 14, onde estão disponíveis os coeficientes de regressão somente com efeito significativo. Os efeitos que não foram considerados significativos no gráfico de Pareto ( $p\text{-valor} > 0,05$ ) foram excluídos.

Tabela 14. Coeficiente de Regressão – 1% WPI.

	<b>Coefic Regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>p-valor</b>	<b>-95%</b>	<b>95%</b>
<b>Interação</b>	2,98778	0,085230	0,000000	2,79497	3,180582
<b>T (L)</b>	-1,26500	0,180801	0,000063	-1,67400	-0,856000
<b>P (L)</b>	0,06000	0,180801	0,747595	-0,34900	0,469000
<b>P (L) * T (L)</b>	0,35875	0,127845	0,020506	0,06954	0,647956
<b>P (L) * T (Q)</b>	-0,69875	0,221435	0,011633	-1,19967	-0,197830
<b>P (Q) * T (L)</b>	0,82125	0,221435	0,004854	0,32033	1,322170

A partir dos coeficientes de regressão foi obtida a equação 14. Esta equação representa o modelo matemático codificado para realização do cálculo da variável dependente (razão  $\alpha/\beta$ ).

Apenas valores codificados foram utilizados na equação (-1, 0 e 1), afim de manter a proporcionalidade na variável resposta.

$$\text{Razão } \alpha/\beta = 2,988 - 1,265 * T + 0,06 * P + 0,359 * PT - 0,699 * PT^2 + 0,821 * P^2 T \quad (14)$$

O último procedimento da avaliação estatística foi a determinação da superfície de resposta e da curva de nível que estão disponíveis na Figura 19 e na Figura 20. Nestas figuras, estão ilustradas as melhores condições do processo para obter  $\alpha$ -La com alta pureza.

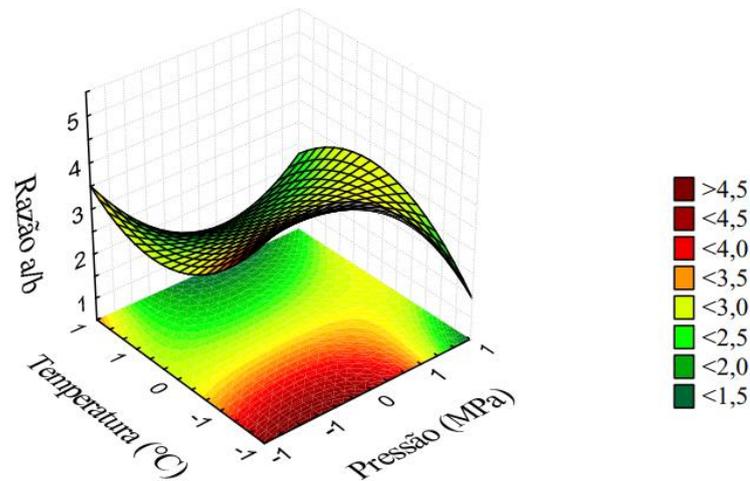


Figura 20. Superfície de resposta - corrente rica em  $\alpha$ -La -1% WPI.

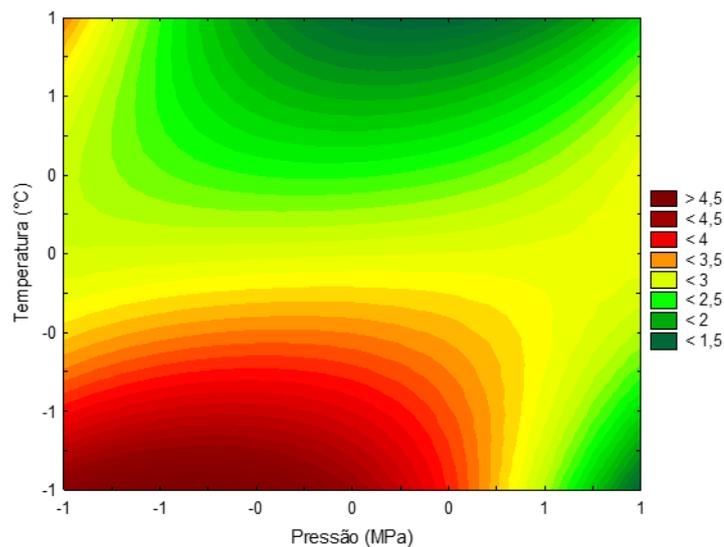


Figura 21. Curva de nível - corrente rica em  $\alpha$ -La - 1% WPI.

As regiões com coloração avermelhada nas figuras indicam razão  $\alpha/\beta$  superiores e correspondem às menores pressões e temperaturas. Esse comportamento corrobora com os resultados de pesquisas anteriores (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012; YVER et al., 2011), que obtiveram as frações ricas  $\alpha$ -La mais puras nas menores pressões para uma dada temperatura do sistema. Deve-se lembrar que há diferenças entre a metodologia utilizada neste trabalho e as descritas na literatura, como a menor concentração de proteínas no sistema e a operação do reator em modo contínuo.

#### **4.2.2 Composição das frações obtidas por meio da suspensão 5% WPI**

Na Tabela 15 estão dispostos os resultados obtidos no fracionamento em meio supercrítico utilizando a suspensão de WPI com 5% de concentração. A razão  $\alpha/\beta$  inicial foi de 0,34.

Tabela 15. Composição das frações após a reação – 5% WPI.

	P/MPa	T/°C	pH <sup>1</sup>	R prec/%	Corrente rica em $\alpha$ -La (precipitada)					Corrente rica em $\beta$ -Lg (suspensão)					
					$\alpha$ -La/%	$\beta$ -Lg/%	Rec $\alpha$ /%	Rec $\beta$ /%	GMP/%	$\alpha/\beta$	$\alpha$ -La/%	$\beta$ -Lg/%	1-Rec $\beta$ /%	GMP/%	$\alpha/\beta$
<b>WPI<sup>2</sup></b>					<b>14</b>	<b>41</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>0,34</b>	<b>14</b>	<b>41</b>	<b>100</b>	<b>30</b>	<b>0,34</b>
<b>1</b>	8 (-1)	55 (-1)	4,78	6,2±0,03	41,7±0,2	9,1±0,2	15,4	1,1	2,7±0,1	<b>4,61</b>	11,2±0,1	49,7±0,2	98,9	19,8±0,3	<b>0,23</b>
<b>2</b>	8 (-1)	60 (0)	4,78	11,7±0,00	46,0±0,1	9,4±0,1	38,5	2,8	2,2±0,0	<b>4,39</b>	7,9±0,3	58,3±0,2	97,2	21,0±0,2	<b>0,13</b>
<b>3</b>	8 (-1)	65 (1)	4,78	<b>14,8±0,00</b>	<b>50,0±0,0</b>	13,7±0,0	<b>52,7</b>	4,9	2,5±0,0	<b>3,66</b>	2,8±0,0	48,7±0,0	95,1	22,3±0,0	<b>0,06</b>
<b>4</b>	16 (0)	55 (-1)	4,60	8,8±0,02	32,2±0,2	22,3±0,1	22,3	4,7	3,4±0,1	<b>1,46</b>	13,5±0,1	48,3±0,1	95,3	17,0±0,4	<b>0,28</b>
<b>5</b>	16 (0)	60 (0)	4,60	13,5±0,00	47,5±0,1	11,2±0,2	24,5	1,5	2,6±0,0	<b>5,42</b>	8,1±0,1	57,4±0,1	98,5	11,9±0,1	<b>0,14</b>
<b>6</b>	16 (0)	65 (1)	4,60	2,1±0,00	43,1±0,1	20,5±0,1	6,7	1,0	2,6±0,0	<b>2,19</b>	5,1±0,1	<b>58,4±0,4</b>	<b>99,0</b>	23,5±0,3	<b>0,08</b>
<b>7</b>	24 (1)	55 (-1)	4,50	10,8±0,02	39,4±0,2	10,3±0,1	24,3	2,0	4,2±0,0	<b>3,83</b>	11,7±0,1	55,5±0,2	98,0	20,7±0,1	<b>0,21</b>
<b>8</b>	24 (1)	60 (0)	4,50	4,6±0,03	43,6±0,1	11,9±0,0	24,5	2,2	2,8±0,1	<b>3,65</b>	9,0±0,1	50,6±0,1	97,8	16,5±0,4	<b>0,18</b>
<b>9</b>	24 (1)	65 (1)	4,50	7,5±0,05	40,2±0,1	19,6±0,3	6,5	1,1	3,5±0,0	<b>2,06</b>	6,6±0,1	55,7±0,0	98,9	20,6±0,5	<b>0,12</b>

P, T = pressão e temperatura da reação, respectivamente; R prec = rendimento precipitado (corrente rica em  $\alpha$ -La); Rec- $\alpha$  e Rec- $\beta$  = recuperação das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg na corrente rica em proteína  $\alpha$ -La;  $\alpha/\beta$  = razão entre a proteína  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg na corrente; 1-Rec- $\beta$  = recuperação da proteína  $\beta$ -Lg na corrente rica em  $\beta$ -Lg.

<sup>1</sup> O pH foi calculado de acordo com a Equação (5).

<sup>2</sup> Esta linha se refere a composição inicial da suspensão de 5% de WPI.

As análises estatísticas também foram realizadas com os resultados obtidos no fracionamento com a suspensão de 5%. A seguir estão dispostas a Figura 21 e Figura 22 referentes aos gráficos de Pareto da corrente rica em  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, respectivamente.

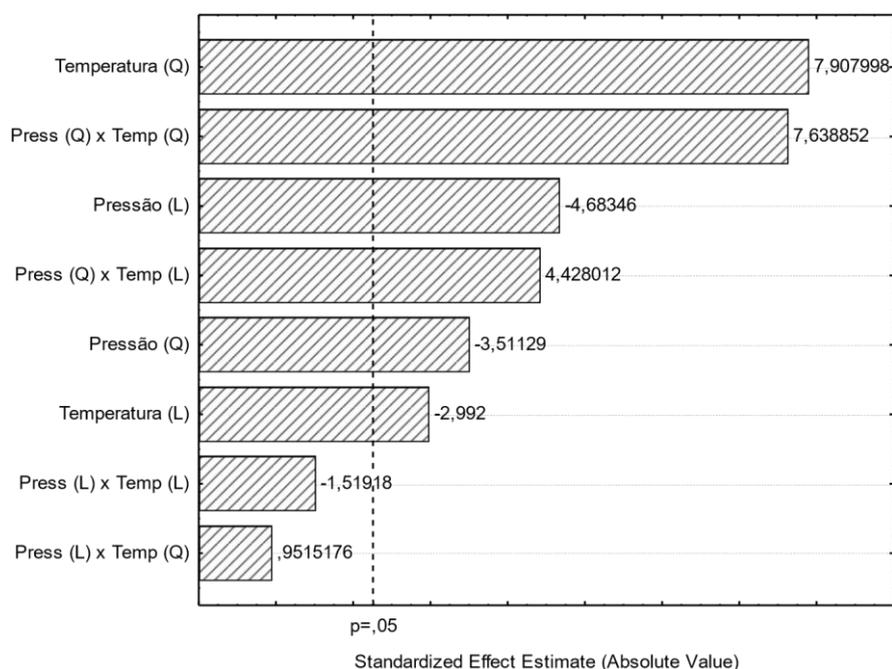


Figura 22. Gráfico de Pareto – corrente precipitada (rica em  $\alpha$ -La) – 5% WPI.

A alta significância dos termos quadráticos demonstra que a relação entre a variável dependente e as independentes não é linear. Assim, a superfície de resposta tende a apresentar forma de parábola. O formato de parábola na superfície de resposta demonstra que a maior significância é encontrada no nível intermediário das variáveis analisadas, e não nos extremos. Neste planejamento experimental (5% WPI) o termo que apresentou maior relevância estatística foi o termo quadrático da temperatura, seguido pela interação entre os termos quadráticos pressão e temperatura.

Em pesquisa anterior, a corrente precipitada aumentou com o aumento da temperatura (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1995). Bramaud (1995) utilizou ácido clorídrico (HCl) e Sierra (2013) promoveu precipitação por adição de ácido cítrico e agregação térmica a 50 °C. Ao utilizar CO<sub>2</sub> como precursor da acidificação da suspensão, deve-se levar em conta que o aumento da temperatura leva à diminuição da solubilidade em meio aquoso (Equação 1) (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1995; TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013). Portanto, a elevação acentuada da temperatura se torna um obstáculo para a diminuição do pH, o que justifica a influência negativa da temperatura linear. No entanto, a temperatura quadrática

apresenta influência positiva relevante, o que justifica a melhor separação ter ocorrido em condições intermediárias ( $\alpha/\beta = 5,42$ ). Uma hipótese para este comportamento é o aumento da velocidade de reação em temperaturas superiores.

A literatura reporta que a proteína  $\alpha$ -La possui um mol de cálcio por mol de proteína (FOX et al., 2015). Os íons de cálcio são responsáveis pela estabilização da estrutura terciária. A quebra desta ligação pode resultar em desnaturação intermediária (*molten globule*). Esta ligação é dependente do pH, especialmente abaixo de 5,0. Altas temperaturas e baixo pH podem levar a dissociação do íon  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas alterações podem ocorrer em temperaturas na faixa de 50 e 65 °C e são reversíveis ao retornar para condições de neutralidade (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1995). Neste estágio há uma diminuição da solubilidade da proteína na solução (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1995; TORO-SIERRA; TOLKACH; KULOZIK, 2013), o que também é uma hipótese para o efeito significativo da temperatura quadrática. Este efeito foi também relatado em estudo realizado com tratamento hidrotérmico da caseína (HOFLAND et al., 1999). Portanto, tanto o efeito do aumento da solubilidade do  $\text{CO}_2$  em água com diminuição da temperatura e o efeito da quebra das ligações de cálcio e desestabilização da proteína com aumento da temperatura devem ser levados em conta, mostrando que a compreensão dos fatores não é trivial.

A pressão linear também apresentou significância. Este efeito negativo demonstra que o aumento da pressão desfavorece a precipitação da proteína  $\alpha$ -La. Era esperado que a maior pressão fosse superior, visto que resulta em pH menor (4,5), próximo ao ponto isoelétrico da proteína  $\alpha$ -La. No entanto, o fracionamento mais seletivo, ou seja, com maior razão  $\alpha/\beta$  na corrente rica em  $\alpha$ -La, foi obtida utilizando temperatura e pressão intermediárias de 16 MPa e 60 °C (pH 4,6), seguido pela menor pressão e menor temperatura de 8 MPa e 55 °C (pH 4,78). Este fato foi também notado na precipitação da caseína utilizando tanto  $\text{CO}_2$  em altas pressões, quanto ácido sulfúrico (HOFLAND et al., 1999). A precipitação da caseína atingiu 100% com pH superiores ao seu ponto isoelétrico, demonstrando que não era necessária a acidificação além de pH 4,8 – 5,0.

Além disso, tanto os dados apresentados na literatura (HOFLAND et al., 1999), quanto o pH calculado no presente trabalho utilizando a equação 5 (BONNAILLIE; TOMASULA, 2012) apresentaram uma diminuição acentuada na região de menor pressão e à medida que alcança regiões de maiores pressões essa alteração no pH fica menos evidente. Este fato também

fortalece a interpretação de que pressões muito elevadas não são tão significativas para precipitação por meio da desestabilização da proteína devido ao ponto isoelétrico.

Ao observar os resultados obtidos em pesquisas anteriores, é possível notar que a precipitação com a utilização de  $\text{CO}_2$  não difere grandemente da precipitação ácida convencional. A literatura reporta a mudança de pH como a principal contribuição para a desestabilização das proteínas. Outros fatores, como pressão hidrostática, interação da proteína com o  $\text{CO}_2$  e os diferentes tipos de compostos são de menor importância na precipitação, mas poderiam ser responsáveis pelas diferenças observadas, especialmente quando esses fatores são diferentes dos esperados (HOFLAND et al., 1999). A reação intermediária no processo de formação de ácido carbônico a partir do  $\text{CO}_2$  resulta em bicarbonato (Equação 3). A reação entre este produto intermediário e as proteínas pode influenciar o delicado e complexo sistema entre os minerais e as proteínas do soro de leite (HOFLAND et al., 1999).

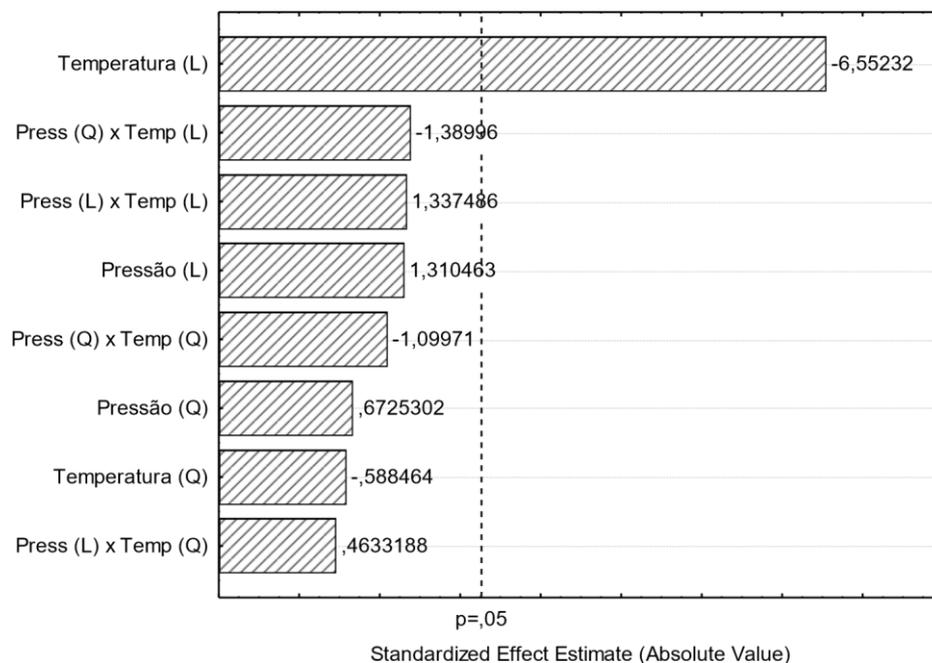


Figura 23. Gráfico de Pareto – corrente solúvel (rica em  $\beta$ -La) – 5% WPI.

Assim como no planejamento experimental realizado com suspensão de WPI com 1% de concentração, o gráfico de Pareto da corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg demonstrou que as variáveis utilizadas não foram significativas, ou seja, não houve diferença significativa nos resultados obtidos, embora todos tenham demonstrado resultados com baixos valores de razão  $\alpha/\beta$ , conforme era esperado.

Na Figura 23 estão plotados os gráficos de valores preditos x valores observados e, assim como no planejamento com suspensão de 1% de WPI, o ajuste quadrático obteve valores mais próximos ao experimental.

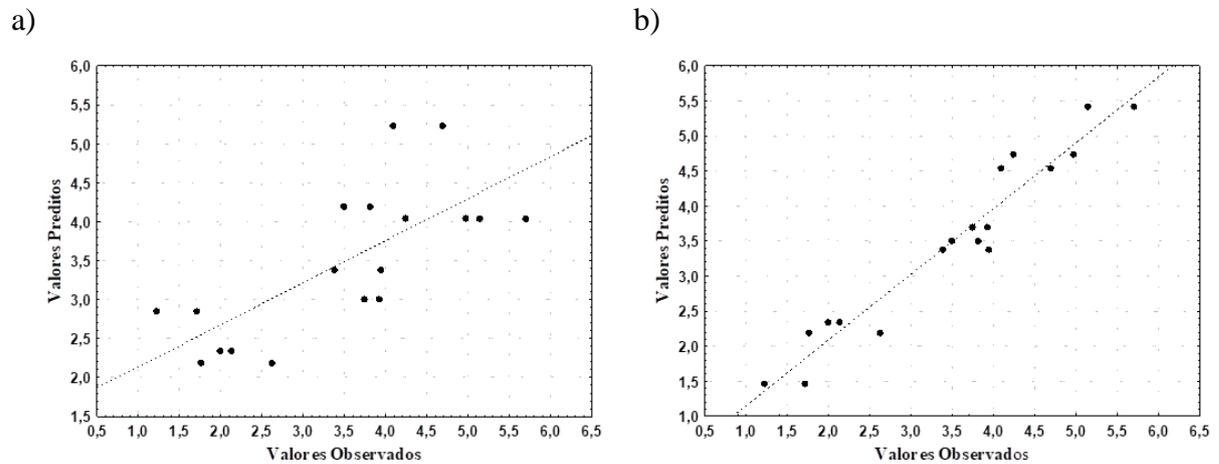


Figura 24. Valores preditos x valores observados - suspensão 5% WPI a) modelo linear b) modelo quadrático.

Na Tabela 16 está disposta a ANOVA, com o valor de F calculado e F tabelado, o que significa que houve diferença significativa nos tratamentos em relação aos parâmetros utilizados.

Tabela 16. Análise de Variância – 5% WPI.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabelado</sub></b>
<b>Regressão</b>	27,0893	6	4,514888	27,57694	3,09 95%
<b>Resíduo</b>	1,8009	11	0,16372		
<b>Falta de ajuste</b>	0,47382	2			
<b>Erro puro</b>	1,32710	9			
<b>Total</b>	28,89024	17		F <sub>calculado</sub> > F <sub>tabelado</sub>	
<b>R<sup>2</sup></b>	93,77%				

Os coeficientes de regressão dos termos considerados significativos (gráfico de Pareto) fornecidos pelo software Statistica estão dispostos na Tabela 17.

Tabela 17. Coeficiente de Regressão - 5% WPI.

	Coefic Regress	Erro Padrão	P-valor	-95%	95%
<b>Interação</b>	5,42000	0,271529	0,000000	4,80576	6,03424
<b>Pressão (L)</b>	-0,51917	0,110851	0,001147	-0,76993	-0,26840
<b>Pressão (Q)</b>	-1,40000	0,332553	0,002273	-2,15229	-0,64771
<b>Temperatura (L)</b>	0,36250	0,192000	0,091625	-0,07183	0,79683
<b>Temperatura (Q)</b>	-3,59250	0,332553	0,000002	-4,34479	-2,84021
<b>Press (Q) x Temp (L)</b>	-1,04125	0,235151	0,001652	-1,57320	-0,50930
<b>Press (Q) x Temp (Q)</b>	3,11125	0,407293	0,000032	2,18989	4,03261

A partir dos coeficientes de regressão foi possível obter a equação 15 que representa o modelo matemático codificado para realização do cálculo da variável dependente (razão  $\alpha/\beta$ ).

$$\text{Razão } \alpha/\beta = 5,420 - 0,519 * P - 1,400 * P^2 + 0,3625 * T - 3,592 * T^2 - 1,041 * P^2 * T + 3,111 * P^2 * T^2 \quad (15)$$

A Figura 24 é a representação da superfície de resposta da corrente rica em proteína  $\alpha$ -La.

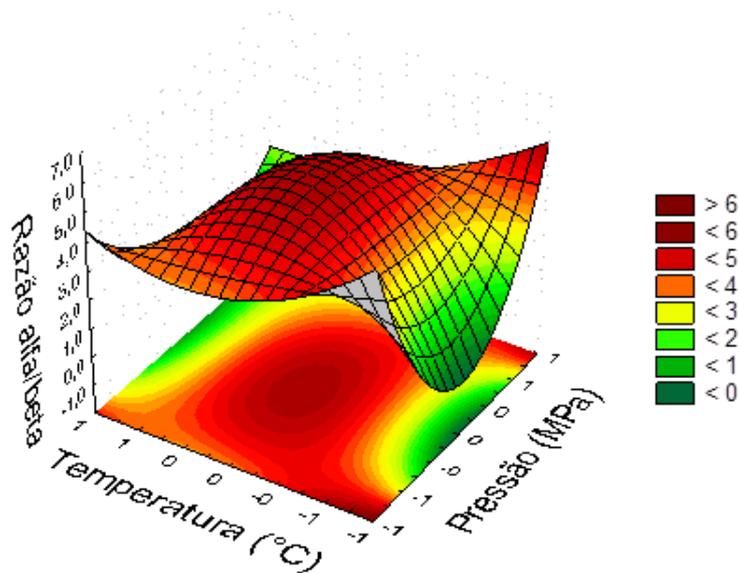


Figura 25. Superfície de resposta - corrente rica em  $\alpha$ -La -5% WPI.

Conforme esperado a partir da análise dos termos significativos no gráfico de Pareto, formato parabólico é pronunciado na superfície de resposta, devido a influência dos termos quadráticos. Na Figura 25 está disposta a curva de nível da corrente rica em proteína  $\alpha$ -La.

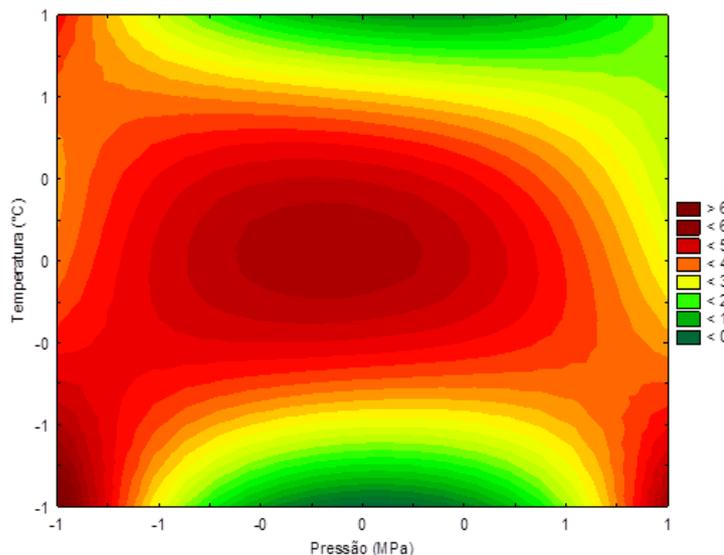


Figura 26. Curva de nível - corrente rica em  $\alpha$ -La – 5% WPI.

O conhecimento das reações de precipitação é necessário para otimizar o processo de fracionamento, pois influencia a escolha das condições de operação.

Hofland et al. (1999) relatou que os valores de pH a 5,5 MPa e 25 °C obtidos na mistura de CO<sub>2</sub> e água e CO<sub>2</sub> e leite foram de 3,08 e 4,82 respectivamente. Eles afirmam ainda que os componentes do leite apresentam efeito de tamponamento e o pH cai de forma menos acentuada do que na água. Bramaud (1995) afirma que a retirada de minerais como cálcio, magnésio e potássio auxiliou na desestabilização da  $\alpha$ -La, visto que as proteínas são substâncias polianfóteras (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1995). O maior efeito de tamponamento pode justificar a menor recuperação da proteína  $\alpha$ -La e rendimento do precipitado ao aumentar a concentração de 1 para 5% de WPI.

Entre outros parâmetros que afetam sua conformação em solução e seu comportamento de interação, podem ser citados o peso molecular, a densidade de carga, a distribuição de carga e a distribuição dos monômeros na molécula. Parâmetros relacionados com as interações de superfície também são importantes. Esse grande número de parâmetros faz com que seja difícil compreender plenamente o comportamento desse tipo de polímeros em solução considerando configurações e interações em interfaces (BRAMAUD; AIMAR; DAUFIN, 1995).

Por fim, é possível fazer algumas comparações dos resultados obtidos com alguns trabalhos com metodologias diferentes disponíveis na literatura. O fracionamento contínuo

proposto foi superior aos métodos convencional e cromatográficos (EL-SAYED; CHASE, 2011; KONRAD; KLEINSCHMIDT, 2008).

O uso de alta pressão hidrostática (HHP) resultou em uma recuperação  $\alpha$ -La de até 77% e 86% de pureza (MARCINIAK et al., 2018). Apesar dos resultados superiores, cabe ressaltar que as pressões utilizadas foram até 75 vezes superiores do que no fracionamento utilizando  $\text{scCO}_2$  deste trabalho, aumentando substancialmente os custos operacionais. Além disso, a reação foi em meio descontínuo e foram utilizadas as caseínas como aditivo, além do ácido clorídrico e a solução utilizada foi sintética, apresentando apenas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, portanto, a pureza é maior do que utilizando WPI comercial.

No presente estudo, a concentração de  $\alpha$ -La na corrente precipitada obtida foi de até 42,2%, sem o uso de coadjuvantes, solventes orgânicos ou enzimas. Embora o desempenho apresentado seja inferior em relação aos resultados relatados na literatura (BONNAILLIE, 2012; MARCINIAK et al. 2018; TOMASULA et al. 1998), há uma percepção evidente para o aprimoramento da metodologia proposta para atingir níveis compatíveis ou superiores aos relatados.

### 4.3 Dicroísmo circular

As estruturas tridimensionais das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em suas conformações apo (livres) determinadas por métodos experimentais de cristalografia de raios-X estão disponíveis para consulta pública no banco de dados de proteínas (PDB). As coordenadas 1f6r para  $\alpha$ -La e 4gny para  $\beta$ -Lg foram escolhidas para ilustrar as proteínas (Figura 1 e Figura 2), pois possuem todos os resíduos de aminoácidos definidos no espaço (CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000; GUTIÉRREZ-MAGDALENO et al., 2013).

Desta forma, torna-se possível comparar os dados obtidos pelo dicroísmo circular neste trabalho com a porcentagem de elementos da estrutura secundária das estruturas cristalográficas. A análise do dicroísmo foi realizada com as frações de proteínas obtidas nas condições de metodologia mais drásticas avaliadas nesta pesquisa (24 MPa / 65 °C), uma vez que nestas condições seria mais propenso à alteração conformacional da proteína.

### 4.3.2 Proteína $\alpha$ -Lactalbumina

Na Figura 26 está ilustrado o espectro obtido a partir da análise de dicroísmo circular da proteína  $\alpha$ -La padrão Sigma. Os resultados obtidos para todas as isotermas foram plotados em conjunto, a fim de possibilitar a visualização da alteração da estrutura.

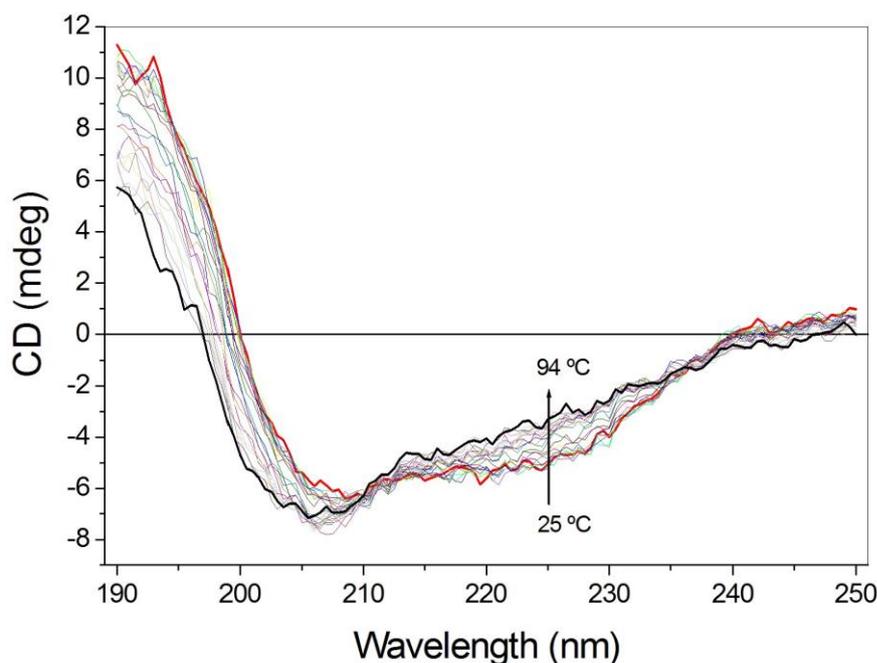


Figura 27. Variação da elipsidade bruta em função do comprimento de onda durante o processo de desnaturação – proteína  $\alpha$ -La Sigma.

O espectro de CD mostra a presença de dois pontos isobécticos em 210 e 235 nm. Nestes comprimentos de onda, a absorvância de duas ou mais espécies de compostos são as mesmas. Estes pontos indicam a transição entre pelo menos dois estados, que podem ser o estado nativo e desnaturado (HOLTZER; HOLTZER, 1992). O espectro obtido é característico da estrutura em  $\alpha$ -hélice (LEHNINGER, 2012; NELSON, 2011).

A partir da deconvolução do espectro do dicroísmo sob condições não desnaturantes (pH 7,0 e 25 °C) foi possível estimar a porcentagem de elementos da estrutura secundária das proteínas  $\alpha$ -La apresentadas em maior quantidade nas frações obtidas com tecnologia supercrítica.

Na Tabela 18 estão disponíveis os elementos da estrutura secundária da  $\alpha$ -La estimados a partir da estrutura cristalográfica, além dos estimados a partir do espectro de CD da proteína pura (Sigma) e obtida a partir do fracionamento com o uso de  $scCO_2$ .

Tabela 18. Comparação entre a estimativa da composição (%) dos elementos da estrutura secundária para cada amostra analisada de  $\alpha$ -La.

	<b>Estrutura 3D<sup>1</sup></b>	<b><math>\alpha</math>-La Sigma<sup>2</sup></b>	<b><math>\alpha</math>-La (<math>scCO_2</math>)<sup>2</sup></b>
$\alpha$ -hélice	34,0	13,3	<b>13,1</b>
$\beta$ -antiparalela	18,0*	19,7	<b>20,0</b>
$\beta$ -paralela		18,6	<b>18,8</b>
$\beta$ -turn	35,0	22,1	<b>22,2</b>
Random coil	<b>46,0</b>	<b>52,7</b>	<b>53,0</b>

<sup>1</sup>(CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000).

<sup>2</sup> Este trabalho.

\*Programa CDNN não distingue  $\beta$ -folha paralela e antiparalela.

O programa utilizado para estimar os elementos da estrutura secundária calcula a porcentagem de cada elemento individualmente a partir de diferentes faixas de comprimento de onda. Portanto, a soma da estimativa de todos os elementos da estrutura secundária nunca é igual a 100%, no entanto, a escolha da faixa de comprimento de onda usada nos cálculos deve ser a que fornece a estimativa mais próxima de 100%.

A estrutura  $\alpha$ -hélice representa 34% da proteína  $\alpha$ -La, sendo o elemento mais abundante de acordo com a estrutura cristalográfica. No entanto, o valor estimado é diferente do obtido a partir da deconvolução do espectro de CD da  $\alpha$ -La pura (Sigma) e obtida por fracionamento em  $scCO_2$ . Em ambos os casos, o percentual do elemento  $\alpha$ -hélice é em torno de 13%. O menor teor de estrutura  $\alpha$ -hélice nas amostras em comparação com a estrutura cristalográfica sugere que a proteína  $\alpha$ -La, tanto fracionada quanto adquirida na Sigma, pode estar parcialmente desnaturada.

Por outro lado, a porcentagem de  $\beta$ -folha é praticamente a mesma, tanto para a corrente rica em  $\alpha$ -La obtida no fracionamento, quanto para a  $\alpha$ -La pura e estrutura cristalográfica da  $\alpha$ -La, sendo em torno de 19%. A deconvolução do espectro de CD não foi capaz de distinguir entre a forma paralela ou antiparalela da estrutura  $\beta$ -folha. No entanto, de acordo com a estrutura cristalográfica (Figura 2) (GUTIÉRREZ-MAGDALENO et al., 2013), este elemento seria a  $\beta$ -folha antiparalela.

O comprimento de onda de 222 nm é o mais utilizado para acompanhar a transição de estados neste tipo de experimento, pois representa o pico de elipticidade para a conformação secundária de  $\alpha$ -hélice encontrada nas proteínas. A mudança na elipticidade do espectro de CD está representada na Figura 27.

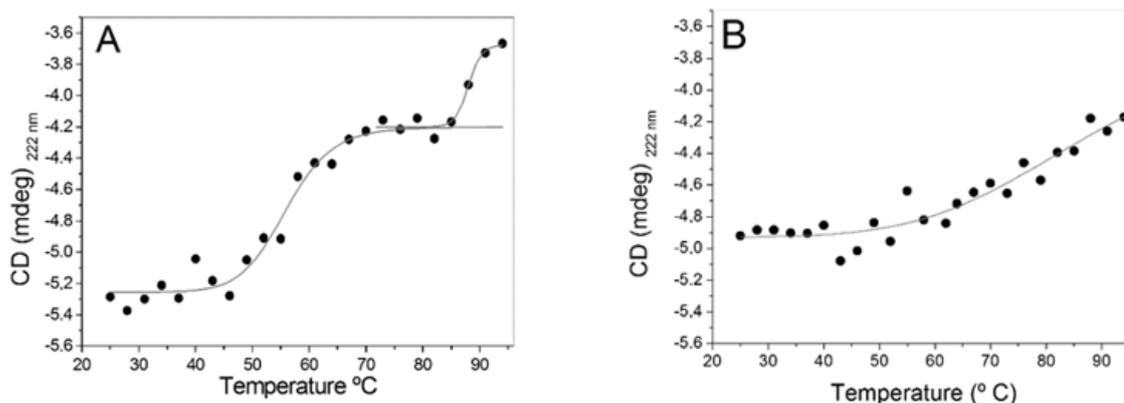


Figura 28. Variação da elipticidade de  $\alpha$ -La a 222 nm em função do aumento de temperatura (a) Padrão Sigma (b) corrente obtida no fracionamento.

A variação da elipticidade da proteína  $\alpha$ -La Sigma em função do aumento de temperatura (Figura 27 A) mostra uma transição em escada, que sugere a existência de estados intermediários (*molten globule*) durante o processo de desnaturação. Isso significa que a proteína desnatura em etapas. No primeiro passo, a proteína nativa é desnaturada até o estado intermediário e no segundo estágio, do estado intermediário ao estado totalmente desnaturado. A presença de estados intermediários no desdobramento de  $\alpha$ -La é descrita na literatura para processos de desnaturação devido a mudanças no pH e na desnaturação térmica (POLVERINO DE LAURETO et al., 2002; REDINGTON et al., 2016) e pressão (JONAS, 2002). Huppertz et al. (2004) também relataram que a pressão alta pode promover desnaturação de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg.

Um modelo de equação logística (Equação 16) para a transição entre os dois estados (COLOMBO; SEIXAS, 1999) foi ajustado aos pontos experimentais para cada transição observada para a proteína  $\alpha$ -La pura.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (16)$$

onde  $A_1$  = CD inicial (mdeg);  $A_2$  = CD final (mdeg);  $p$  = cooperatividade de transição;  $x_0$  = temperatura de transição ( $T_m$ ).

O modelo foi ajustado aos pontos experimentais entre 25 e 85 °C, que representa a transição entre o estado nativo e intermediário, o que forneceu a  $T_{m1}$  de 55,9 °C  $\pm$  1,72 °C. Foi ajustado também na transição entre o estado intermediário e o estado totalmente desnaturado, entre 73 e 94 °C, o que forneceu a  $T_{m2}$  de 87,9 °C  $\pm$  7,19 °C.

A Figura 27 a mostra a transição em escada para a proteína  $\alpha$ -La pura. No entanto, comportamentos diferentes foram observados para a corrente rica em  $\alpha$ -La (Figura 27 b). O espectro esperado para as proteínas fracionadas seria semelhante ao padrão puro Sigma. No entanto, isso não foi observado. O espectro de CD da corrente rica em  $\alpha$ -La foi mais próxima ao espectro esperado para as proteínas desdobradas. Além disso, a baixa variação na elipticidade observada em função da temperatura (aproximadamente 0,8 mdeg) em comparação com a proteína dobrada (aproximadamente 1,8 mdeg) são fortes evidências de que a proteína estava em um estado de dobramento semelhante ao totalmente desnaturado.

O modelo foi ajustado também para a corrente rica em  $\alpha$ -La, obtida na reação com  $scCO_2$ , e resultou em uma única temperatura de transição ( $T_m$ ) de 86,9 °C  $\pm$  20,2 °C. O alto valor do desvio mostra que a Equação 16 não se ajustou bem aos dados experimentais. A estrutura  $\alpha$ -La possui quatro pontes dissulfeto entre os resíduos 6-120, 28-111, 61-77 e 73-91, o que, em teoria, poderia conferir uma maior estabilidade térmica do que proteínas com nenhum ou baixo número de ligações dissulfeto (BARBANA; PÉREZ, 2011). No entanto, isso não foi observado em nossos estudos. Estes resultados suportam a hipótese de que a corrente proteica rica em  $\alpha$ -La obtida a partir do fracionamento em condições supercríticas foi parcialmente desnaturada.

A proteína  $\alpha$ -La Sigma também foi submetida as análises de dicroísmo circular sob o processo inverso, ou seja, após atingir a temperatura de 94 °C, o experimento foi realizado diminuindo a temperatura até 25 °C, com intervalos de 3 °C. O objetivo foi avaliar a reversibilidade do processo de desnaturação. O espectro obtido neste experimento está disponível na Figura 28 a. Na Figura 28 b foi plotado o gráfico de desnaturação e renaturação da proteína  $\alpha$ -La juntos a título de comparação, com comprimento de ondas fixo em 222 nm e com variação da temperatura.

a)

b)

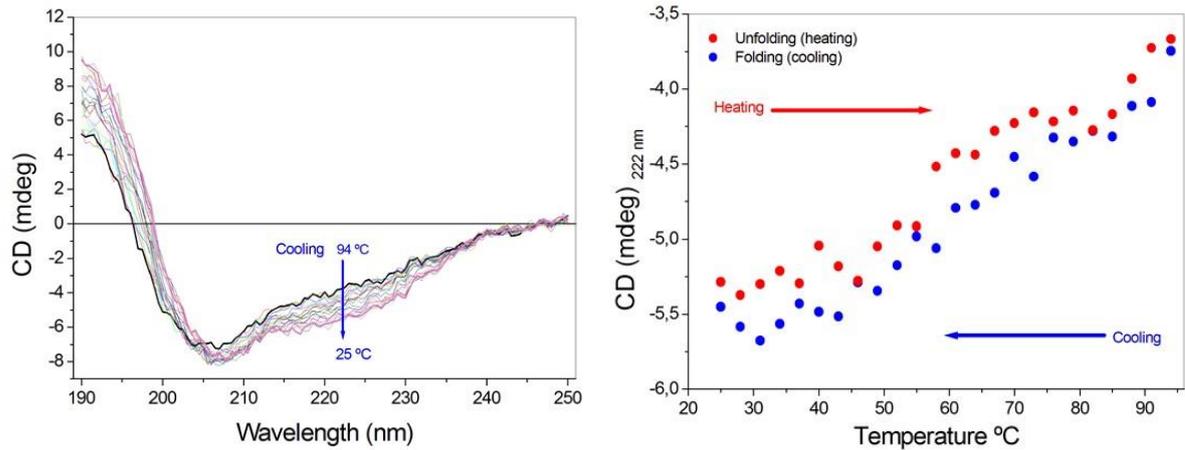


Figura 29. a) Variação da elipsidade bruta em função do comprimento de onda durante o processo de renaturação da proteína  $\alpha$ -La. b) Variação da elipsidade bruta em 222 nm em função do aumento e diminuição da temperatura - proteína  $\alpha$ -La Sigma.

A partir da análise da Figura 28 é possível notar que o processo de desnaturação da  $\alpha$ -lactalbumina é reversível, com um certo nível de histerese no processo, o que é esperado.

É interessante observar que mesmo durante o processo de renaturação, ocorrem a formação dos estados intermediários (*molten globule*). Isso significa que a proteína se renatura em partes (talvez estruturas secundárias) para depois se enovelar de forma definitiva (estrutura terciária).

#### 4.3.3 Proteína $\beta$ -Lactoglobulina

Os elementos da estrutura secundária da proteína  $\beta$ -Lg obtidos a partir da estrutura cristalográfica, da amostra pura (Sigma) em solução aquosa e da corrente rica em  $\beta$ -Lg obtida em condições supercríticas estão mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Comparação entre a estimativa da composição (%) dos elementos da estrutura secundária para cada amostra analisada de  $\beta$ -Lg.

	<b>Estrutura 3D<sup>1</sup></b>	<b><math>\beta</math>-Lg Sigma<sup>2</sup></b>	<b><math>\beta</math>-Lg scCO<sub>2</sub><sup>2</sup></b>
<b><math>\alpha</math>-hélice</b>	10,0	8,9	11,6
<b><math>\beta</math>-antiparalela</b>	49,0*	49,6	47,1
<b><math>\beta</math>-paralela</b>		4,4	5,7
<b><math>\beta</math>-turn</b>	40,0	16,4	22,0
<b>Random coil</b>	22,0	27,3	38,4

<sup>1</sup>(GUTIÉRREZ-MAGDALENO et al., 2013).

<sup>2</sup> Este trabalho.

\* O programa CDNN não distingue  $\beta$ -folha paralela e antiparalela.

A Tabela 19 indica que o elemento mais abundante da estrutura em  $\beta$ -Lg é a  $\beta$ -folha antiparalela, o que está de acordo com o observado na estrutura cristalográfica (Figura 2).

As percentagens de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha são praticamente as mesmas em todas as estruturas analisadas. Estes resultados sugerem que as amostras analisadas por dicroísmo ( $\beta$ -Lg Sigma e corrente rica em  $\beta$ -Lg) possuem um padrão de dobra semelhante ao observado na estrutura cristalográfica nativa, indicando que a tecnologia supercrítica empregada não promoveu a desnaturação de  $\beta$ -Lg, diferentemente do que foi observado na corrente rica em  $\alpha$ -La.

A variação da elipticidade a 205 nm em função do aumento da temperatura para a corrente rica em  $\beta$ -Lg e  $\beta$ -Lg Sigma foi observada. A Figura 29 (a) mostra a variação da elipticidade para a proteína pura. Observa-se uma variação gradual indicando três regiões de transição para a faixa de temperatura analisada.

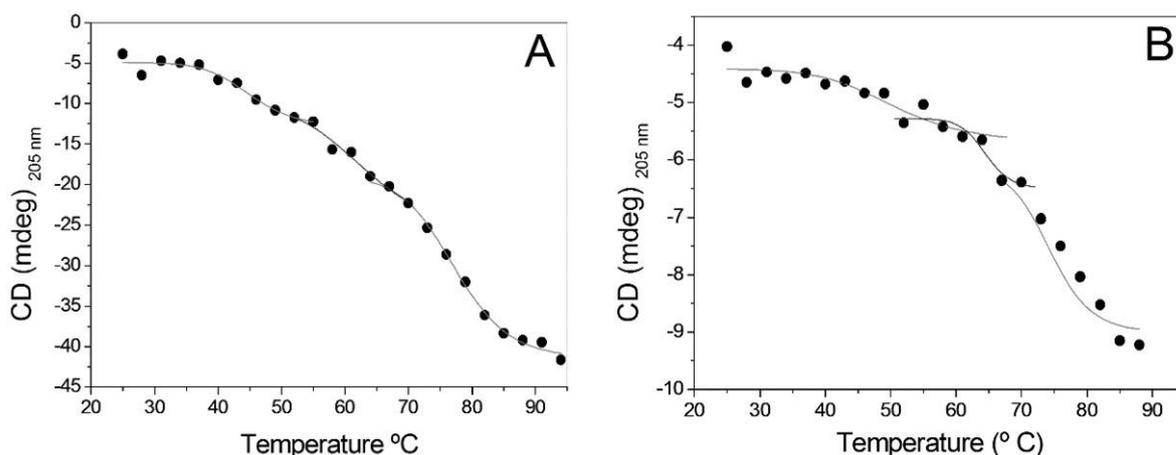


Figura 30. Variação da elipticidade de  $\beta$ -Lg a 205 nm em função do aumento da temperatura.

Aquecer soluções de proteínas com concentração de pelo menos  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$  até  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  promove dissociação de dímeros nativos e pequenas mudanças conformacionais reversíveis com o resfriamento (WIT, 2009).

De acordo com estudos a respeito da conformação da proteína  $\beta$ -Lg, entre  $60$  e  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  observa-se o desdobramento parcial de  $\beta$ -Lg em *molten globule* e modificações irreversíveis dos monômeros, induzidas pela exposição dos grupos tióis. Os monômeros formam dímeros não nativos através de troca de dissulfureto, oxidação de toletiol e interações não covalentes a temperaturas entre  $70$  e  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em temperaturas entre  $80$  e  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , essas interações aumentam ainda mais devido à maior taxa de acessibilidade dos grupos tiol e a um novo desdobramento parcial da estrutura  $\beta$ -Lg. Entre  $100$  e  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  observa-se o completo desdobramento da proteína residual, induzida pela degradação química das ligações dissulfureto. Em resumo, o processo de desnaturação da proteína  $\beta$ -Lg ocorre como segue (QI et al., 1997; WIT, 2009):

Dímeros  $\leftrightarrow$  Monômeros  $\leftrightarrow$  Estado do tipo R  $\leftrightarrow$  *molten globule*  $\rightarrow$  Estado desdobrado

Os resultados obtidos neste trabalho concordam com a literatura (WIT, 2009). Na faixa de temperatura ( $25$  a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ ) os três primeiros estágios do processo desnaturado foram observados. O estado totalmente desnaturado da proteína ocorre em temperaturas próximas a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  (WIT, 2009), não exploradas neste estudo devido ao limite de temperatura do equipamento.

A equação 16 foi ajustada às três regiões de transição observadas na Figura 29, a fim de obter as três temperaturas de transição destacadas na Tabela 20.

Tabela 20. Temperatura de transição da proteína  $\beta$ -Lg – pura e fracionada.

	<b>T<sub>m1</sub></b>	<b>T<sub>m2</sub></b>	<b>T<sub>m3</sub></b>
Transição*	<b>DD<math>\leftrightarrow</math>M</b>	<b>M<math>\leftrightarrow</math>MG</b>	<b>MG<math>\leftrightarrow</math>D</b>
$\beta$ -Lg (Sigma)	48.5 $\pm$ 1.6	67.3 $\pm$ 1.1	79.0 $\pm$ 1.3
$\beta$ -Lg (scCO <sub>2</sub> )	45.0 $\pm$ 1.9	62.8 $\pm$ 3.1	77.2 $\pm$ 0.4

\*DD: dímero dobrado; M: monômero; MG: molten globule; D: desdobrado

Considerando a margem de erro e também as diferenças nos níveis de pureza da amostra, as temperaturas de transição encontradas para a corrente rica em  $\beta$ -Lg obtida por tecnologia supercrítica são muito próximas àquelas estimadas para  $\beta$ -Lg pura.

Experimentos de CD usando radiação Síncrotron mostraram que  $\beta$ -Lg sofre desnaturação na transição de monômeros – *molten globule* a 65 °C (QI et al., 1997), o que é muito próximo dos valores de T<sub>m2</sub> obtidos nos experimentos realizados. Essas evidências corroboram o fato de que a  $\beta$ -Lg da corrente solúvel foi obtida em sua conformação funcional nativa. A proteína  $\beta$ -Lg possui duas pontes dissulfeto entre os resíduos 106-119 e 66-160 que, de acordo com a análise de dicroísmo circular, não foram afetadas pelo processo de fracionamento com scCO<sub>2</sub>, permanecendo estáveis em sua conformação nativa. A forma desnaturada da proteína não influencia nas aplicações nutricionais (absorção hidrolisada). No entanto, a forma nativa garante seu uso como agentes emulsionantes e estabilizadores (BARBANA; PÉREZ, 2011).

As diferenças observadas na composição dos elementos da estrutura secundária (Tabela 19) e nas temperaturas de transição entre o padrão de proteínas puras e as frações extraídas podem ser devido ao grau de pureza de cada amostra. Apesar destas pequenas diferenças, o CD permitiu confirmar que a forma nativa de  $\beta$ -Lg e a composição da estrutura secundária foram mantidas após o fracionamento com scCO<sub>2</sub>.

#### 4.4 Análise e simulação econômica

Na Tabela 21 está apresentado o balanço de massa dos fluxos 1 a 9 calculados usando dados experimentais e assumindo a reciclagem total de CO<sub>2</sub>. A separação entre as correntes 6

e 8 na centrífuga foi calculada a partir das porcentagens experimentais de recuperação de água e de cada proteína individual nas duas frações. Os resultados de balanço de massa foram obtidos para todos os valores de T, P e  $C_{WPI}$  e todas as composições calculadas foram validadas de acordo com os dados experimentais.

Tabela 21. Balanço de massa para o diagrama simplificado da Figura 10, de acordo com as correntes numeradas, calculado usando os resultados experimentais com  $C_{WPI} = 1\%$ ,

T = 60 °C e P = 16 MPa (caso base).

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Temperatura (°C)	25	20	60	60	20	20	60	20	60
Pressão (MPa)	0,1	16,0	0,1	16,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Vazão (kg/h)	970,0	970,9	970,0	1940,0	970,0	967,57	6,771	2,43	2,31
Fração mássica água	0,9900	---	---	0,7700	0,9900	0,9925	---	0,4774	---
Fração mássica Minerais	0,0004	---	---	0,0004	0,0004	0,0004	0,0966	---	---
Fração mássica Lactose	0,0010	---	---	0,0010	0,0010	0,0010	0,1451	---	---
Fração mássica $\alpha$ -La	0,0016	---	---	0,0016	0,0016	0,0006	0,0660	0,3770	0,3770
Fração mássica $\beta$ -Lg	0,0040	---	---	0,0040	0,0040	0,0042	0,5113	0,1236	0,6230
Fração mássica GMP	0,0030	---	---	0,0030	0,0030	0,0013	0,1810	0,0220	0,0152
Fração mássica CO <sub>2</sub>	---	1,0000	1,0000	0,2200	---	---	---	---	---

A variação das condições operacionais do processo afetou o custo de capital de alguns equipamentos, bem como o consumo das utilidades (energia, água, etc), alterando consideravelmente os custos operacionais anuais do processo.

A simulação do processo contínuo comercial está disposta na Figura 30. A predição de dados para características de proteína é baseada no modelo proposto por Rajedran et al (2014) para um processo de digestão anaeróbia com informações auxiliares para o estado sólido de Liu et al. (2015), que investigaram a produção de ácido L-lático com uma avaliação técnico-econômica baseada na modelagem do Aspen Plus®.

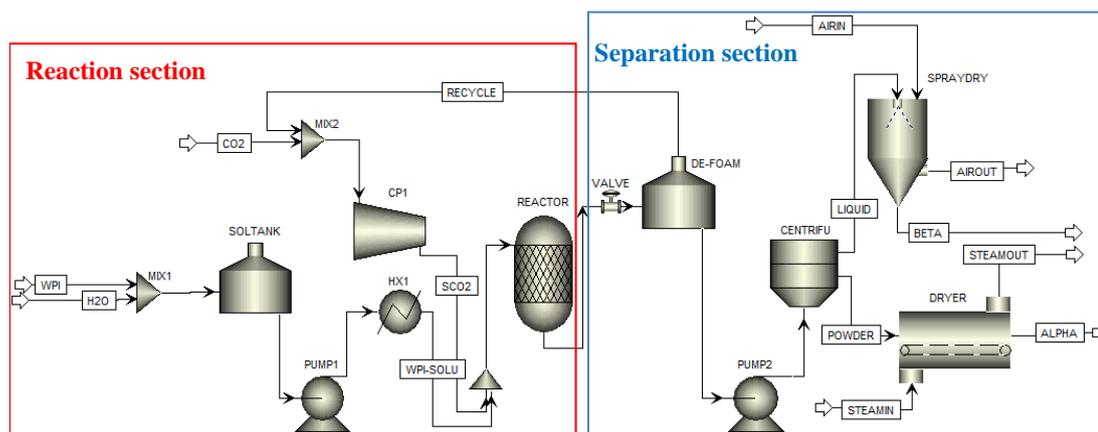


Figura 31 Fluxograma do processo contínuo de fracionamento de proteínas projetado em Aspen Plus®.

A nomenclatura e o equipamento usados no fluxograma estão listados na Tabela 22 com o custo e a especificação de cada unidade.

Tabela 22. Equipamento e especificações para fracionamento de WPI com scCO<sub>2</sub> – T = 60 °C, P = 16 MPa, C = 1% e tempo de residência de 34 min.

Nome	Descrição	Especificação	Custo (K\$)
SOLTANK	Tanque de mistura	Volume = 971,0 L	35,4
BOMBA1	Bomba de engrenagem	Energia = 0,10 kW	8,8
BOMBA2	Bomba Centrífuga	Energia = 0,056 kW	3,2
REATOR	Reator Tubular	Volume = 2,05 m <sup>3</sup>	2100,1
HX1	Trocador de calor	Área = 0,12 m <sup>2</sup>	0,7
CENTRIFU	Centrífuga de discos	Capacidade = 1000 L/h	101,2
SPRAYDRY	Spray Dryer	Volume = 6,5 m <sup>3</sup>	654,4
DRYER	Drum Dryer	Área = 1,5 m <sup>2</sup>	220,5
CP1	Compressor da centrífuga	Energia = 120 HP	140,3
DE-FOAM	Separador de espuma	Volume = 0,35 m <sup>3</sup>	70,5
<b>Total</b>			<b>3335,1</b>

Na Tabela 23 estão dispostos os custos totais de processamento por quilograma de WPI tratados e os custos para obtenção do quilograma da corrente rica em  $\alpha$ -La e rica em  $\beta$ -Lg, calculados de acordo com os parâmetros operacionais (temperatura, pressão e concentração).

Tabela 23. Custos de produção como função dos parâmetros de operação para uma taxa de alimentação WPI de 970 kg/h.

<i>Exp</i>	T (°C)	P (MPa)	Custo Processo <sup>1</sup> \$/Kg <sub>WPI</sub>	Corrente rica em $\alpha$ -La			Corrente rica em $\beta$ -Lg		
				C $\alpha$ -La (wt%)	Custo <sup>2</sup> Kg $\alpha$ -La	Quant <sup>3</sup> $\beta$ -Lg	C $\beta$ -Lg (wt%)	Custo <sup>4</sup> Kg $\beta$ -Lg	Quant <sup>5</sup> $\alpha$ -La
<i>1% WPI</i>									
1	55	8	8,09	40,5	31,41	2,88	61,21	10,90	0,35
2	55	16	8,64	39,4	29,48	2,41	<b>61,5</b>	12,22	0,41
3	55	24	9,61	33,5	30,63	2,19	59,7	14,00	0,46
4	60	8	8,52	42,2	43,40	4,09	58,1	10,60	0,24
5	60	16	9,06	37,7	29,98	2,31	51,3	12,98	0,43
6	60	24	10,14	34,3	30,31	1,99	60,3	15,24	0,50
7	65	8	8,73	34,5	<b>26,28</b>	2,01	58,0	13,07	0,50
8	65	16	9,48	37,9	32,29	2,41	56,6	13,42	0,42
9	65	24	10,34	29,2	28,30	1,74	57,3	16,29	0,58
<i>5% WPI</i>									
10	55	8	<b>5,43</b>	41,7	34,50	5,35	49,7	<b>6,44</b>	0,19
11	55	16	6,84	46,0	32,17	3,70	58,3	8,69	0,27
12	55	24	7,54	<b>50,0</b>	26,96	2,58	48,7	10,47	0,39
13	60	8	5,89	32,2	44,06	6,48	48,3	6,80	0,15
14	60	16	7,43	47,5	37,06	3,99	57,4	9,29	0,25
15	60	24	7,99	43,1	27,86	2,49	58,4	11,20	0,40
16	65	8	6,28	39,4	40,45	5,44	55,5	7,43	0,18
17	65	16	7,98	43,6	39,44	3,94	50,6	10,00	0,25
18	65	24	8,14	40,2	29,10	2,57	55,7	11,30	0,39

<sup>1</sup> Custo do processo por quilograma de WPI consumido; <sup>2</sup> Custo por quilograma de corrente rica em  $\alpha$ -La produzido; <sup>3</sup> Quantidade em quilograma de produção de corrente rica em  $\beta$ -Lg por quilograma de corrente rica em  $\alpha$ -La produzido; <sup>4</sup> Custo por quilograma de corrente rica em  $\beta$ -Lg produzido; <sup>5</sup> Quantidade em quilograma de corrente rica em  $\alpha$ -La por quilograma de corrente rica em  $\beta$ -Lg produzida.

O custo do processo refere-se ao valor gasto para produção total (corrente rica em  $\alpha$ -La e corrente rica em  $\beta$ -Lg) ao utilizar 1Kg de WPI.

Em todas as configurações, os custos foram divididos entre instalações (3531,1 K\$), mão de obra (320,6 K\$/ano) e utilidades (2401,4 K\$/ano). Os custos totais de produção (com base em 1Kg de WPI) foram distribuídos entre as seções “Reação” e “Separação” (Figura 30) para estudar as tendências econômicas em função das condições de processamento. A seção de reação, responsável por 89% dos custos operacionais totais (2440,5 a 3686,0 K\$/ano), inclui armazenamento e pré-condicionamento de WPI, água e CO<sub>2</sub>; um reator tubular de alta pressão; loop de reciclagem de CO<sub>2</sub>; bombas, válvulas, compressores, trocadores de calor, tubulação, etc. A seção de separação e secagem (159,0 K\$/ano) foi composta pelo tanque de remoção de

espuma; centrífuga de alta velocidade; *spray dryer*; *drum dryer*; e bombas, tubos e acessórios (Figura 30).

O experimento 12 produziu corrente rica em  $\alpha$ -La com maior pureza (50%), com custo de US\$ 7,54 por quilograma de WPI, processado a 55 °C e 16 MPa com 5% de concentração de WPI. Nesta condição, a produção de 1 Kg de corrente rica em  $\alpha$ -La custa US\$ 26,96, sendo uma das condições com menor custo, e produção de 1 Kg de corrente rica em proteína  $\beta$ -Lg por US\$ 10,47.

Em todos os experimentos realizados a concentração da proteína  $\alpha$ -La foi favorecida ao aumentar a concentração do WPI inicial de 1 para 5%. Ao utilizar pressão de 24 MPa e temperatura de 55 °C (exp 3 e 12), por exemplo, a recuperação de  $\alpha$ -La, razão  $\alpha/\beta$  e pureza da amostra foram superiores utilizando solução mais concentrada, enquanto o custo ao processar 1 kg de WPI foi aproximadamente 20% inferior, além do custo também ser inferior para produção da corrente rica em  $\alpha$ -La e também da corrente rica em  $\beta$ -Lg.

Ao utilizar a menor pressão de 8 MPa e temperatura de 55 °C (experimentos 1 e 10) o aumento da concentração da suspensão resultou em menor custo ao processar 1 Kg de WPI. A pureza na corrente rica em  $\alpha$ -La foi de 41,7% e na corrente rica em  $\beta$ -Lg foi de 49,7%. Apesar de menores custos, a pureza não foi a mais alta dentre as obtidas com os parâmetros avaliados. Portanto, a concepção de condição ótima de aplicação deve levar em conta diferentes fatores.

#### **4.4.3 Análise comparativa**

Apesar de outros processos de fracionamento diferenciarem-se pela concentração de WPI, estágio de compressão, design de processo ou mesmo ausência de avaliação econômica, selecionamos um estudo similar que apresenta características comparáveis pontuais: custo de produção, produção total e pureza dos produtos obtidos. Portanto, uma vez obtido o desempenho do nosso caso base, os melhores resultados foram comparados ao estudo de Yver et al. (2012) na Tabela 24.

Tabela 24. Análise comparativa do processo proposto.

<b>Critério</b>	<b>Yver</b>	<b>Atual</b>
Custo de produção (US\$/kg)	5,42	<b>5,43</b>
Produção total (Kton/ano)	5,33	<b>8,34</b>
Pureza $\alpha$ -La	57,0	<b>41,7</b>
Rendimento $\alpha$ -La (wt %)	22,4	<b>6,2</b>
Operacionalidade anual da planta (dias)	250	<b>358</b>

O custo de produção por quilograma de WPI processado mostrou-se similar em ambos os trabalhos. No entanto, os autores (Yver et al., 2012) assumiram um tempo de reação de 30 minutos na simulação para determinação dos custos, sendo que o tempo de residência experimental mostrou-se maior (2 horas). Tal condição, implicaria em valores econômicos reais diferentes (i.e., maiores custos).

O tempo de operação estimado por Yver et al. (2012) para o processo em batelada foi inferior ao proposto neste estudo, visto que o processo é contínuo. Este fato é determinante para a maior produção anual das correntes enriquecidas a partir do processo proposto, conforme pode ser observado na Tabela 24.

## 5 CONCLUSÕES

As condições de operação (pressão e temperatura selecionadas permitiram o fracionamento das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg do WPI utilizando scCO<sub>2</sub> como solvente em um reator de fluxo contínuo.

Ao utilizar uma suspensão contendo 1% de WPI, a aplicação de menor temperatura e pressão (8 MPa e 55 °C) resultou em razão  $\alpha/\beta$  na corrente rica em  $\alpha$ -La igual a 3,84, com 40,5% de  $\alpha$ -La e 9,9% de  $\beta$ -Lg e com rendimento de 20,9% de proteínas precipitadas e recuperação de  $\alpha$ -La de 52,9%. A razão  $\alpha/\beta$  nessas condições foi dez vezes maior que a razão inicial no WPI. A razão  $\alpha/\beta$  diminuiu para a corrente rica em  $\beta$ -Lg para todas as condições estudadas, resultando em maior teor de  $\beta$ -Lg em relação a  $\alpha$ -La. Assim, foi possível obter duas frações separadas, uma rica em  $\alpha$ -La e outra rica em  $\beta$ -Lg.

Ao utilizar 16 MPa, 60 °C e suspensão com 1% de WPI foi obtido o maior rendimento em massa precipitada. Nessas condições, a razão  $\alpha/\beta$  foi igual a 2,84. Pode ser uma condição interessante para obtenção de corrente rica em  $\alpha$ -La com menores custos, devido ao alto

rendimento. No entanto, a seletividade foi comprometida, portanto o valor comercial pode sofrer influência negativa.

No planejamento utilizando suspensão de 5% de WPI, as melhores condições de operação foram obtidas utilizando 8 MPa e 65 °C, resultando em corrente rica em  $\alpha$ -La (50%  $\alpha$ -La e 13,7% de  $\beta$ -Lg) com recuperação de  $\alpha$ -La igual a 52,7% e rendimento de 14,8%. A razão  $\alpha/\beta$  também foi dez vezes superior do que no WPI inicial (razão  $\alpha/\beta = 3,66$ ). Nesta concentração, a maior razão  $\alpha/\beta$  foi igual a 5,42, operando a 60 °C e 16 MPa, resultando em 47,5% de  $\alpha$ -La.

A análise econômica demonstrou que as condições de operação afetam diretamente os custos operacionais. A condição para obter corrente de  $\alpha$ -La com menor custo foi utilizando 65 °C e 8 MPa com concentração inicial de WPI de 1%. Já para obter corrente de  $\beta$ -Lg com maior pureza, os parâmetros mais indicados para um menor custo são 55 °C, 8 MPa e suspensão de 5% de WPI. Os obtidos a partir do fracionamento contínuo mostram-se vantajosos em relação a operação em batelada, visto que o processo não necessita de pausas para manutenção com alta frequência e, portanto, resulta em maiores produções por ano.

As amostras obtidas nas condições mais drásticas de pressão e temperatura (24 MPa e 65 °C) foram analisadas por dicroísmo circular. A análise conformacional da proteína  $\alpha$ -La revela que houve desnaturação parcial das estruturas da  $\alpha$ -hélice, enquanto a proteína  $\beta$ -Lg permaneceu em seu estado nativo. O fato de a proteína  $\alpha$ -La estar parcialmente desnaturada melhora sua digestibilidade em alimentos voltados ao público com alergia.

O uso de tecnologia supercrítica em reator de fluxo contínuo resulta em um tempo de processamento significativamente menor do que o uso de um reator em batelada. As frações ricas das proteínas  $\alpha$ -La apresentaram alta pureza (alta razão  $\alpha/\beta$ ). Portanto, essa alta eficiência na separação de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg usando scCO<sub>2</sub> torna o processo mais atraente para produtos farmacêuticos e alimentícios industriais, uma vez que não são empregados solventes orgânicos.

A partir dos resultados obtidos, e considerando que se trata de um trabalho pioneiro no fracionamento de proteínas do isolado proteico utilizando scCO<sub>2</sub> em reação de fluxo contínuo, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser propostas:

- Utilização de aditivos que podem permitir maior aglomeração da proteína a ser precipitada, como a caseína;

- Utilização de maiores tempos de residência por meio da diminuição da vazão de alimentação, promovendo maior precipitação da proteína  $\alpha$ -La;
- Estudo da estrutura secundária de todas as condições experimentais, avaliando se houve desnaturação irreversível mediante as pressões e temperaturas aplicadas;
- Utilização das análises de dicroísmo circular para melhorar a compreensão da precipitação, investigando se a quebra das estruturas terciárias foi precursora da agregação da proteína;
- Análise quantitativa das demais proteínas do soro do leite (*minor proteins*);
- Aplicação da tecnologia supercrítica para separação do glicomacropéptido, por meio de aplicação de maiores pressões ou aditivos;
- Nanoencapsulamento das proteínas purificadas.

## REFERÊNCIAS

- ALAMDARI, E. K.; EHSANI, M. R.; AZAD, I. Antimicrobial Peptides Derived from Milk : A Review. **Journal of Food Biosciences and Technology**, 2017, v. 7, n. 1, p. 49–56.
- ARUNKUMAR, A.; ETZEL, M. R. Fractionation of  $\alpha$ -lactalbumin from  $\beta$ -lactoglobulin using positively charged tangential flow ultrafiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, 2013, v. 105, p. 121–128.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. 2011, v. 278, p. 381–386.
- BARBANA, C.; PÉREZ, M. D. Interaction of  $\alpha$ -lactalbumin with lipids and possible implications for its emulsifying properties - A review. **International Dairy Journal**, 2011, v. 21, n. 10, p. 727–741.
- BONNAILLIE, L. M.; TOMASULA, P. M. Fractionation of whey protein isolate with supercritical carbon dioxide to produce enriched  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin food ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, v. 60, n. 20, p. 5257–5266, 23.
- BRAMAUD, C.; AIMAR, P.; DAUFIN, G. Thermal Isoelectric Precipitation of  $\alpha$ -Lactalbumin from a Whey Protein Concentrate: Influence of Protein-Calcium Complexation. **Biotechnology and Bioengineering**, 1995, v. 47, p. 121–130.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**. 2015, v. 73, p. 149–161.
- BRODY, E. P. Glycomacropptide bovine bioactivities. **British Journal of Nutrition**, 2000, v. 84, n. 2000.
- BRUNNER, G. The Journal of Supercritical Fluids Near critical and supercritical water . Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes, 2009, v. 47, p. 373–381.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment., 2012, v. 110, p. 48-68.
- CASAL, E. et al. Use of chitosan for selective removal of  $\beta$ -Lactoglobulin from whey. **Journal of Dairy Science**, 2006, v. 89, n. 5, p. 1384–1389.
- CHANDRAPALA, J. et al. Nanofiltration and nanodiafiltration of acid whey as a function of pH and temperature. **Separation and Purification Technology**, 2016, v. 160, p. 18–27.

- CHRYSINA, E. D.; BREW, K.; ACHARYA, K. R. Crystal Structures of Apo- and Holobovine  $\alpha$ -Lactalbumin at 2.2-Å Resolution Reveal an Effect of Calcium on Inter-lobe Interactions. **Journal of Biological Chemistry**, 2000, v. 275, n. 47, p. 37021–37029.
- COLOMBO, M. F.; SEIXAS, F. A. V. Novel Allosteric Conformation of Human HB Revealed by the Hydration and Anion Effects on O<sub>2</sub> Binding. **Biochemistry**, 1999, v. 38, n. 36, p. 11741–11748.
- DA SILVA, C. A. S. et al. Partitioning of glycomacropptide in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. 2009, v. 44, n. 11, p. 1213–1216.
- DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, 2012, v. 3, n. 1, p. 449–467.
- DATTA, D. N.; TOMASULA, D. P. M. **Emerging Dairy Processing Technologies: Opportunities for the Dairy Industry**. [s.l.] Wiley Blackwell, 2015, v. 160, p. 18-27.
- DRAGONE, G. et al. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, 2009, v. 112, n. 4, p. 929–935.
- DULLIUS, A. et al. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. **Journal of Functional Foods**, 2018, v. 42, n. August 2017, p. 58–74.
- EL-SAYED, M. M. H.; CHASE, H. A. Trends in whey protein fractionation. **Biotechnology Letters**, 2011, v. 33, p. 1501–1511.
- EUGENIA LUCENA, M. et al. Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates. Production of milk derivatives as a base for infant formulas. **Separation and Purification Technology**, 2006, v. 52, n. 2, p. 310–316.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en>>.
- FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, 2015, v. 48, p. 15–22.
- FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P. Food Hydrocolloids Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food hydrocolloids**, 2011, v. 25, n. 8, p. 1853–1864.
- FOX, P. F. et al. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2. ed. Ireland: [s.n.].
- FRYDENBERG, R. P. et al. Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. **Food Chemistry**, 2016, v. 192, p. 415–423.

- GARCIA-GONZALEZ, L. et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. **International Journal of Food Microbiology**, 2007, v. 117, n. 1, p. 1–28.
- GILLESPIE, A. L. et al. Whey proteins have beneficial effects on intestinal enteroendocrine cells stimulating cell growth and increasing the production and secretion of incretin hormones. **Food Chemistry**, 2015, v. 189, p. 120–128.
- GUTIÉRREZ-MAGDALENO, G. et al. Ligand binding and self-association cooperativity of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Molecular Recognition**, 2013, v. 26, n. 2, p. 67–75.
- HOFLAND, G. W. et al. Isoelectric Precipitation of Casein Using High-Pressure CO<sub>2</sub>. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 1999, v. 38, n. 12, p. 4919–4927.
- HOLTZER, M. E.; HOLTZER, A.  $\alpha$ -Helix to Random Coil Transitions: Determination of Peptide Concentration from the CD at the Isodichroic Point. **Biopolymers**, 1992, v. 10, p. 1675–1677.
- HOTCHKISS, J. H.; LOSS, C. R. **Carbon dioxide as an aid in pasteurization**, 2006., v. 2, p. 5-6.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: A possible mechanism. **Journal of Dairy Research**, 2004, v. 71, p. 489–495.
- JAIN, J. L. Protein Classification. In: **Fundamentals of Biochemistry**. Sixth ed. Saharanpur: [s.n.], 2005, p. 205–213.
- JENAB, E. et al. Enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides: The effect of process parameters, kinetics, foam architecture, and product characterization. **Journal of Food Engineering**, 2018, v. 222, p. 63–72.
- JOHNSON, W. C. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, 1990, v. 7, n. 3, p. 205–214.
- JOKIĆ, S. et al. SC-CO<sub>2</sub> extraction of *Vitex agnus-castus* L. fruits: The influence of pressure, temperature and water presoaking on the yield and GC–MS profiles of the extracts in comparison to the essential oil composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2017, v. 123, p. 50–57.
- JONAS, J. High-resolution nuclear magnetic resonance studies of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 2002, v. 1595, n. 1–2, p. 145–159.

- KALAIVANI, S.; REGUPATHI, I. Synergistic extraction of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization. **Separation And Purification Technology**, 2015, v. 146, p. 301–310.
- KONRAD, G.; KLEINSCHMIDT, T. A new method for isolation of native  $\alpha$ -lactalbumin from sweet whey. **International Dairy Journal**, 2008, v. 18, p. 47–54.
- KUMAR, P. et al. Perspective of Membrane Technology in Dairy Industry: A Review, **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 2013, v. 26, n. 9, p. 1347–1358.
- LEE, A.; HONG, Y. Coacervate formation of  $\alpha$ -lactalbumin–chitosan and  $\beta$ -lactoglobulin–chitosan complexes. **Food Research International**, 2009, v. 42, n. 5–6, p. 733–738.
- LEHNINGER, A. **Principles of Biochemistry**, 2012, 6<sup>a</sup> ed. New York: Susan Winslow.
- LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. [s.l: s.n.], 1998, v. 38.
- LIU, G. et al. Bioresource Technology High titer L -lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. **Bioresource Technology**, 2015, v. 198, p. 803–810.
- LUCENA, M. E. et al. Alfa-Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. **Separation and Purification Technology**, 2007, v. 52, p. 446–453.
- LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: [s.n.].
- MACWAN, S. R. et al. Whey and its Utilization. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2016, v. 5, n. 8, p. 134–155.
- MALHOTRA, G. Batch vs. Continuous Processing: A Choice. **Pharmaceutical processing**, 2005.
- MARCINIAK, A. et al. The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction, **Green Chemistry**, 2018.
- MARTÍNEZ-MAQUEDA, D. et al. **Fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion**. Boston, MA: Springer US, 2013, 21-51.
- MARTINEZ, M. J. et al. Reduced beta-lactoglobulin IgE binding upon in vitro digestion as a result of the interaction of the protein with casein glycomacropeptide. **Food Chemistry**, 2016, v. 192, p. 943–949.

- MINKIEWICZ, P. et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide and characterization of isolated fractions. **Journal of Chromatography A**, 1996, v. 743, n. 1, p. 123–135.
- NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5° ed. Porto Alegre: [s.n.], 2011, p. 1273.
- NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Segunda ed. Campinas: [s.n.], 2001, p. 412.
- O'LOUGHLIN, I. B. et al. Concentrated whey protein ingredients: A Fourier transformed infrared spectroscopy investigation of thermally induced denaturation. **International Journal of Dairy Technology**, 2015, v. 68, n. 3, p. 349–356.
- PANGHAL, A. et al. Whey valorization: current options and future scenario – a critical review. **Nutrition & Food Science**, 2018, v. 48, n. 3, p. 520–535.
- PARIMAL, P.; JAYATO, N. Development and analysis of a sustainable technology in manufacturing acetic acid and whey protein from waste cheese whey. **Journal of Cleaner Production**, 2016, v. 112, n. 1, p. 59–70.
- PERINELLI, D. R. et al. Lactose oleate as new biocompatible surfactant for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2018, v. 124, p. 55– 62.
- POLVERINO DE LAURETO, P. et al. Molten globule of bovine alpha-lactalbumin at neutral pH induced by heat, trifluoroethanol, and oleic acid: A comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**. 2002, v. 49, n. 3, p. 385–397.
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, 2012, v. 110, p. 48–68.
- PRITCHARD, S. R.; KAILASAPATHY, K. **Chemical , Physical , and Functional Characteristics of Dairy Ingredients**. 1<sup>a</sup> ed. Ames: Wiley Blackwell, 2011.
- QI, X. L. et al. Effect of temperature on the secondary structure of b-lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. **Biochem. J.**, 1997, v. 346, p. 341–346.
- RAJENDRAN, K. et al. Bioresource Technology A novel process simulation model (PSM) for anaerobic digestion using Aspen Plus. **Bioresource Technology**, 2014, v. 168, p. 7–13.

- REBOUILLAT, S.; ORTEGA-REQUENA, S. Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, 2015, v. 06, n. 03, p. 176–203.
- REDINGTON, J. et al.  $\alpha$ -Lactalbumin: of camels and cows. **Protein & Peptide Letters**. 2016, v. 23, n. 12, p. 1072–1080.
- ROCHA, R. A. DA. **Combinação das técnicas de precipitação ácida e complexação para obtenção de frações enriquecidas de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do isolado proteico de soro de leite**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- SANTOS, M. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fractionation of the major whey proteins and isolation of  $\beta$ -Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography. **Separation and Purification Technology**, 2012, v. 90, p. 133–139.
- SAVA, N. et al. The Kinetics of Heat-Induced Structural Changes of  $\beta$ -Lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, 2005, v. 88, n. 5, p. 1646–1653.
- SCHABER, S. D. et al. Economic Analysis of Integrated Continuous and Batch Pharmaceutical Manufacturing: A Case Study. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2011, v. 50, n. 17, p. 10083–10092.
- SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. Springer S ed. [s.l: s.n.], 2013, p. 380.
- SINGH, R.; IERAPETRITOU, M.; RAMACHANDRAN, R. An engineering study on the enhanced control and operation of continuous manufacturing of pharmaceutical tablets via roller compaction. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012, v. 438, n. 1–2, p. 307–326.
- SLUKOVA, M. et al. Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation. **Journal of Food Engineering**, 2016, v. 172, p. 38–47.
- SMITH, K. **Current and Future Processing of Whey Ingredients** Wisconsin Center for Dairy Research “Solution Based Research Backed by Experience, Passion and Tradition”, 2014. Disponível em: <http://oregondairy.org/wp-content/uploads/2014/04/4-2014-ODI.pdf>
- SPIILIMBERGO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A. Microbial inactivation by highpressure, 2002, v. 22, p. 55–63.
- TOMASULA, P. M. et al. Preparation of Casein Using Carbon Dioxide. **Journal of Dairy Science**, 1995, v. 78, n. 3, p. 506–514.

- TOMASULA, P. M. et al. Preparation of enriched fractions of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from cheese whey using carbon dioxide. **Journal of Food Processing and Preservation**, 1998, v. 22, n. 6, p. 463–476.
- TORO-SIERRA, J.; TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin from Whey Protein Isolate Using Selective Thermal Aggregation, an Optimized Membrane Separation Procedure and Resolubilization Techniques at Pilot Plant Scale. **Food Bioprocess Technology**, 2013, v. 6, p. 1032–1043.
- TURTON, R. et al. **Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes**. fourth ed. New Jersey: Prentice Hall, 2012.
- WILES, C.; WATTS, P. Continuous process technology: a tool for sustainable production. **Green Chemistry**, 2014, v. 16, n. 1, p. 55–62.
- WIT, J. N. DE. Thermal behaviour of bovine  $\beta$ -lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2009, v. 20, p. 27–34.
- YADAV, J. S. S. et al. Recovery of residual soluble protein by two-step precipitation process with concomitant COD reduction from the yeast-cultivated cheese whey. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2014, v. 37, n. 9, p. 1825–1837.
- YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein , functional / nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, 2015, v. 33, n. 6, p. 756–774.
- YVER, A. L. et al. Fractionation of Whey Protein Isolate with Supercritical Carbon Dioxide—Process Modeling and Cost Estimation. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011, v. 13, n. 1, p. 240–259.
- ZANETTE, A. F. et al. Vapor–Liquid Equilibrium Data for Carbon Dioxide + ( R , S )-1,2Isopropylidene Glycerol (Solketal) + Oleic Acid Systems at High Pressure. **Journal of Chemical & Engineering Data**, 2014, v. 59, n. 5, p. 1494–1498.

## MATERIAL COMPLEMENTAR

Tabela 1. Preparação dos géis de separação e empilhamento.

Solvente / Reagente	Gel de separação (12% acrilamida)	Gel de empilhamento (4% acrilamida)
H <sub>2</sub> O	5,10 mL	3,075 mL
1,5 M Tris-HCl	(pH 8,8) 3,75 mL	(pH 6,8) 1,25 mL
20% SDS	75 µL	0,025 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0,8%)	6 mL	0,67 mL
10% persulfato de amônia (APS)	75 µL	0,025 mL
TEMED	10 µL	0,005 mL
Total	15 mL	5 mL

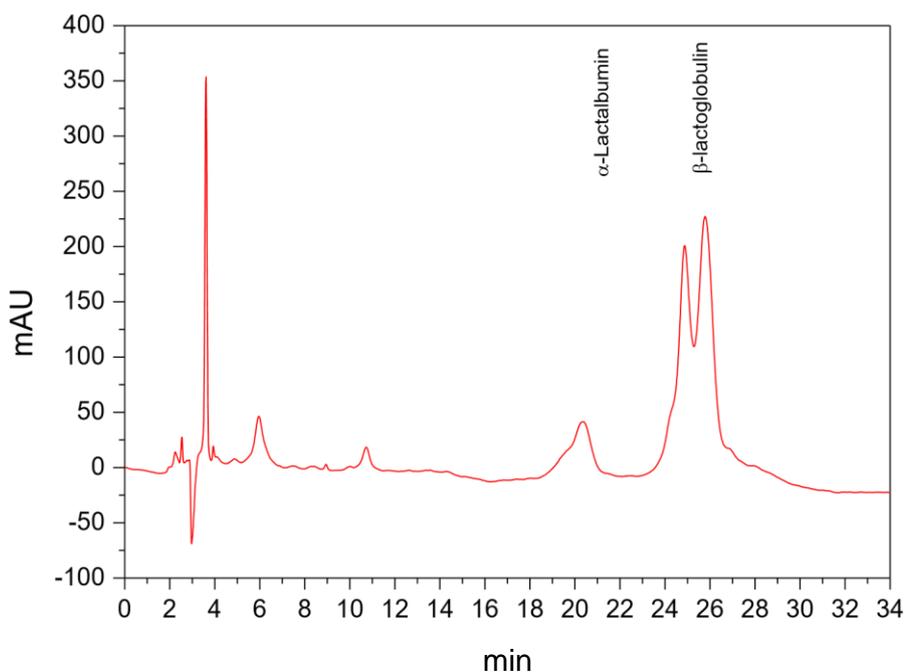


Figura A. Perfil cromatográfico da corrente rica em  $\beta$ -Lg na quantificação das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg obtidas na reação supercrítica. Variáveis utilizadas: P = 8 MPa e T = 55 °C.

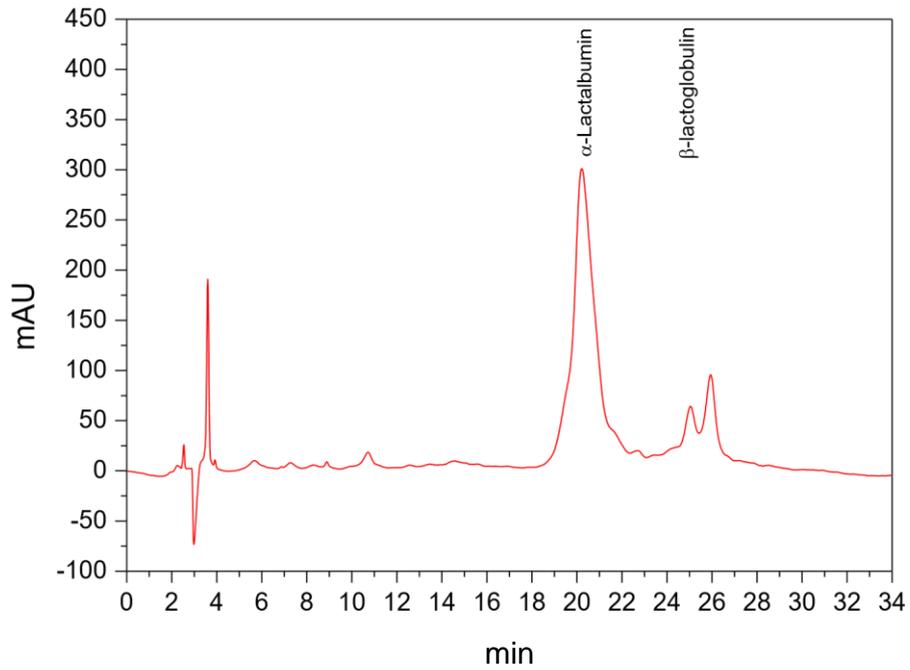


Figura B.  $\alpha$ -La na quantificação das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg obtidas na reação supercrítica. Variáveis utilizadas: P = 8 MPa e T = 55 °C.

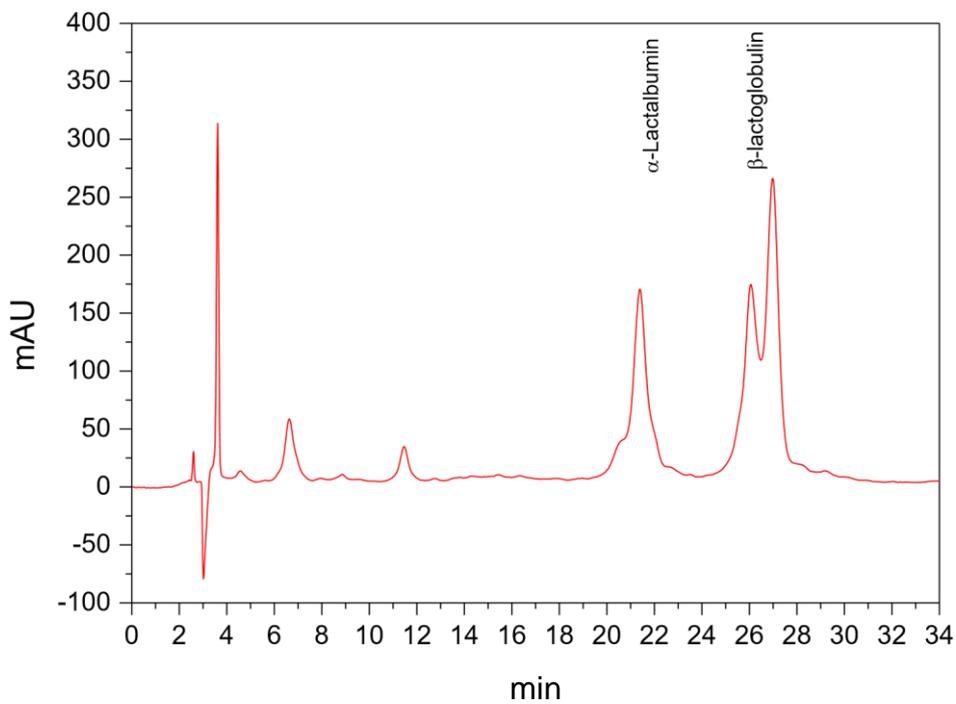


Figura C. Perfil cromatográfico do WPI inicial na quantificação das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg.

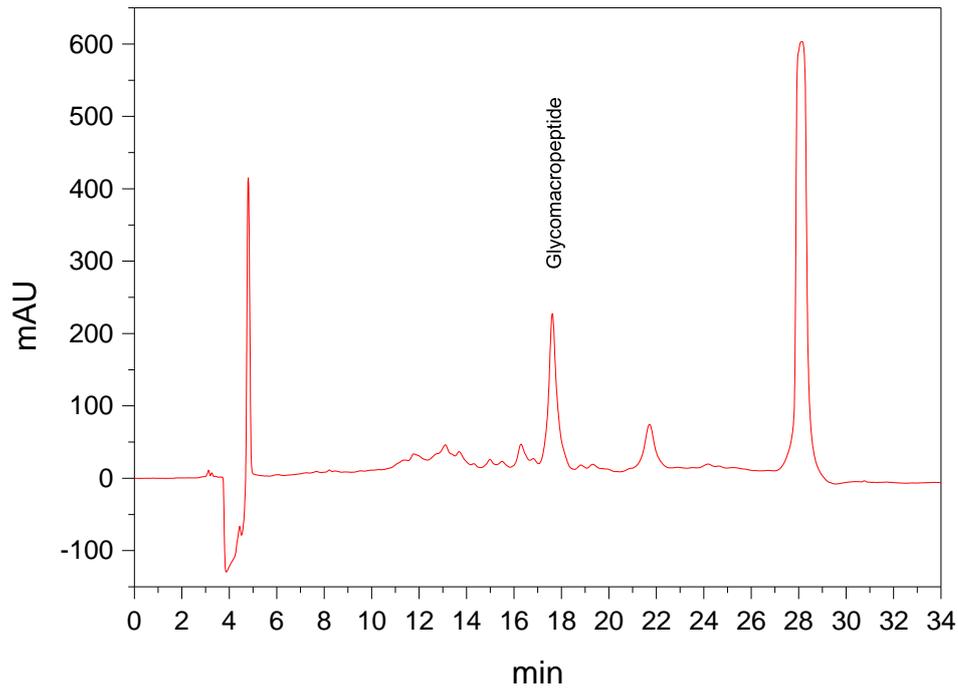


Figura D.  $\beta$ -Lg na quantificação de GMP obtida na reação supercrítica. Variáveis utilizadas: P = 8 MPa e T = 55 °C.

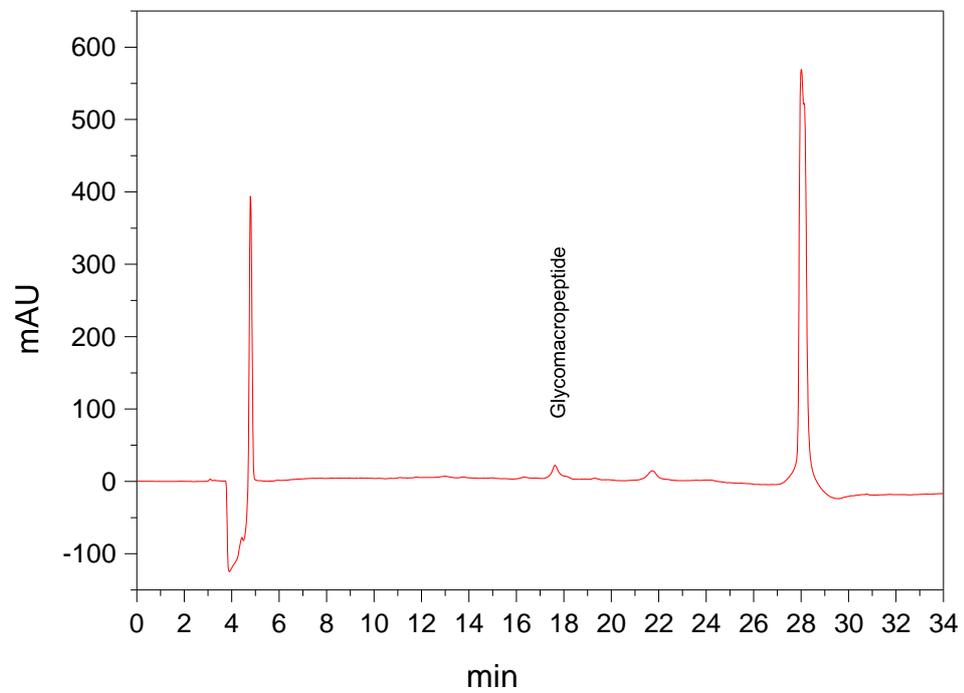


Figura E.  $\alpha$ -La na quantificação de GMP obtida na reação supercrítica. Variáveis utilizadas: P = 8 MPa e T = 55 °C.

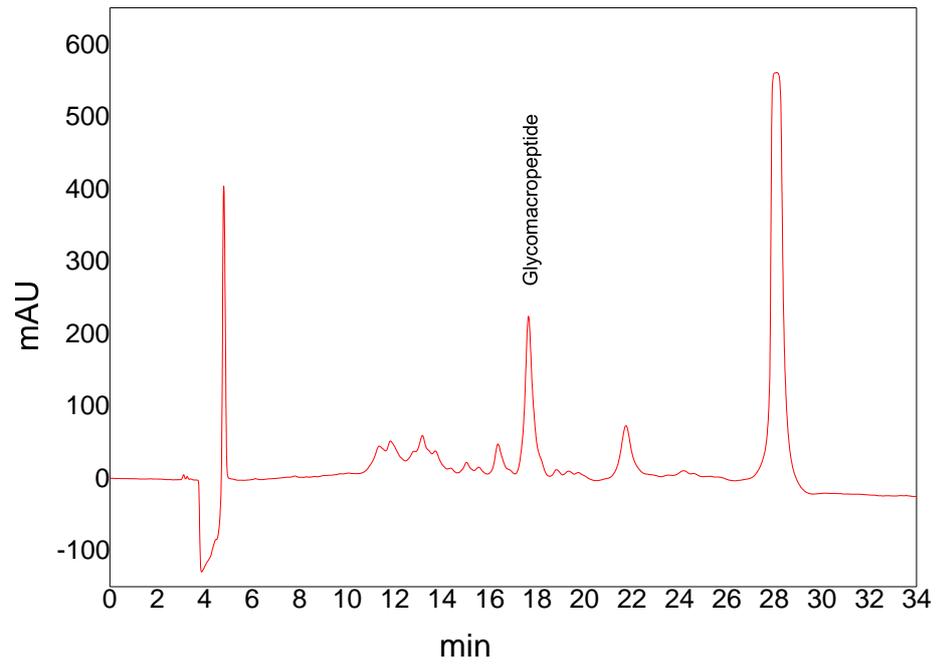


Figura F. Perfil cromatográfico do WPI inicial na quantificação de GMP.