

**Concentração e Purificação de Extratos de Flor
de Cardo (*Cynara cardunculus*, L.), por
Ultrafiltração.
Caracterização Química e Molecular dos
Concentrados como Agentes Coagulantes no
Fabrico de Queijo.**

ANDRÉ RODRIGUES CABRITA
(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, na Área de
Especialização de Processos Químicos

Orientadores:

Doutor Paulo Jorge Ferreira Cameira dos Santos
Doutor Luís Miguel Minhalma

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho

Vogais:

Doutora Ana Sofia de Oliveira Figueiredo
Doutora Ana Maria G.H. Barreiros Joanaz de Melo
Doutor Paulo Jorge Ferreira Cameira dos Santos

Novembro de 2024

**Concentração e Purificação de Extratos de Flor de
Cardo (*Cynara cardunculus*, L.), por Ultrafiltração.
Caracterização Química e Molecular dos
Concentrados como Agentes Coagulantes no
Fabrico de Queijo.**

ANDRÉ RODRIGUES CABRITA
(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, na Área de
Especialização de Processos Químicos

Orientadores:

Doutor Paulo Jorge Ferreira Cameira dos Santos, INIAV
Doutor Luís Miguel Minhalma, ISEL/IPL

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho, ISEL/IPL

Vogais:

Doutora Ana Sofia de Oliveira Figueiredo, ISEL/IPL
Doutora Ana Maria G.H. Barreiros Joanaz de Melo, ISEL/IPL
Doutor Paulo Jorge Ferreira Cameira dos Santos, INIAV

Novembro de 2024

Declaração de integridade

Declaro que esta(e) dissertação é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

O autor

André Rodrigues Cabrita

Lisboa, de de

Agradecimentos

A jornada para a realização desta tese foi um período de desenvolvimento, não só no campo académico, mas também no campo pessoal. Este trabalho reflete o esforço conjunto de várias pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este projeto se tornasse realidade. A todas elas, a minha gratidão sincera.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Miguel Minhalma e Dr. Paulo Cameira dos Santos, pelo apoio, paciência e orientação fundamentais em todas as etapas deste trabalho. A sua dedicação e o seu conhecimento foram essenciais para o desenvolvimento desta investigação e para o meu crescimento académico. Agradeço também aos demais professores do todo o meu percurso académico, que contribuíram com as suas aulas e compartilharam sua experiência.

Ao INIAV e todos os constituintes desta instituição que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, mais especificamente ao Prof. Dr. Nuno Alvarenga e às Técnicas superiores Sandra Santos e Manuela Lagareiro pela orientação e apoio na compreensão do processo e coagulação e as análises químicas do extrato.

À minha família, dedico um agradecimento especial por todo o suporte incondicional, paciência e compreensão ao longo deste percurso. Sem o incentivo e o carinho de todos, completar essa etapa não teria sido possível. Em especial, agradeço à minha namorada Mariana Matos, aos meus pais Mário Cabrita e Sandra Cabrita e ao meu irmão João Cabrita que sempre acreditaram no meu potencial e incentivaram-me a seguir em frente, mesmo nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus amigos, que entenderam as minhas ausências e me apoiaram de todas as formas, sou imensamente grato. Vocês foram e continuam a ser uma fonte de motivação e alegria.

Por fim, agradeço a todas as instituições e pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, seja oferecendo estrutura, apoio financeiro ou intelectual. Este trabalho é, sem dúvida, um resultado coletivo de um grande esforço e dedicação.

A todos, o meu muito obrigado!

Divulgação Científica

- ❖ Apresentação Oral na conferência "XV Meeting of Young Chemical Engineers" realizada em Zagreb, Croácia
- ❖ Apresentação Oral e Apresentação por Poster na conferência " 10º Forum de Engenharia Química e Biológica" realizada em Lisboa, Portugal
- ❖ Apresentação por Poster na conferência "IDF Cheese Science & Technology Symposium 2024" realizada em Bergen, Noruega
- ❖ Apresentação por Poster na conferência "7º Simpósio de Produção, Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável" realizada em Oeiras, Portugal
- ❖ Apresentação Oral na conferência "The 3rd International Conference on Materials and Nanomaterials" realizada em Lisboa, Portugal
- ❖ Submissão de uma Patente referente ao processo estudado neste trabalho.

Resumo

A flor da planta *Cynara cardunculus* L., também conhecida como cardo, é utilizada tradicionalmente como agente coagulante para a produção de queijos tradicionais portugueses, com a designação de origem protegida (DOP). Apesar da sua vasta utilização, o processo para a obtenção do extrato, assim como a colheita da flor, ainda é realizado de forma artesanal, originado a falta de homogeneidade nos estratos obtidos.

Para solucionar tal problema, neste trabalho propôs-se a utilização de membranas de ultrafiltração de acetato de celulose para a obtenção de um extrato de flor de cardo reproduzível utilizando técnicas de concentração e diafiltração.

Após os ensaios de permeação realizados foi comprovado que é possível utilizar uma membrana de acetato de celulose com um limite de exclusão molecular de 52155 Da para obter um concentrado, através do ensaio de concentração, e um retentado, através do ensaio de diafiltração, sem perdas significativas de atividade coagulante. No caso do concentrado foi possível concentrar a atividade coagulante a um fator de concentração de 5.

Por outro lado, também foi possível verificar que, tanto o processo de concentração como o de diafiltração, resultam numa alteração no perfil químico do extrato, possibilitando assim a alteração do mesmo, sem comprometer a sua atividade coagulante, que por sua vez, poderá ser utilizado para a obtenção de um extrato de cardo padrão, que não seja influenciado pelas diferenças dos diferentes conjuntos de plantas utilizados à partida.

Em suma foi possível criar dois processos simples que permitem tanto a concentração do extrato de cardo como a obtenção de um extrato padronizado que não dependa das condições da matéria-prima inicial.

Palavras-chave: *Cynara cardunculus* L., Cardo, membrana, acetato de celulose, concentração, diafiltração

Abstract

The *Cynara cardunculus* L. plant, also known as thistle, is traditionally used as a coagulating agent to produce traditional Portuguese cheeses, classified as Protected Designation of Origin cheeses.

Despite its widespread use, the process for obtaining the extract, as well as the harvesting of the flower, is still carried out by hand, resulting in a lack of homogeneity in the extract obtained.

To solve this problem, acetate ultrafiltration membranes were used to obtain a reproducible thistle extract using concentration and diafiltration techniques.

The permeation experiments shown that it is possible to use a cellulose acetate membrane with a molecular weight cut-off of 52155 Da to obtain a concentrate, through a concentration experiment, and a retentate, through a diafiltration experiment, without significant losses of coagulant activity. In the case of the concentrate, it was possible to concentrate the coagulant activity at a concentration factor of 5.

On the other hand, it was also possible to verify that both the concentration and diafiltration processes result in changes in the chemical profile of the extract, thus enabling its alteration, without compromising its coagulant activity, which in turn, can be used to obtain a standard thistle extract, which is not influenced by the differences in the different batches of plants used.

In short, it was possible to create two simple processes that allow both the concentration of the thistle extract and the obtaining of a standardized extract that does not depend on the state of the initial raw material.

Keywords: *Cynara cardunculus* L., Thistle, membrane, cellulose acetate, concentration, diafiltration

Índice

1	- Introdução	1
1.1	História do Queijo	2
1.2	Importância do Queijo na sociedade.	3
1.3	O leite.....	3
1.4	A caseína	4
1.5	Agentes coagulantes	5
1.5.1	Coagulantes de origem animal	5
1.5.2	Coagulantes de origem microbiana	5
1.5.3	Coagulantes de origem vegetal	6
1.6	Técnicas de caracterização química dos extratos	9
1.6.1	Métodos de Bradford para a determinação de proteínas totais.....	10
1.6.2	Método de Folin-Ciocalteu para a determinação de compostos fenólicos totais.....	10
1.6.3	Atividade coagulante ao Leite (MCA).....	12
1.7	Membranas	14
1.8	Classificação das Membranas.....	15
1.8.1	Membranas Homogêneas	16
1.8.2	Membranas Microporosas	16
1.8.3	Membranas Simétricas.....	16
1.8.4	Membranas Assimétricas	16
1.8.5	Classificação dos Processos de Membranas.....	18
1.9	Membranas de Acetato de Celulose.....	19
1.10	Método de Inversão de Fases	20
1.11	Processos de Membranas - Força Motriz é o Gradiente de Pressão	20
1.12	. Caracterização de Membranas.....	22
1.12.1	Permeabilidade Hidráulica (Lp).....	22
1.12.2	Coeficientes de Rejeição Aparente e Intrínseco	23
1.12.3	Limite de Exclusão Molecular (MWCO)	23
1.13	Membranas na Indústria alimentar	24
1.14	Membranas na indústria dos laticínios.....	25
2	- Metodologia Experimental	26
2.1	Preparação das Membranas de Acetato de Celulose.....	27

2.2	Metodologias de Caracterização de Membranas	28
2.2.1	Permeabilidade Hidráulica	28
2.2.2	Rejeição aos sais	29
2.2.3	Limite de Exclusão Molecular (MWCO)	30
2.3	Preparação do Extrato de <i>Cynara cardunculus</i>	31
2.4	Ensaio de Seleção de membrana e Pressão	32
2.5	Ensaio de Concentração	33
2.6	Ensaio de Diafiltração.....	33
2.7	Caracterização Química do Extrato	34
2.7.1	Atividade Coagulante	34
2.7.2	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais	35
2.7.3	Determinação das proteínas totais	36
3	– Resultados e Discussão	37
3.1	Caracterização das Membranas de Acetato de Celulose	38
3.1.1	Determinação das Permeabilidades Hidráulicas.....	38
3.1.2	Determinação dos Coeficientes de Rejeição Aparente aos Sais.....	39
3.1.3	Determinação dos Limites de Exclusão Molecular.....	39
3.2	Curvas de calibração dos métodos analíticos.....	40
3.2.1	Curva de calibração da atividade coagulante ao leite	40
3.2.2	Curva de calibração do método de Folin-Ciocalteu.....	44
3.2.3	Curva de calibração do método de Bradford.....	45
3.3	Estudo da Seleção da Membrana e da Pressão de Operação.	46
3.4	Ensaio de Concentração	51
3.5	Ensaio de Diafiltração.....	57
4	– Conclusões.....	63
5	– Bibliografia.....	66
6	– Anexos.....	74

Índice de Figuras

Figura 1.5-1 - Estrutura tridimensional da cardosina A (a) e da cardosina B (b).....	9
Figura 1.7-1 - Esquema simplificado da separação através de uma membrana	14
Figura 1.7-2 -Esquema simplificado da filtração frontal (a) e tangencial (b)	15
Figura 1.9-1 - Número de publicações para a pesquisa " <i>cellulose acetate membrane</i> " no scopus (23 de janeiro de 2022)	19
Figura 1.11-1 - Representação esquemática do fenómeno da polarização de concentração, na superfície das membranas.....	22
Figura 2.1-1 - Esquema do procedimento de produção de membranas pelo método de inversão de fases.....	27
Figura 2.2-1 - Módulo de filtração	28
Figura 2.3-1 - Esquema da preparação dos extratos de cardo.....	32
Figura 2.7-1 - Esquema dos ensaios de determinação da atividade coagulante ao leite	35
Figura 3.1-1 - Gráfico da permeabilidade hidráulica para a membrana CA-22.....	38
Figura 3.1-2 - Gráfico da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-22	40
Figura 3.2-1 - Curva de calibração para a determinação do tempo de coagulação do leite para diferentes coeficientes de rejeição aparentes	43
Figura 3.2-2 - Gráfico da curva de calibração do método de Folin-Ciocalteu	44
Figura 3.2-3 - Gráfico da curva de calibração do método de Bradford	45
Figura 3.3-1 - Fluxos de Permeado com água e com o extrato de cardo para as diferentes membranas	46
Figura 3.3-2 - Coeficiente de rejeição aparente ao TPC para as diferentes membranas	47
Figura 3.3-3 - Coeficiente de rejeição aparente às Proteínas para as diferentes membranas.....	48
Figura 3.3-4 - Coeficiente de rejeição aparente ao TOC para as diferentes membranas	48
Figura 3.3-5 - Variação do fluxo de permeado com água e com o extrato de flor de cardo, para a membrana CA-31, a diferentes pressões de funcionamento.....	50
Figura 3.4-1 - Fluxo de permeado ao longo do tempo, no ensaio de concentração	51
Figura 3.4-2 - Fluxo de permeado em relação do F_c , no ensaio de concentração	52
Figura 3.4-3 - Resultados do TPC do ensaio de concentração	53

Figura 3.4-4 - Resultados do TP do ensaio de concentração.....	53
Figura 3.4-5 - Resultados do TOC do ensaio de concentração.....	54
Figura 3.4-6 - Resultados da MCA do ensaio de concentração	54
Figura 3.4-7 - Resultados da Rz do ensaio de concentração	56
Figura 3.5-1 - Fluxo de permeado em função do fator de diafiltração, no ensaio de diafiltração	57
Figura 3.5-2 - Fluxo de permeado em função do tempo, no ensaio de diafiltração	58
Figura 3.5-3 - Resultados do TPC do ensaio de diafiltração	59
Figura 3.5-4 - Resultados do TP do ensaio de diafiltração.....	59
Figura 3.5-5 - Resultados do TOC do ensaio de concentração.....	60
Figura 3.5-6 - Resultados da MCA do ensaio de diafiltração.....	60
Figura 3.5-7 - Resultados da Rz do ensaio de diafiltração	62

Índice de Tabelas

Tabela 1.3-1 - Composição do leite (%).....	4
Tabela 1.4-1 - Diferentes moléculas de caseína presente no leite, assumindo uma concentração total de proteínas de 36 g.L ⁻¹	4
Tabela 1.5-1 - Diferentes fontes de enzimas coagulantes de origem vegetal.....	7
Tabela 1.5-2 - Atividade coagulante ao leite de protéases aspárticas da flor de cardo .	8
Tabela 1.6-1 - Reagentes utilizados na norma ISO23058/IDF199:2006	13
Tabela 1.8.5-1 - Classificação quanto ao processo.....	18
Tabela 2.1-1 - Composição das <i>casting solutions</i>	27
Tabela 2.2-1 - Soluções utilizadas (X) para a determinação do MWCO das diferentes membranas.....	30
Tabela 3.1-1 - Permeabilidade Hidráulica das membranas caracterizadas	38
Tabela 3.1-2 - Resultados dos coeficientes de rejeição aparente aos sais	39
Tabela 3.1-3 - Limites de exclusão molecular das membranas caracterizadas	40
Tabela 3.2-1 - Volumes utilizados para a realização das diluições necessárias para a determinação da curva de calibração da atividade coagulante do leite	41
Tabela 3.2-2 - Tempos médios de coagulação obtidos, para os diferentes fatores de diluição utilizados.....	41
Tabela 3.2-3 - Valores utilizados para a obtenção da curva de calibração da atividade coagulante do leite.....	43
Tabela 3.2-4 - Valores de absorbância obtidos para os diferentes padrões utilizados no método de Folin-Ciocalteu	44
Tabela 3.2-5 - Valores de absorbância obtidos para os diferentes padrões utilizados no método de Bradford	45
Tabela 3.3-1 - Coeficiente de rejeição aparente à MCA para as diferentes membranas	49
Tabela 3.3-2 - Coeficiente de rejeição aparente à MCA para a membrana CA-31, a diferentes pressões de funcionamento	50

Lista de abreviaturas

- α_{ref} – Atividade coagulante ao leite do agente coagulante padrão
- α_t – atividade coagulante ao leite do agente coagulante testado
- ΔP – Diferença de pressão aplicada
- $\Lambda_{amostra}$ – Condutividade da amostra
- A – Área de filtração
- AC – Acetato de cellulose
- AW – Soro de leite ácido
- b – Ordenada na origem da reta
- BCA – Albumina do Soro bovino
- C_A - Concentração de enzimas coagulantes do leite da alimentação
- C_{A0} – Concentração do soluto A na alimentação
- C_{Am} – Concentração do soluto A na membrana
- C_{AP} – Concentração do soluto A no permeado
- C_{APa} – Concentração de enzimas coagulantes do leite do extrato de cardo padrão
- C_{NaCl} – Concentração de Cloreto de Sódio
- $C_{Na_2SO_4}$ – Concentração de Sulfato de Sódio
- CBO₅ – carência bioquímica de oxigênio
- CS – *Casting solution*
- d – Fator de diluição do agente coagulante testado
- D – Dialise
- DOP – Denominação de Origem Protegida
- ED – Eletrodialise
- EU – União Europeia
- EUA – Estados Unidos da América
- F_C – Fator de Concentração
- F_D – Fator de Diafiltração
- FC – Folin-Ciocalteu
- FD – Folin-Denis
- f – Coeficiente de rejeição aparente
- f_A – coeficiente de rejeição aparente
- f'_A – Coeficiente de rejeição intrínseco ao soluto A
- f_{MCA} – Coeficiente aparente de rejeição à atividade coagulante de leite
- HPLC – Cromatográfica líquida de alta resolução
- IDF – Federação internacional de laticínios
- IMCU – Unidade internacional de coagulação do leite

ISO – Organização internacional de normalização
 J_p – Fluxo de permeado
 L_p – Permeabilidade hidráulica da membrana
Leu – Leucina
m – Declive da reta
 m_p – Massa de permeado recolhido
MCA – Atividade coagulante ao leite
Met – Metionina
MF – microfiltração
MW – Peso molecular
MWCO – Limite de exclusão molecular
 n_A – Fator de diluição da alimentação em relação ao extrato de cardo padrão
 n_p – Fator de diluição do permeado em relação ao extrato de cardo padrão
NF – Nanofiltração
OR – Osmose Reversa
PEG – Polietilenoglicol
PG – Permeação de gases
Phe – Fenilalanina
PL – Fase pobre em polímero
PR – Fase rica em polímero
PV – Pervaporação
Ser – Serotonina
SW – Soro do leite doce
t – Tempo de recolha do permeado
 t_t – Tempo de floculação do agente coagulante testado
 t_{ref} – tempo de floculação do agente coagulante padrão
TP – Proteína total
TPC – Compostos fenólicos totais
TOC – Carbono orgânico total
Tyr – Tirosina
UF – Ultrafiltração
Val – Valina
WP – Soro do leite em pó

1 - Introdução

1.1 História do Queijo

O queijo tem feito parte da alimentação humana há milhares de anos, sendo difícil determinar com precisão quando começou a ser fabricado. No entanto, há relatos do consumo deste produto desde 7000 a.C., além de evidências arqueológicas na Mesopotâmia, região entre os rios Tigre e Eufrates, que indicam a presença de queijos feitos do leite de vaca e cabra datados de 6000 a.C. No Antigo Egito, murais mostram a produção de queijo, e a Bíblia menciona o consumo deste produto no Antigo Testamento.^{1,2}

Segundo a lenda, o queijo foi descoberto por um nómade árabe durante uma das suas viagens pelo deserto. Ele carregava leite em um cantil feito de estômago seco de carneiro. Quando foi beber o leite, encontrou um produto sólido e saboroso.¹ Essa transformação ocorreu devido à combinação de diversos fatores, como a flora natural do leite, as enzimas das glândulas do estômago do carneiro, a alta temperatura e o movimento do nómade durante a viagem.³ Vale denotar que o queijo primitivo era produzido apenas pela coagulação do leite, sem adição de sal.⁴

Logo após a descoberta do queijo, percebeu-se que ele tinha uma vida útil maior que a do leite, tornando-se um alimento essencial na dieta diária das populações.²

Durante o Império Romano, as técnicas de fabricação e maturação dos queijos foram aprimoradas. Na Idade Média, a produção de queijos ficou concentrada nos mosteiros católicos, onde monges cristãos desenvolveram inúmeras receitas, algumas das quais ainda são utilizadas hoje.¹

Com o passar dos séculos, as etapas da produção de queijo foram evoluindo. Em 1267, foi fundada na França a primeira "fruitière" (precursora das cooperativas de laticínios), onde eram produzidos queijos como Beaufort, Emmental e Comté.¹ No entanto, a produção em massa de queijo só começou no século XIX, com a inauguração de uma fábrica em Nova Iorque (EUA). Na Europa, a primeira grande queijaria foi aberta na França no século XX.⁴

Atualmente, existem mais de 1000 tipos de queijos no mundo, resultando da diversidade de matérias-primas, etapas de produção e tempos de maturação.¹

1.2 Importância do Queijo na sociedade.

O valor nutricional do queijo depende das características do leite e as condições de fabrico do queijo, obtendo-se propriedades nutricionais únicas e distintas para cada tipo de queijo. Embora o queijo apresente algumas propriedades nutricionais que são entendidas como sendo negativas para a saúde humana, tais como um aumento no risco de doenças cardiovasculares, não parece haver evidências de que a ingestão de queijo exerça efeitos prejudiciais sobre a saúde cardiovascular. Pelo contrário, o queijo tem sido associado a várias propriedades benéficas para a saúde, tais como anti-hipertensivas e anticancerígenas.⁵

O queijo é um produto muito dinâmico, mudando a sua textura e composição química e microbiológica durante todo o processamento.⁶ A textura e o sabor são importantes parâmetros de qualidade que determinam a identidade de um queijo, e que afetam enormemente a sua preferência e aceitação pelo consumidor. O desenvolvimento das características sensoriais é muito afetado pela composição do leite, coagulação, fresagem, pressão ascendente, extensão e condições de amadurecimento.⁷

1.3 O leite

O leite é uma solução aquosa de uma mistura de biomoléculas, que difere consoante a espécie que dá origem ao mesmo. Devido à sua vasta utilidade como alimento e matéria-prima surgiu a necessidade de definir o mesmo. Em 1909, o Congresso Internacional da Repressão das Fraudes definiu o leite como o produto integral da ordenha total e ininterrupta de uma fêmea leiteira em boas condições de saúde, bem alimentada e não fatigada, devendo ser recolhido de forma asseada e não conter colostro.⁸ Este foi também definido por Vieira de Sá & Barbosa como um líquido branco, opaco, com sabor ligeiramente adocicado e odor suave, mais viscoso que a água e composição variável de acordo com a espécie, raça, indivíduo, com a alimentação e o tempo de gestação, entre outros fatores.⁹

Dito isto é possível visualizar na tabela 1.3-1 a composição típica de diferentes leites.¹⁰

Tabela 1.3-1 - Composição do leite (%m/m) ¹⁰

Composição média do leite	Espécie			
	Vaca	Cabra	Ovelha	Humano
Água (%)	87.2	87.0	80.71	87.43
Proteína (%)	3.50	3.52	5.23	1.63
Gordura (%)	3.70	4.25	6.80	3.75
Lactose (%)	4.90	4.27	4.81	6.98
Cinzas (%)	0.70	0.86	0.90	0.21

Dentro destes grandes grupos de biomoléculas, as proteínas do leite são as que têm maior importância para a produção de queijo. Dito isto, cerca de 80 % de toda a fração azotada do leite é composta por caseína, a molécula principal para a coagulação do leite.

1.4 A caseína

As caseínas são definidas como o grupo de fosfoproteínas do leite que são precipitadas a pH de 4,6 e 20°C e foram separadas pela primeira vez na década de 50. Este grupo de moléculas foi encontrado utilizando eletroforese em gel de amido, sendo encontradas mais de 20 espécies diferentes.

As caseínas tendem a interagir entre si, formando “micelas de caseína” e “submicelas de caseína”. Esta formação tende a ser um processo entropicamente favorável devido à natureza hidrofóbica da caseína.

A natureza anfotérica das moléculas permite também interações eletrostáticas.

Existem quatro grandes grupos de caseínas, sendo estes a caseína α_{s1} , α_{s2} , β e κ .

É possível observar na tabela 1.4-1 algumas características das diferentes caseínas.¹¹

Tabela 1.4-1 - Diferentes moléculas de caseína presente no leite, assumindo uma concentração total de proteínas de 36 g.L⁻¹. adaptado de 11

Proteína	Concentração aproximada (g.L ⁻¹)	Massa molecular do monómero (g.mol ⁻¹)
Caseínas	28.0	-----
Caseína - α	15.4	25 000
Caseína - β	7.0	24 100
Caseína - κ	4.2	20 000

1.5 Agentes coagulantes

Para a produção do queijo, uma das etapas mais importantes é a coagulação do leite, e para tal, são utilizados diversos agentes coagulantes.

Estes agentes podem ser divididos em 3 grandes grupos, sendo estes, os coagulantes de origem vegetal, animal ou microbiana. Independentemente do agente coagulante, a coagulação do leite deve-se à lise da caseína devido à presença de enzimas proteolíticas nestes agentes.¹²

1.5.1 Coagulantes de origem animal

O coalho animal é tradicionalmente produzido pela extração do abomaso (o quarto estômago dos ruminantes), de ruminantes jovens, principalmente de vitelos. Estes coalhos contêm quimosina e pepsina em frações que dependem da idade dos animais no momento do abate e da dieta do animal. Nos produtos comerciais a quimosina varia entre 50% e 95%.¹³

A quimosina como enzima é conhecida pela sua elevada especificidade para clivar o caseinomacropéptido da caseína-j, que, por sua vez, causa a destabilização das micelas de caseína, induzindo a coagulação do leite.

No caso da pepsina, esta é muito menos específica e hidrolisa ligações de resíduos de Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr), Leucina (Leu) ou Valina (Val).¹³

Antigamente, estas enzimas de coagulação eram extraídas dos estômagos limpos e secos ao ar pelo queijeiro. Este tipo de produto ainda está disponível comercialmente, mas é utilizado quase exclusivamente para a produção de queijos tradicionais. Por exemplo, no caso do queijo Feta, os estômagos de cordeiro são macerados juntamente com diversos rários de água e sal, de seguida, são salgados mais uma vez e armazenados a uma temperatura entre 4 °C e 5 °C. No fabrico moderno, os estômagos são congelados logo a seguir ao abate do animal. O processo de extração da enzima foi descrito há muitas décadas, não tendo alterações significativas desde então. Este processo consiste na maceração do estômago seguido pela extração das enzimas, pela ativação das proenzimas com pH ácido, neutralização, clarificação do extrato, purificação e concentração. Adicionalmente foram realizados nos últimos anos avanços significativos na extração destas enzimas assistida por ultrasons.¹³

1.5.2 Coagulantes de origem microbiana

Os coagulantes microbianos têm sido utilizados como substitutos do coalho animal porque são fáceis de produzir por fermentação, o que permite uma disponibilidade ilimitada e, por conseguinte, um preço mais baixo. Além disso, não existe risco de

transmissão de doenças por ruminantes, sendo o seu uso aceite pelos vegetarianos. Os coagulantes microbianos mais utilizados são as proteases derivadas de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* e *Cryphonectria parasitica*, sendo a primeira delas, *R. miehei*, utilizada como substituto do coalho animal há quase 40 anos.¹⁴

As proteases de *C. parasitica* clivam a ligação Ser104-Phe105 na caseína-κ, enquanto *R. miehei* cliva a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Por outro lado, a maior estabilidade térmica dos derivados obtidos de *R. miehei* podem estar relacionados com proteólise excessiva, com menor tempo de maturação e queijos amargos. Os coagulantes com maior estabilidade térmica do que o coalho de vitelo devem ser evitados ou, pelo menos, a temperatura de coagulação deve ser variada para restringir a proteólise excessiva.¹⁴

As enzimas fúngicas são frequentemente produzidas em condições submersas, mas a fermentação em estado sólido também tem sido aplicada com sucesso. O farelo de trigo foi frequentemente utilizado como ingrediente principal do meio de crescimento, mas a glicose também pode servir como fonte de carbono. As condições de cultivo e os ingredientes do meio afetam fortemente a relação entre a atividade de coagulação do leite e a atividade proteolítica da enzima. Os melhores resultados foram reportados para *R. miehei* e *R. pusillus* quando a fermentação foi realizada durante 5 dias à temperatura ambiente em condições de estado sólido utilizando meio de farelo de trigo em vez de extrato de levedura/glicose ou batata/meio de dextrose.¹³

A fermentação em *fed-batch* também foi investigada pelo seu potencial para aumentar o rendimento enzimático.¹⁵

1.5.3 Coagulantes de origem vegetal

Atualmente, alguns dos melhores coalhos disponíveis são de origem microbiana. No entanto, isto não exclui o facto de existir lugar para o coalho de origem vegetal. Os coalhos vegetais têm vindo a ser objeto de crescente interesse na indústria queijeira, devido à sua fácil disponibilidade e processos de purificação simples. Há vários anos que os extratos vegetais têm sido amplamente utilizados na preparação de vários tipos de queijos artesanais produzidos principalmente nos países mediterrânicos, no sul da Europa e na África Ocidental.¹⁶

A atividade enzimática do coalho vegetal está associada principalmente à ação das proteases aspárticas ou daquelas com resíduos de serina e cisteína. De facto, a utilização de diferentes tipos de proteases vegetais na tecnologia do queijo influencia o nível de degradação da matriz proteica do leite, levando a diferenças nas propriedades sensoriais do queijo. A maioria dos coalhos vegetais produzem queijos com sabores amargos devido ao excesso de atividade proteolítica, o que limita a sua utilização industrial. Por este motivo, a seleção de um coagulante vegetal adequado e o controlo

dos diferentes parâmetros de coagulação são de grande importância para a obtenção de uma melhor qualidade do produto final.¹⁶

É possível visualizar na tabela 1.5-1 uma lista de diferentes extratos vegetais utilizados para a produção de queijo.¹⁶

Tabela 1.5-1 - Diferentes fontes de enzimas coagulantes de origem vegetal

Planta	Órgão	Tipo de enzima
<i>Cynara cardunculus</i>	Flor	Protéase aspártica
<i>Cynara scolymus</i>	Flor	Protéase aspártica
<i>Cynara humilis</i>	Flor	Protéase aspártica
<i>Silybum marianum</i>	Flor	Protéase aspártica
<i>Oryza sativa</i>	Semente	Protéase aspártica
<i>Moringa oleifera</i>	Flor	Protéase aspártica
<i>Onopordum acanthium</i>	Flor	Protéase aspártica
<i>Cirsium vulgare</i>	Flor	Protéase aspártica
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Suspensão celular	Protéase aspártica
<i>Albizia lebeck</i>	Semente	Protéase cistêmica
<i>Helianthus annuus</i>	Semente	Protéase cistêmica
<i>Ficus carica sylvestris</i>	Ramo/Latex	Protéase cistêmica
<i>Sideroxylon obtusifolium</i>	Caule/ Latex	Protéase cistêmica
<i>Actinidia chinensis</i>	Fruta	Protéase cistêmica
<i>Calotropis gigantea</i>	Latex	Protéase cistêmica
<i>Zingiber officinale</i>	Rizoma	Protéase cistêmica
<i>Bromelia hieronymi Mez</i>	Fruta	Protéase aspártica e cistêmica
<i>Solanum dubium Fresen</i>	Semente	Protéases Serínica
<i>Cucumis melo</i>	Fruta	Protéases Serínica
<i>Lactuca sativa</i>	Folha	Protéases Serínica
<i>Ficus religiosa</i>	–	Protéases Serínica
<i>Streblus asper</i>	Caule/Latex	Protéases Serínica
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Polpa da Fruta	Protéases aspártica e Serínica
<i>Citrus aurantium</i>	Flor	–

1.5.3.1 *Cynara cardunculus* L. como agente coagulante

A *Cynara cardunculus* L. é uma variedade de cardo, que cresce em zonas secas e rochosas de Portugal e em algumas outras partes da Península Ibérica. Os pistilos de flores têm sido utilizados em algumas regiões do Mediterrâneo, da África Ocidental e de países europeus como substituto natural do coalho para a produção de queijos de ovelha tradicionais.¹⁷

Espanha e Portugal têm a maior variedade e produção de queijos que utilizam este coagulante vegetal, normalmente produzidos à escala artesanal. Atualmente, o queijo de ovelha produzido com este tipo de coagulante tornou-se muito valorizado devido ao seu sabor especial e às suas propriedades organoléticas. Estes coagulantes vegetais têm outras utilizações interessantes relativamente a alvos específicos, por exemplo, a produção de queijo com estas enzimas naturais pode ser dirigida a consumidores lacto-vegetarianos e mercados ecológicos ou para superar restrições religiosas.¹⁷

Este tipo de coagulante vegetal não tem sido utilizado com leite de vaca porque deixa um forte sabor amargo nos queijos finais, embora este sabor tenha menor percepção nos queijos de cabra e de ovelha.¹⁸

A atividade de coagulação destas plantas está relacionada com a presença de diferentes protéases aspárticas, que quebram a ligação Phe105-Met106 da κ -caseína. Estas protéases aspárticas são designadas por cardosina A e cardosina B, que se assemelham à quimosina e à pepsina, respetivamente, em termos de atividade e especificidade. Embora as cardosinas A e B sejam as duas principais protéases encontradas em *C. cardunculus* L., confirmou-se que as protéases aspárticas do cardo são codificadas por uma família multigénica. Algumas destas enzimas foram isoladas e caracterizadas, como as ciprosinas A, B e C e as cardosinas A, B, E, F, G e H, sendo que todas em conjunto são responsáveis pelas atividades apresentadas pelo extrato.¹⁸ Na tabela 1.5-2 é possível visualizar as atividades de coagulação do leite (MCA) do extrato bruto de *Cynara cardunculus* L. e das cardosinas A e B isoladas.¹⁶

Tabela 1.5-2 - Atividade coagulante ao leite de protéases aspárticas da flor de cardo

Enzima	Condições de extração	MCA	Referências
Extrato bruto de cardo	0.5 g de flor em 75 mL de água ultrapura	0.131 RU/mL	19
Cardosina A	1 g de flor em 10 mL ácido cítrico (pH 3), seguido por purificação	1160 IMCU/g	20
Cardosina B	1 g de flor em 10 mL ácido cítrico (pH 3), seguido por purificação	7556 IMCU/g	20

A cardosina A e B apresentam diferentes tamanhos moleculares, sendo estes 74.39 kDa e 86.01 kDa. Esta diferença no seu tamanho molecular pode possibilitar a separação entre as duas moléculas, podendo ser dificultado pela estrutura tridimensional das mesmas, representadas na figura 1.5-1.^{21,22}

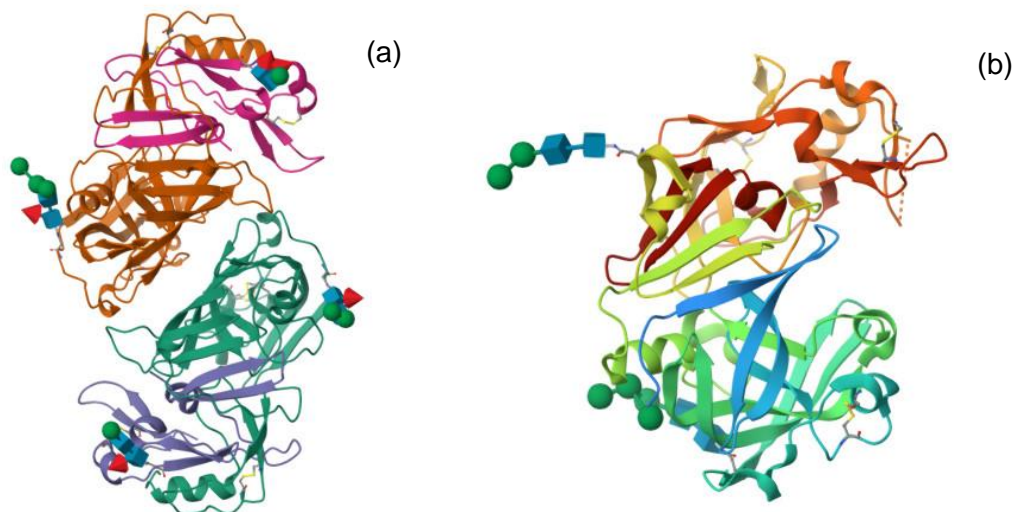


Figura 1.5-1 - Estrutura tridimensional da cardosina A²¹ (a) e da cardosina B²² (b)

A utilização do cardo, *C. cardunculus* L., como coagulante para o fabrico de queijo é obrigatória em alguns queijos portugueses beneficiários do estatuto de Denominação de Origem Protegida (DOP) com reconhecimento da União Europeia (EU).

No entanto, a planta continua a crescer espontaneamente e, em geral, a colheita das flores não é controlada, representando assim alguma incerteza no fabrico do queijo.

O efeito da variabilidade do perfil flor/enzima permanece algo obscuro e a utilização do extrato de cardo continua a ser feita de forma tradicional, sem qualquer tipo de certificação ou avaliação das soluções de extrato bruto.²³

1.6 Técnicas de caracterização química dos extratos

A caracterização química dos extratos obtidos é de extrema importância para a melhor compreensão da composição química do mesmo. Dito isto, ao longo do tempo, foram criadas diversas técnicas analíticas para não só a análise qualitativa como quantitativa de diversos compostos, podendo estes serem mais específicos, medindo a quantidade de uma molécula no extrato, ou mais global, como o caso de técnicas que determinam as proteínas totais ou o carbono orgânico total (TOC).

1.6.1 Métodos de Bradford para a determinação de proteínas totais

O ensaio de Bradford abrange várias preparações do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 utilizado para fins de quantificação de proteínas. O mecanismo básico do ensaio é a ligação do corante a pH ácido aos resíduos de arginina, histidina, fenilalanina, triptofano e tirosina e interações hidrofóbicas. Após a ligação à proteína, observa-se uma mudança metacromática de 465 para 595 nm devido à estabilização da forma aniônica do corante. A maior parte do sinal observado deve-se à interação com resíduos de arginina, resultando na ampla variação proteína-proteína característica das preparações de Coomassie. Esta é uma limitação significativa na utilização deste ensaio quando o padrão e a amostra não correspondem. Quando esta for uma fonte significativa de erro, ou quando as amostras de proteínas contenham detergentes, podem ser empregues ensaios alternativos de ligação de corantes, incluindo a albumina do soro bovino (BSA), formulações de Lowry e vários ensaios de ligação de corantes fluorescentes.²⁴

Em termos experimentais, este método consiste na preparação de uma curva de calibração com uma molécula padrão como a BSA. As concentrações deste padrão devem variar entre os 100 e os 1600 mg.L⁻¹. É importante referir que estas diluições devem ser feitas com um tampão fosfato, de forma a manter o pH das amostras.²⁴

De seguida é necessário adicionar, a uma cuvette 25 µL de amostra ou do padrão e 1 mL do corante, esperando 10 min. a temperatura ambiente para a reação acontecer.²⁴ Por fim é necessário medir as absorbâncias a 595 nm.²⁴

Com as absorbâncias obtidas para os padrões utilizados, constrói-se um gráfico da absorbância a 595 nm versus a concentração dos padrões.²⁴

Com esta reta de calibração determina-se a concentração de proteínas nas amostras em estudo, em equivalentes do padrão utilizado.²⁴

1.6.2 Método de Folin-Ciocalteu para a determinação de compostos fenólicos totais

A história do ensaio Folin-Ciocalteu começou quando Folin e Macallum reportou que a adição de compostos fenólicos a uma solução de ácido fosfotúngstico produziu uma cor azul após posterior adição de um álcali.²⁵ Com base nesta reação, Folin e Denis desenvolveram um reagente fenólico para quantificação colorimétrica.²⁶ Este reagente, conhecido como reagente de Folin-Denis, é constituído por uma mistura de ácido fosfomolibdico, ácido fosfórico, tungstato de sódio e água. Devido à sua elevada reatividade a vários compostos fenólicos (por exemplo, ácido tânico, ácido salicílico,

catequina, vanilina e eugenol), o reagente de Folin-Denis (FD) foi rapidamente proposto para quantificar a vanilina em extratos aromatizantes, tirosina nas proteínas e fenólicos totais na urina.²⁷⁻²⁹

Nos anos seguintes, Otto Folin e os seus colegas fizeram contínuas melhorias no reagente. As principais alterações incluíram a adição de ácido clorídrico e molibdato de sódio, sendo este último composto um substituto do ácido fosfomolibdico.³⁰⁻³² Essas modificações aumentaram a sensibilidade e estabilidade do reagente fenólico, aparentemente pelo aumento da proporção de molibdato.^{32,33} No entanto, a produção ocasional de um precipitado branco permaneceu um problema para o método. Por fim, Folin e Ciocalteu referiram que a adição de sulfato de lítio ao reagente fenólico evita esta precipitação.³⁴

Assim, o reagente fenólico que inclui as melhorias propostas tornou-se amplamente conhecido como reagente de Folin-Ciocalteu. Uma comparação do reagente de Folin-Ciocalteu (FC) com o de Folin e Denis revelou que o primeiro é mais sensível e reprodutível. Acredita-se que ambos os reagentes fenólicos têm as mesmas bases químicas, que consistem numa mistura de compostos heteropoli de molibdénio e tungsténio.³³ Estes compostos heteropoli atuam como os agentes ativos oxidantes no reagente, sendo os molibdatos mais facilmente reduzido a espécies heteropoli-azuis do que os tungstatos.³³

A química por detrás dos ensaios FC e FD envolve a transferência de eletrões dos agentes redutores aos compostos heteropoli, resultando numa cor azul que varia com as concentrações do redutor.³⁵ Os compostos fenólicos reagem com os reagentes fenólicos apenas pela adição subsequente de um álcali devido a condições básicas (pH ~10) que favorecem a dissociação dos fenóis em iões fenolato. Estes iões fenolato têm maior poder redutor em comparação com os fenóis. No entanto, desde os primeiros estudos de Otto Folin e seus colaboradores, a especificidade do reagente fenólico tem sido questionada porque muitos reagentes não fenólicos, incluindo o ácido ascórbico e alguns aminoácidos, são reativos nos ensaios. Dada a crescente popularidade dos ensaios para a determinação dos compostos fenólicos totais (TPC) em diferentes amostras, o esforço para limitar a interferência de compostos não fenólicos é uma estratégia crucial para o sucesso dessas análises. Não obstante, nos casos em que a diminuição dos efeitos dos compostos interferentes não é possível ou impraticável, estes ensaios devem ser utilizados como uma estimativa do poder redutor.^{33,35}

Inicialmente, a maioria dos estudos utilizando reagentes fenólicos em amostras de plantas teve como objetivo quantificar o TPC, nomeadamente para estimar os taninos em frutas e bebidas. No entanto, não existia um protocolo padronizado e, infelizmente,

o reagente FD foi o mais utilizado. Só em 1965, Singleton e Rossi propuseram um protocolo padronizado para quantificar o TPC em amostras de plantas utilizando o reagente FC em vez do reagente FD.³⁶ Vários parâmetros de reação foram otimizados, como a proporção de volume de álcali e reagente, tempo de reação, temperatura e comprimento de onda ideal para medições de absorvância. O ácido gálico foi sugerido como padrão de referência uma vez que as amostras alvo eram taninos de vinho.³⁶ O protocolo padronizado proposto por Singleton e Rossi aumentou a reprodutibilidade e permitiu aos investigadores comparar os seus resultados com maior precisão.³⁶ Como resultado, o ensaio FC tornou-se amplamente utilizado para quantificar o TPC. Nos anos subsequentes, o desenvolvimento da instrumentação para análises químicas permitiu a utilização de pequenos volumes de solventes e reagentes nos ensaios analíticos. Consequentemente, o protocolo de Singleton e Rossi foi adaptado para utilização com um leitor de microplacas.³⁷ No entanto, a maioria das adaptações no protocolo são feitas principalmente para tornar o ensaio viável dentro do contexto do artigo e não necessariamente para otimizar o seu desempenho. No geral, o ensaio FC continua a ser popular entre investigadores devido à sua simplicidade e sensibilidade. A disponibilidade comercial do reagente FC aumentou ainda mais a sua conveniência e facilidade de utilização, poupando tempo ao investigador e contribuindo para o crescente interesse no ensaio.

1.6.3 Atividade coagulante ao Leite (MCA)

A atividade coagulante ao leite é um parâmetro de extrema importância, aquando da caracterização de agentes coagulantes do leite. Sendo assim surgiu a necessidade de normalizar a análise desta atividade coagulante, surgindo assim diversas normas da organização internacional de normalização (ISO) e da Federação internacional de laticínios (IDF). Para o fim desta normalização foi criada em 2006 a norma ISO23058/IDF199:2006.³⁸

Para a execução deste teste é necessário utilizar os reagentes presentes na tabela 1.6-1.³⁸

Tabela 1.6-1 - Reagentes utilizados na norma ISO23058/IDF199:2006

Reagente	Função
Solução tampão de pH 5.5	Preparação do coagulante a ser estudado
Solução mãe de CaCl ₂ 500 g/L	Preparação da solução de trabalho de CaCl ₂
Solução de trabalho de CaCl ₂ 0,5 g/L	Reconstituição do leite em pó
Leite magro em pó	Reconstituição do leite em pó
Coagulante caprino padrão	Padrão para a determinação da atividade coagulante ao leite

O primeiro passo para a execução deste teste, segundo a norma, é a preparação do leite que atuará como substrato. Para tal, é adicionada uma quantidade entre 0.1 g e 110 g de leite em pó para um balão de 2 L, aferindo o mesmo com uma solução de 0.5 g/L de cloreto de cálcio, agitando durante 30 min., a temperatura ambiente, evitando a formação de espuma. Paralelamente é necessário preparar o coagulante de estudo e o coagulante padrão. Para o segundo, é necessário medir 3 mL de padrão adquirido comercialmente para um balão de 50 mL, aferindo o resto com a solução tampão de pH 5.5 preparada anteriormente.³⁸

Depois da preparação do reagente, é possível proceder ao teste de coagulação do leite. Para tal, é necessário medir 25 mL do leite para um balão de fundo redondo ou um tubo de ensaio. De seguida, mantendo o balão a rodar, mantém-se o balão a uma temperatura de 32 °C por 12 min.³⁸

Posteriormente é adicionado 0.5 mL do agente coagulante, e ao mesmo tempo, começar a cronometrar o tempo. Parar o tempo quando é observada a primeira floculação e registar o tempo. Todas as medições deverão ser realizadas em duplicado, e é necessário realizar este teste para o coagulante a estudar e para o coagulante padrão. De seguida aplica-se a equação 1.6 -1 de forma a obter-se a atividade coagulante do coagulante testado.³⁸

$$\alpha_t = \frac{t_{ref} \times 0.003 \times d \times \alpha_{ref}}{t_t}$$

Onde:

α_t – Atividade coagulante ao leite do agente coagulante testado

t_{ref} – Tempo de floculação do agente coagulante padrão

d – Fator de diluição do agente coagulante testado

α_{ref} – Atividade coagulante ao leite do agente coagulante padrão

t_t – Tempo de floculação do agente coagulante testado

O resultado será obtido em unidades internacionais de coagulação do leite (IMCU) por mL de extrato utilizado ³⁸

1.7 Membranas

Uma membrana é uma barreira semipermeável que controla a facilidade com que certos solutos podem passar através da mesma. Devido a certas forças motrizes, tais como a pressão, potencial químico ou elétrico, temperatura ou concentração, algumas substâncias movem-se mais lentamente através da membrana ou são mesmo retidas, enquanto outras substâncias são transportadas através da membrana, levando à permeação seletiva. Portanto, as membranas podem ser utilizadas como método para purificar um determinado produto inicial. Neste tipo de processo, a mistura de alimentação líquida ou gasosa é separada em concentrado/retentado e permeado, conforme mostrado na Figura 1.7-1 ^{39,40}

Os concentrados contêm altas concentrações de compostos que não conseguem passar através da membrana, enquanto os permeados são ricos em solutos que conseguem passar através da membrana.⁴¹

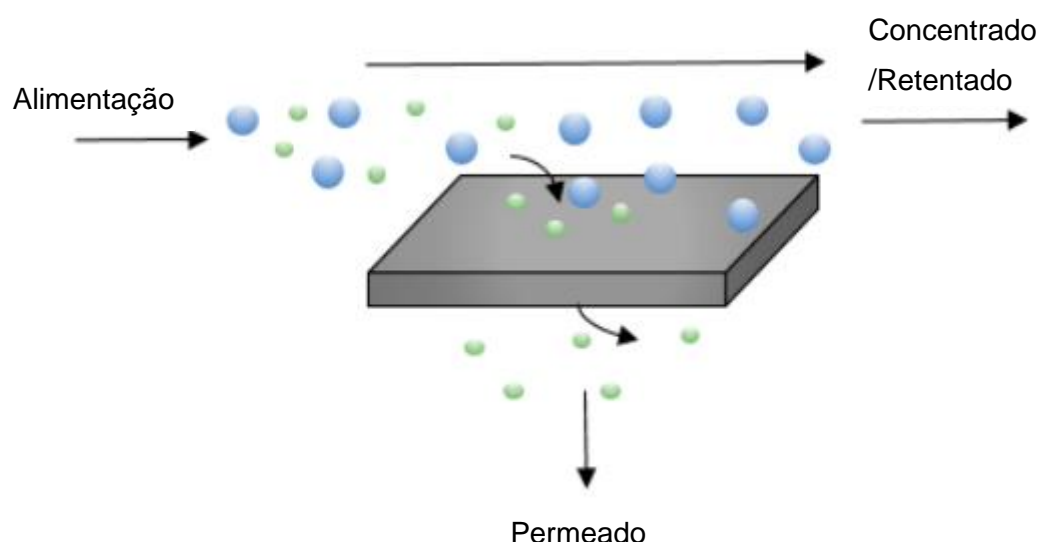


Figura 1.7-1 - Esquema simplificado da separação através de uma membrana

A permeação através de membranas pode ser dividida em filtração frontal ou filtração tangencial, ambas demonstradas na Figura 1.7-2. Na filtração frontal, a corrente de alimentação é feita perpendicularmente à superfície da membrana e os solutos que não são permeados através da mesma acumulam-se na superfície da membrana e o permeado é recolhido separadamente.

Na filtração tangencial, a corrente de alimentação flui tangencialmente ao longo da superfície da membrana, gerando duas correntes, uma de permeado e outra de concentrado/retentado. Isto significa que os solutos que não conseguem passar através da membrana não se acumulam tão facilmente na sua superfície (fenómeno denominado por polarização de concentração), mas são arrastadas pelo próprio caudal de alimentação, diminuindo assim a acumulação de solutos na superfície da membrana. Portanto, através deste tipo de filtração, podem ser alcançadas taxas de permeação mais elevadas ao longo do tempo. ⁴²

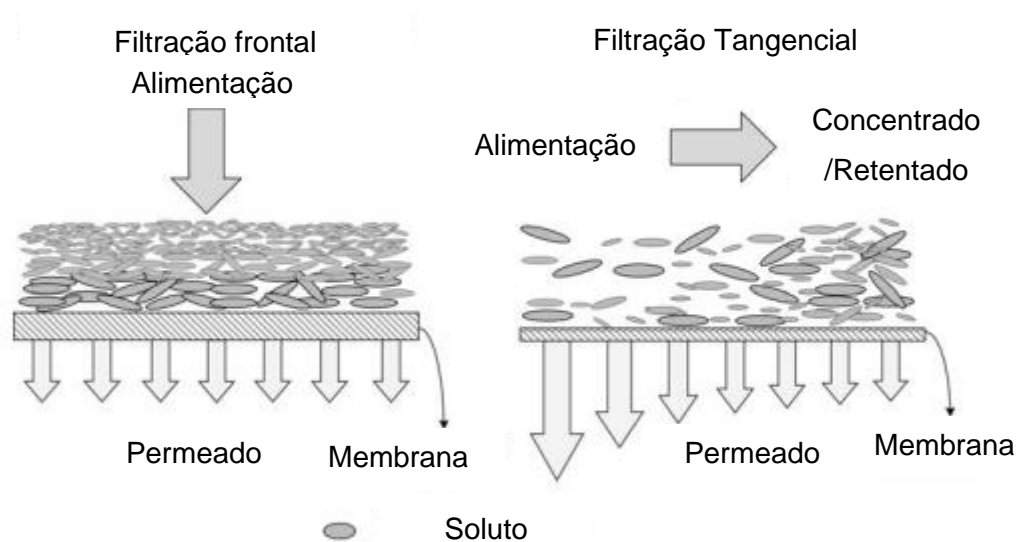


Figura 1.7-2 -Esquema simplificado da filtração frontal (a) e tangencial (b) ^{Adaptado de 42}

1.8 Classificação das Membranas

As características da própria membrana determinam o seu potencial na purificação, separação ou fracionamento de solutos, sendo, portanto, uma tecnologia com bases sólidas na ciência dos materiais. Sendo assim, é necessário compreender a relação entre as condições do processo e a separação alcançável pela membrana correspondente. ³⁹

As membranas podem ser classificadas em relação à sua estrutura e em relação à sua utilização.

Quanto à sua estrutura estas podem ser classificadas como homogêneas ou microporosas ou ainda como simétricas ou assimétricas integrais e assimétrica compostas ³⁹

Quanto ao seu processo estas podem ser classificadas em membranas de Microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF), Nanofiltração (NF), Osmose Inversa (OR), Diálise (D), Eletrodialise (ED), Permeação Gasosa (PG) e Pervaporação (PV). ³⁹

1.8.1 Membranas Homogéneas

As membranas homogéneas são constituídas por filmes densos que permitem a separação de moléculas com dimensões semelhantes devido ao facto de apresentarem diferentes solubilidades e difusividades na matriz da membrana. As aplicações mais importantes para estas membranas são a permeação gasosa e pervaporação. Outro tipo de membranas homogéneas são as membranas de permuta iónica, utilizadas em eletrodialise.^{39,43}

1.8.2 Membranas Microporosas

Ao contrário das membranas homogéneas as membranas microporosas apresentam uma matriz porosa, cujos poros podem apresentar uma larga gama de dimensões que podem variar desde a ordem do micron até ao nanómetro. Com o processo de fabrico, as membranas microporosas podem adquirir uma variedade de estruturas consoante a aplicação desejável, podendo ser simétricas ou assimétricas quanto à sua estrutura porosa transversal.

1.8.3 Membranas Simétricas

As membranas simétricas apresentam uma estrutura porosa idêntica ao longo de toda a espessura da membrana, tendo uma aplicação limitada industrialmente.

1.8.4 Membranas Assimétricas

As membranas assimétricas ocupam um lugar central na tecnologia de separação por membranas devido ao facto de combinarem elevados fluxos de permeação e elevada seletividade. Na verdade, este foi um marco na promoção a partir da década de 1960, da expansão industrial dos processos de membrana por gradiente de pressão. A característica responsável pela elevada permeação/seletividade é a estrutura transversal assimétrica de uma camada densa muito fina cuja espessura pode variar de 0,1 a 1 μm e uma camada porosa subjacente com espessuras que variam de 100 a 200 μm . A camada fina e densa é responsável pela seletividade da membrana, muitas vezes designada por camada ativa, e a camada porosa confere essencialmente resistência mecânica à membrana. Em contraste com as membranas simétricas, que atuam como filtros tradicionais e retêm partículas nos seus poros com subsequente incrustação e declínio dos fluxos de permeação, as membranas assimétricas atuam como filtros de superfície retendo o material rejeitado na superfície da membrana e não dentro dos poros e evitando o bloqueio/incrustação dos poros.³⁹

Como dito anteriormente, dentro das membranas assimétricas, é possível classificá-las em membranas assimétricas integrais e compostas, onde as primeiras são constituídas por um único material e as últimas são constituídas por camadas de diferentes materiais. As membranas assimétricas integrais são preparadas através do método de inversão de fases, em que uma solução polimérica inicial, que contém o polímero e um sistema de solvente, é dispersa de forma a formar um filme, e após um tempo de evaporação, este é depositado no não solvente, que normalmente é água. ³⁹

A versatilidade deste processo, provém tanto da variação na solução polimérica inicial, como na variação dos parâmetros da preparação do filme, como o tempo de evaporação, a temperatura e o agente não solvente. ³⁹

Quanto às membranas assimétricas compostas, estas são o resultado da deposição de uma camada densa e seletiva num substrato poroso de um material polimérico diferente. ^{39,44}

1.8.5 Classificação dos Processos de Membranas

Como mencionado anteriormente, as membranas também podem ser classificadas quanto a processo em que são utilizadas, é possível observar na tabela 1.8-1 os diferentes tipos de classificações das membranas quanto ao processo. ³⁹

Tabela 1.8.5-1 - Classificação quanto ao processo

Processo de Separação	Tipo de Membrana	Força Motriz	Mecanismo de Separação	Aplicação
Microfiltração	Microporosa 0,1 – 10 µm	Pressão 0,1 – 10 bar	Peneiro molecular	Esterilização / Clarificação
Ultrafiltração	Assimétrica	Pressão 0,5 – 8 bar	Peneiro molecular e interações membrana/soluto/solvente	Separação de solutos macromoleculares
Nanofiltração	Assimétrica	Pressão 10 – 40 bar	Peneiro molecular e interações membrana/soluto/solvente	Separação de sais ou solutos orgânicos pequenos
Osmose Inversa	Assimétrica	Pressão 20 – 100 bar	Solução/Difusão	Separação de sais e microsolutos
Diálise	Microporosa 0,1 – 10 µm	Gradiente de concentração	Difusão	Separação de sais e microsolutos de solução macromoleculares
Eletrodialise	Troca iônica	Gradiente elétrico	Migração Elétrica	Dessalinização de soluções iônicas
Permeação de Gasosa	Homogênia/simétrica /assimétrica	Pressão e gradiente de concentração	Solução/Difusão	Separação de misturas de gases
Pervaporação	Homogênia/simétrica /assimétrica	Gradiente de concentração	Solução/Difusão	Concentração e separação de solutos orgânicos pequenos

1.9 Membranas de Acetato de Celulose

As membranas são feitas principalmente de polímeros sintéticos, como polissulfona, fluoreto de polivinilideno, polietileno, álcool polivinílico e acetato de celulose (AC).⁴⁵ O AC é de particular interesse para investigadores nesta área porque é um polímero hidrofílico biodegradável e pode ser funcionalizado com vários grupos para atingir as propriedades desejadas.⁴⁵

Estas membranas possuem excelente capacidade de formação de filme, alta estabilidade química e mecânica, alta hidrofiliçidade, excelentes propriedades de transporte, baixa adsorção de proteínas e fácil disponibilidade.⁴⁶

Devido à sua facilidade de processamento, o AC tem sido utilizado para sintetizar membranas de PG⁴⁷, OR⁴⁸, NF⁴⁹, UF⁵⁰, MF⁵¹ e até troca iônica⁵². Devido à sua baixa toxicidade e degradabilidade, o AC ainda tem potencial para ser amplamente utilizado em aplicações industriais e biomédicas, como hemodiálise⁵³, mas esta membrana tem algumas desvantagens, como faixa limitada de pH e temperatura máxima de operação de 30 graus Celsius (a temperaturas superiores a sua estrutura sofre alterações). Portanto, o desempenho da membrana pode ser maximizado pela adição de aditivos orgânicos e inorgânicos à solução de preparação da membrana durante o processo de inversão de fase.⁴⁵

Este género tem atraído mais atenção nas últimas décadas, principalmente por fatores ambientais. A quantidade de artigos publicados de 1955 a 2021 é apresentada na Figura 1.9-1.⁴⁵

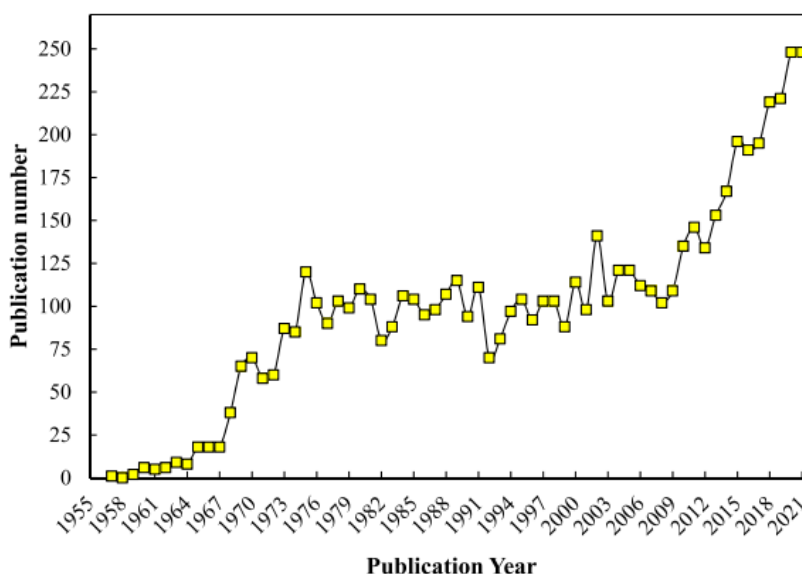


Figura 1.9-1 - Número de publicações para a pesquisa "cellulose acetate membrane" no scopus (23 de janeiro de 2022) adaptado de 45

1.10 Método de Inversão de Fases

A inversão de fase é um método de preparação de filmes finos a partir de um determinado polímero que pode ser uniformemente disperso num solvente e catalisar a transição de uma solução para uma fase contínua. As membranas preparadas por este método normalmente têm uma superfície superior densa e morfologia assimétrica, tornando-as adequadas para processos de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa.⁵⁴

Durante a separação de fases, a mistura líquido-líquido precipita após imersão num banho de coagulação, resultando na separação de uma fase rica em polímero (PR) e uma fase pobre em polímero (PL). A matriz sólida da membrana e seus poros são obtidos respetivamente durante as etapas PR e PL. A camada superior afeta diretamente a camada inferior, regulando a taxa na qual solutos e não solutos se difundem através da membrana durante a inversão de fase. Assim, podem ser criadas membranas integrais com subcamadas muito porosas e lamelas muito densas.⁵⁵

Além disso, o sistema ternário (relações termodinâmicas e cinéticas) do polímero, solvente e não solvente está envolvido no processo de formação da membrana. A morfologia final e funcionalidade da membrana produzida são fortemente influenciadas pela sua eficiência, que é influenciada principalmente pelo tipo de solvente utilizado. Em geral, a densidade, a viscosidade e a polaridade do solvente afetam a taxa de troca durante a inversão de fase, que por sua vez afeta a morfologia (simetria, porosidade ou densidade) da própria membrana. Maior difusão solvente/não solvente resulta em maior número de poros na membrana.⁵⁵

Pode-se dizer também que é o método mais utilizado na fabricação de membranas de AC.

Membranas com diferentes tamanhos de poros, morfologias e aplicações podem ser criados não apenas alterando o tipo de solvente, mas também alterando as condições de inversão de fase, concentração de AC, temperatura do banho de coagulação, tempo de evaporação do solvente, etc.⁵⁶

1.11 Processos de Membranas - Força Motriz é o Gradiente de Pressão

Os processos de membrana podem ter diversas forças motrizes geradas por diferentes gradientes: pressão, concentração, etc. Os processos mais comuns impulsionados por gradientes de pressão incluem MF, UF, NF e OR, conforme demonstrado anteriormente na Tabela 1.8-1.³⁹

Neste tipo de processos, existem duas células separadas por uma membrana. A corrente de alimentação entra na célula sob maior pressão, entrando em contato com a camada ativa da membrana e é dividida em duas correntes. A corrente líquida que flui da extremidade da célula sob maior pressão é chamada de concentrado/retentado e é rica em solutos impermeáveis à membrana. O fluxo que passa pela membrana e sai do processo pela célula na pressão mais baixa é chamado de permeado, que é rico em solvente da corrente de alimentação. ³⁹

O processo de separação utilizado neste trabalho experimental é o de UF. Atualmente é utilizado no tratamento de água, separação/remoção de contaminantes, clarificação coloidal, hemodiálise e como pré-tratamento em RO. ⁵⁷ Opera a pressões relativamente baixas, conforme descrito na Tabela 1.8-1, mas o gradiente de pressão é suficiente para gerar convecção para regular a transferência de massa. ³⁹

Nesse processo, a membrana assimétrica, através de sua camada ativa densa, é responsável pela resistência da membrana à transferência de massa com base na estereoquímica da repulsão molecular e na diferença de tamanho do soluto em relação aos seus poros. ⁵⁸

Além dos mecanismos de repulsão molecular, existem outros mecanismos de interação solvente/soluto/membrana nas operações de ultrafiltração, entre os quais as interações eletrostáticas que são particularmente importantes. ⁵⁹

Este tipo de processo depende, portanto, dos solutos a serem separados, das propriedades da membrana utilizada e dos fenômenos de transporte que ocorrem na sua superfície. ⁵⁹

A eficiência do processo de ultrafiltração também depende do fenômeno de polarização de concentração na superfície da membrana. Este fenômeno é devido à acumulação de solutos na superfície da camada ativa, fazendo com que exista um fluxo difusivo do soluto no sentido oposto ao pretendido. Esse fenômeno está esquematizado na Figura 1.11-1. ⁵⁹

Para combater este fenômeno, os parâmetros operacionais do processo podem ser modificados e/ou a camada ativa da membrana pode ser modificada ³⁹.

Pode ser visto na Figura 1.11-1 que quando a pressão é a força motriz, o soluto presente na corrente de alimentação é trazido para a superfície da membrana por convecção perpendicular à superfície da mesma. Os solutos rejeitados pela membrana acumulam-se gradualmente na sua superfície e a formação de um gradiente de concentração faz com que eles se difundam em direção à corrente de alimentação. Os fluxos convectivos e difusivos têm direções opostas, formando um perfil de concentração desde a concentração de C_{A0} na alimentação até à concentração de C_{Am} na superfície da

membrana. A razão entre estas duas concentrações (C_{Am}/C_{A0}) representa o módulo de polarização da concentração. Esta relação será maior se o fluxo de permeado for maior e a eficiência de transferência de massa for menor. ³⁹

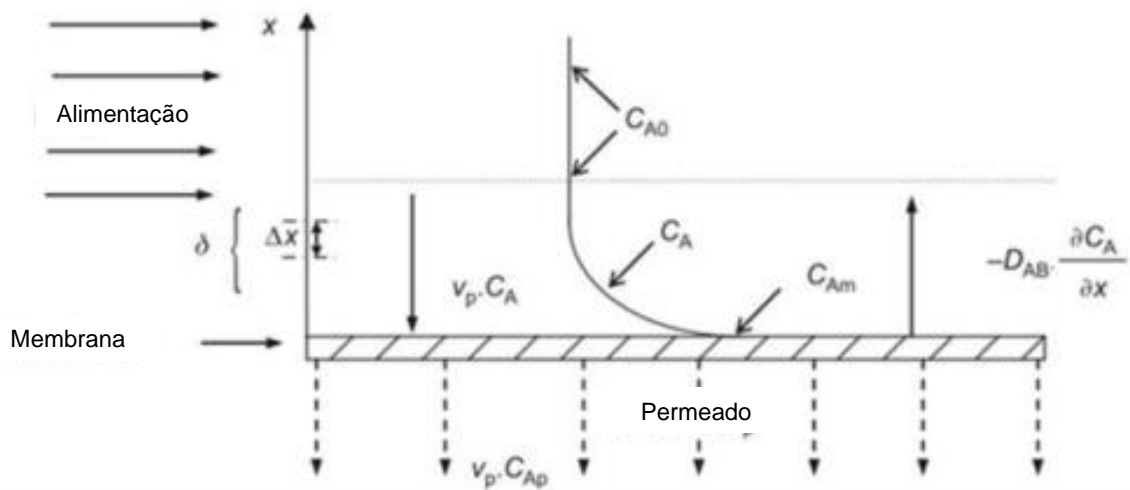


Figura 1.11-1 - Representação esquemática do fenómeno da polarização de concentração, na superfície das membranas

1.12 . Caracterização de Membranas

Para além da caracterização química e física das membranas estas podem ainda ser caracterizadas quanto à sua permeação. A permeabilidade hidráulica, rejeição a sais e solutos orgânicos de referência e limite de exclusão molecular, são os parâmetros mais comuns no que toca à caracterização de membranas de ultrafiltração. ³⁹

1.12.1 Permeabilidade Hidráulica (L_p)

A permeabilidade depende não só das características da membrana, como também do material e morfologia da mesma. Quando se pretende obter a permeabilidade hidráulica, L_p , de uma membrana, utiliza-se água pura como alimentação. Os fluxos de permeado de água pura, J_p , em função da pressão utilizada no processo, são utilizados segundo a Equação 1.12 - 1 para obter a permeabilidade hidráulica da membrana.

$$J_p = L_p \times \Delta P \quad (1.12-1)$$

Onde:

J_p – Fluxo de permeado de água pura

L_p – Permeabilidade hidráulica da membrana

ΔP – Diferença de pressão aplicada

1.12.2 Coeficientes de Rejeição Aparente e Intrínseco

O coeficiente de rejeição aparente, f_A , definido pela Equação 1.12-2, indica a capacidade de uma membrana para separar um determinado soluto.

$$f_A = \frac{C_{A0} - C_{AP}}{C_{A0}} \quad (1.12-2)$$

Onde:

f_A – Coeficiente de rejeição aparente ao soluto A

C_{A0} – Concentração do soluto A na alimentação

C_{AP} – Concentração do soluto A no permeado

É importante denotar que também é possível determinar o coeficiente de rejeição intrínseco, f'_A , com a equação 1.12-3, caso a concentração do soluto adjacente à membrana seja conhecida. Este coeficiente difere do anterior por levar em conta a acumulação de concentração do soluto A na superfície da membrana.

$$f'_A = \frac{C_{Am} - C_{AP}}{C_{Am}} \quad (1.12-3)$$

Onde:

f'_A – Coeficiente de rejeição intrínseco ao soluto A

C_{Am} – Concentração do soluto A na membrana

C_{AP} – Concentração do soluto A no permeado

1.12.3 Limite de Exclusão Molecular (MWCO)

O limite de exclusão molecular (Molecular Weight Cut-Off - MWCO), é definido como a massa molecular (MW) para o qual um determinado soluto é retido entre os 90 e os 99% pela membrana. Este valor depende dos critérios empregues pelos autores e fabricantes.³⁹ Dependendo do tipo de aplicação, é possível encontrar membranas de ultrafiltração com MWCOs entre os 1000 e os 1 000 000 Da.³⁹ Neste trabalho o MWCO é obtido através da representação gráfica de $\log_{10} \left(\frac{f_A}{1-f_A} \right)$ vs MWs de solutos orgânicos de referência - polietilenoglicóis (PEGs) e Dextrans com diversos MWs.

Após o cálculo dos coeficientes de rejeição aparentes aos diferentes solutos orgânicos de referência determina-se o declive e a ordenada na origem da equação 1.12-4

$$\log_{10} \left(\frac{f}{1-f} \right) = m \times MW + b \quad (1.12-4)$$

Onde:

f – Coeficiente de rejeição aparente aos solutos orgânicos padrão

m – Declive da reta

MW – Tamanho molecular dos solutos orgânicos padrão

b – Ordenada na origem da reta

Por fim, igualando a equação da reta obtida a 1, obtém-se a equação 1.12-5, que permite determinar o MWCO

$$MWCO = \frac{1-b}{m} \quad (1.12-5)$$

Onde:

MWCO – Limite de Exclusão Molecular

m – Declive da reta

b – Ordenada na origem da reta

1.13 Membranas na Indústria alimentar

A introdução de membranas de NF na indústria alimentar foi reconhecida pela primeira vez no ano de 1976, quando um produtor de equipamentos com sede na Florida pensou em utilizar uma membrana de osmose inversa alterada no lugar do amolecimento da cal para tratar água que contém sólidos dissolvidos.⁶⁰ No ano de 1977, um produtor de membranas da Califórnia desenvolveu uma membrana amaciadora especial com uma taxa de rejeição de cerca de 47% para iões monovalentes. A comercialização completa da membrana amaciadora aconteceu em 1984 com a ajuda de um estudo piloto de 3 meses feito para o Condado de Brevard utilizando membranas de UF.⁶⁰ Esta membrana amaciadora foi denominada de membrana de nanofiltração devido ao tamanho dos seus poros.⁶⁰

As propriedades das membranas de nanofiltração estão entre as da membrana de UF e da membrana OR, possuindo um tamanho de poro ~ 1 nm e um limite de exclusão molecular de 300-500 Da (MWCO). As membranas poliméricas NF estão ligeiramente carregadas; podendo ser aniónicas ou catiónicas dependendo da sua carga superficial.

A maioria das membranas poliméricas de nanofiltração preparadas possuem camadas de poliamida na superfície, e o resultado do potencial zeta mostra o seu comportamento aniônico a pH neutro devido à forte funcionalidade do ácido carboxílico; por exemplo, as membranas poliméricas NF contendo grupos carboxílicos, bem como grupos de ácido sulfônico, dão origem a uma superfície carregada com a aplicação da solução de alimentação.⁶¹

As membranas NF são capazes de separar íons inorgânicos e compostos orgânicos, assim como as membranas de OR. Maior fluxo, menor pressão de funcionamento, menor rejeição de íons monovalentes, forte rejeição de íons divalentes e despesas de investimento e manutenção comparativamente baratas distinguem as membranas de NF das membranas de OR. Devido a estas propriedades, as membranas de NF têm encontrado aplicações em muitos campos, particularmente no tratamento de águas residuais, dessalinização, aplicações biotecnológicas e farmacêuticas, indústrias alimentares, laticínios e indústrias de processamento de óleos vegetais, indústrias de bebidas, extratos vegetais, etc.⁶⁰

1.14 Membranas na indústria dos laticínios

O método de nanofiltração aumentou a consistência dos produtos lácteos, enquanto aumentou a fiabilidade e a rentabilidade do processo na indústria de laticínios. É comumente utilizado para o processamento de soro de leite⁶²⁻⁶⁴, recuperação de lactose⁶⁵, desmineralização ou dessalinização de soro de leite^{66,67} e separação de ácido láctico^{68,69}. O soro de leite é um subproduto das indústrias de caseína e queijo, com baixo teor de sólidos (até 6%) e elevada carência bioquímica de oxigênio ($CBO_5 = 30-50$ g/L), tornando o seu descarte dispendioso e difícil⁷⁰. O soro do leite é rico em lactose, açúcares, gordura, sais minerais, vitaminas e outros nutrientes. Durante vários anos, o soro de leite foi considerado um resíduo e foi utilizado principalmente como alimento para animais (após secagem) e como fertilizante. No entanto, devido às propriedades dietéticas, biológicas e práticas do soro de leite, tem havido um interesse crescente na sua utilização para fabricar produtos de valor acrescentado, como as proteínas do soro de leite, nas últimas décadas.⁷¹

A membrana de nanofiltração é efetivamente aplicada para a concentração e desmineralização de soro de leite líquido para obter outros produtos de soro de leite, como o soro de leite em pó. O soro de leite ácido (AW) e o soro de leite doce (SW) são os dois tipos comuns de soro de leite. O AW é obtido como subproduto obtido a partir de queijo *cottage* ou iogurte grego, enquanto o SW é um subproduto obtido a partir de queijo duro e semiduro.⁷²

2 – Metodologia Experimental

2.1 Preparação das Membranas de Acetato de Celulose

O método utilizado para a preparação das membranas neste trabalho foi o de inversão de fases, assim sendo, primeiramente foram pesadas individualmente as quantidades de formamida, acetona e acetato de celulose (30000 Da, Aldrich) presentes na tabela 2.1-1. A formamida atua como um promotor de poros, a acetona como solvente e o acetato de celulose é o composto que irá compor a matriz da membrana.

De seguida, adicionou-se num recipiente de polipropileno o acetato de celulose, a formamida e a acetona, por esta ordem. Posteriormente realizou-se uma agitação durante 24 horas, com o auxílio de um agitador, obtendo-se no final uma solução viscosa. A esta solução é dado o nome do *casting solution* (CS). As diferentes membranas foram identificadas como CA_i, em que *i* é a percentagem de formamida da membrana.

Tabela 2.1-1 - Composição das *casting solutions*

Membrana	Acetato de celulose (%)	Formamida (%)	Acetona (%)
CA-22	17	22	61
CA-27	17	27	56
CA-29	17	29	54
CA-31	17	31	52

Após a obtenção da CS, esta foi dispersa sobre uma placa de vidro com o auxílio a uma faca metálica calibrada com uma ranhura de 0.250 mm, e após 30 segundos de evaporação, mergulhou-se a mesma num banho de água fria, 1 - 4°C, previamente preparado. Este passo é de extrema importância visto que quando a solução fica submersa em água fria ocorre a inversão de fases que irá dar origem aos poros da membrana e à sua estrutura assimétrica. Por fim a membrana é removida da placa de vidro e armazenada no frigorífico a 4°C.

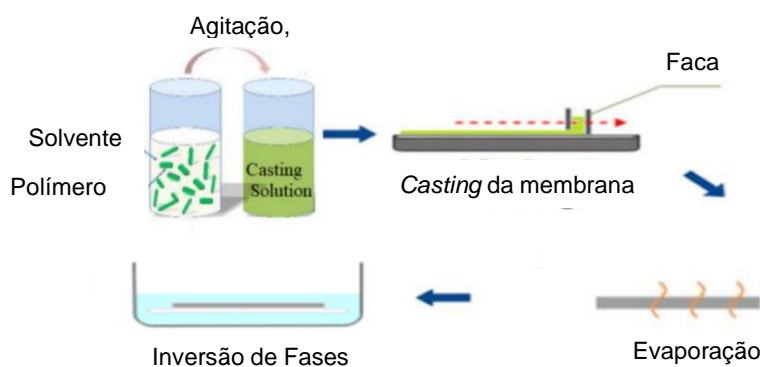


Figura 2.1-1 - Esquema do procedimento de produção de membranas pelo método de inversão de fases

2.2 Metodologias de Caracterização de Membranas

2.2.1 Permeabilidade Hidráulica

Para a obtenção da permeabilidade hidráulica das membranas foi necessário primeiramente cortar as mesmas de forma a estas serem posteriormente inseridas no módulo de filtração presente na figura 2.2-1. Este é constituído por uma bomba, uma célula de UF (com um porta membranas, com capacidade para duas membranas) (Tech-Sep), válvula e rotâmetro.



Figura 2.2-1 - Módulo de filtração

De seguida foi adicionada uma alimentação ao módulo composto por água desionizada e aplicada uma pressão de 1 bar e um caudal de alimentação de $180 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. Após 15 min. de estabilização é recolhida uma amostra de permeado, cronometrando o tempo, medindo a temperatura e pesando a mesma. Através da massa de permeado, do tempo e da área da filtração, o fluxo de permeado é determinado através da equação 2.2-1. Posteriormente à recolha desta primeira amostra, a pressão no módulo é aumentada para 1.5 bar e o processo é repetido. Foram recolhidas amostra entre as pressões de 1-3 bar, com intervalos de 0.5 bar. Com estes resultados experimentais foi traçado para cada membrana a reta do fluxo de permeado em função da pressão, cujo declive representa a permeabilidade hidráulica da membrana, como explicado no capítulo 1.12.1. Este processo foi repetido para as 4 membranas preparadas.

$$J_p [kg/(m^2 \cdot h)] = \frac{m_p [kg]}{t[h] \times A[m^2]} \quad (2.2-1)$$

Onde:

J_p – Fluxo de permeado

m_p – Massa de permeado recolhido

t – Tempo de recolha do permeado

A – Área de filtração

Adicionalmente também foi necessário corrigir o fluxo de permeado com a temperatura de trabalho, para tal, foi utilizada a equação 2.2-2

$$J_p^{25} = \left(\frac{J_p}{0.901} \right)^{-6.96 + \frac{2044}{T}}$$

Onde:

J_p^{25} – Fluxo de Permeado corrigido

J_p – Fluxo de permeado à temperatura de trabalho

T – Temperatura de trabalho

2.2.2 Rejeição aos sais

De forma a obter a rejeição aos sais das membranas foi necessário, primeiramente, colocar a membrana no módulo de filtração. Neste caso a alimentação utilizada é uma solução de cloreto de sódio (NaCl) (Merck) de 600 ppm. Depois de ligar a bomba e aplicar uma pressão de 1 bar no módulo e um caudal de alimentação de 180 L.h⁻¹, esperou-se 15 min., de forma a permitir a homogeneização da solução com o volume morto de água presente anteriormente no módulo e, posteriormente, recolheu-se uma amostra de permeado, cronometrando o tempo, medindo a temperatura e pesando a mesma. Adicionalmente, durante a recolha da amostra, também foi medida a condutividade da alimentação através de um condutivímetro. As condutividades do permeado e alimentação são convertidas em concentração segundo as equações 2.2-2 e 2.2-3 para o Cloreto de Sódio e o Sulfato de Sódio, respetivamente.

$$C_{NaCl}(ppm) = 0.492 \times \Lambda_{amostra} (mS/cm)$$

$$C_{Na_2SO_4}(ppm) = 0.6173 \times \Lambda_{amostra} (mS/cm) \quad (2.2-3)$$

Onde:

C_{NaCl} – Concentração de Cloreto de Sódio

$C_{Na_2SO_4}$ – Concentração de Sulfato de Sódio

$\Lambda_{amostra}$ – Condutividade da amostra

Através da concentração da alimentação e do permeado é determinado com a equação 1.12-2 o coeficiente aparente de rejeição aos sais monovalentes da membrana. De seguida, a alimentação do módulo é substituída por água desionizada de forma a lavar o módulo. Durante os primeiros 6 L de água, tanto o permeado como o concentrado são descartados, e subseqüentemente, esperou-se 15 min., apenas com o permeado a ser descartado. Após esta lavagem, a alimentação é alterada para uma solução de 600 ppm de Sulfato de Sódio (Na_2SO_4), e o processo foi repetido de forma a obter a rejeição para os sais bivalentes. Por fim este processo foi repetido para as 4 membranas preparadas. É possível visualizar o esquema deste procedimento na figura 2.2-3.

2.2.3 Limite de Exclusão Molecular (MWCO)

De forma a obter o MWCO foi necessário primeiramente preparar diversas soluções de polímeros padrão de 1200 ppm, com tamanhos moleculares conhecidos, sendo estas de polietilenoglicol (PEG) e dextran. As soluções preparadas para cada membrana encontram-se representadas na tabela 2.2-1.

Tabela 2.2-1 - Soluções utilizadas (X) para a determinação do MWCO das diferentes membranas

Membrana	Polietilenoglicol (PEG)						Dextran		
	Massas moleculares em Dalton								
	1500	3000	4000	6000	10000	20000	40000	70000	100000
CA-22	X	X		X	X				
CA-27			X	X	X	X			
CA-29			X	X	X	X			
CA-31			X	X	X	X	X	X	X

Para começar o ensaio experimental, colocou-se a membrana no módulo, introduziu-se a alimentação composta por uma das soluções preparadas anteriormente e aplicou-se

uma pressão de 1 bar e um caudal de alimentação de 180 L.h⁻¹. De seguida esperou-se 15 min. para estabilizar a composição da alimentação, e recolheu-se uma amostra do permeado, medindo o tempo, a temperatura e a massa. Durante a recolha do permeado também foi recolhida uma amostra da alimentação, através do tubo de recolha do concentrado. As concentrações de PEG/Dextran da alimentação e do permeado foram determinadas através de cromatográfica líquida de alta resolução (HPLC) e das respetivas curvas de calibração. Entre cada solução de alimentação foi necessário realizar uma lavagem com água desionizada, de forma a garantir que não existia nenhum soluto da solução anterior no módulo, visto que poderia influenciar as concentrações obtidas na alimentação e no permeado. A lavagem foi realizada como nos ensaios da determinação da rejeição de sais. Por fim, depois de obtidas as concentrações das alimentações e dos permeados para as soluções compostas pelos solutos de diferentes massas molares, os coeficientes de rejeição aparentes foram determinados através da equação 1.12-2. e determinou-se o MWCO de cada membrana através da metodologia descrita no capítulo 1.12.3.

2.3 Preparação do Extrato de *Cynara cardunculus*

O primeiro passo para a preparação do extrato de *cynara cardunculus* foi a colheita dos pistilos da flor da mesma. Estas foram colhidas na estação agronómica da Oeiras. Após a colheita estas foram secas à temperatura ambiente por 15 dias, de forma a obter os pistilos sem humidade. Paralelamente foram preparados 3 L de uma solução tampão de acetato com um pH de 5.5. De seguida, pesou-se 10 g de pistilos de flor de cardo aos quais se adicionou 150 mL de solução tampão num almofariz e macerou-se os pistilos com um pilão. Após cerca de 2 min., removeu-se a solução tampão, que ficou com uma cor púrpura, e adicionou-se mais 150 mL de solução tampão ao almofariz. Repetiu-se a maceração, recolhendo o a solução após a mesma. Adicionou-se mais 200 mL de solução tampão ao almofariz, repetindo o mesmo processo. Repetiu-se este processo mais 5 vezes, obtendo então 3 L de extrato de *cynara cardunculus*, utilizando-se no total 60 g de pétalas de flor de cardo. Por fim realizou-se uma filtração por gravidade dos 3 L de extrato, utilizando 6 balões de 500 mL, aferindo os mesmo com tampão acetato quando necessário (devido às perdas de solução devido à absorção de água pelos papeis de filtros). Por fim juntou-se os extratos filtrados presentes nos 6 balões, colocando estes num garrafão, obtendo-se um total de 3 L de extrato de flor de *cynara cardunculus*. É possível visualizar o esquema deste procedimento na figura 2.3-1.

Adicionalmente foi repetido o processo anterior mais uma vez para a realização do ensaio de diafiltração, no entanto, apenas foram preparados 1.5 L de extrato utilizando um total de 30 g de flor de cardo.



Figura 2.3-1 - Esquema da preparação dos extratos de cardo

2.4 Ensaios de Seleção de membrana e Pressão

De forma a possibilitar a escolha da melhor membrana e pressão de trabalho para o processo de concentração e diafiltração, foram realizados ensaios em regime de recirculação total, ou seja, tanto o permeado como o concentrado são retornados para o recipiente da alimentação.

Primeiramente colocou-se a membrana CA-22 no módulo e utilizou-se os 3 L de extrato de cardo como alimentação, ligou-se a bomba e estabeleceu-se uma pressão no módulo de 3 bar e um caudal de alimentação de 180 L.h⁻¹. Aguardou-se 15 min. para a estabilização e recolheu-se uma amostra do permeado, medido o tempo, a temperatura e a massa. Simultaneamente recolheu-se uma amostra da alimentação e armazenaram-se ambas num frigorífico a 4°C, de forma a impedir a desativação das enzimas do extrato. Após a recolha, parou-se a bomba e abriu-se o módulo para substituir a membrana utilizada. Este processo foi realizado com muito cuidado, de forma a evitar a perda de extrato. Repetiu-se este processo para as 4 membranas armazenando as amostras a 4°C até à determinação da atividade coagulante e a -80 °C após a determinação da mesma.

Posteriormente à seleção da membrana foram realizados os testes de seleção da pressão. Para tal, foi colocada a membrana CA-31 no módulo e aplicado uma pressão de 1 bar no módulo, utilizando o extrato como alimentação. De seguida esperou-se

15 min. para a estabilização e repetiu-se o processo de recolha de amostras de permeado e alimentação, já descrito anteriormente. Repetiu-se este procedimento para pressões entre 1-3 bar com um intervalo de 0.5 bar entre medições.

2.5 Ensaio de Concentração

Após a escolha da melhor membrana e pressão de funcionamento, realizou-se o ensaio de concentração. Para tal introduziu-se a membrana CA-31 no módulo e estabeleceu-se uma pressão de 1.5 bar e um caudal de alimentação de 180 L.h⁻¹. A alimentação é composta por 2.9 L de um extrato de cardo preparado anteriormente. Esperou-se 15 min., em modo de recirculação total, de forma a garantir que a alimentação se encontrava homogénea. Posteriormente, colocou-se as tubagens de saída do permeado a escoar para uma proveta (modo de concentração) e iniciou-se o ensaio. Foram retiradas amostras de permeado e concentrado para fatores de concentração (Fc) de 1 a 5, com intervalos de 1 através do mesmo método mencionado anteriormente. Os fatores de concentração foram determinados através da fórmula 2.5-1.

$$F_c = \frac{V_a}{V_a - V_p} \quad (2.5-1)$$

onde:

F_c – Fator de Concentração

V_p – Volume de permeado

V_a – Volume de alimentação

O volume de permeado removido, foi medido ao longo do processo com o auxílio de provetas. Quando se obteve um volume de permeado de 2210 mL desligou-se a bomba e armazenou-se todas as amostras num frigorífico a 4°C de forma a permitir a futura medição da atividade coagulante das mesmas. Depois dessa análise, as amostras foram congeladas a -80°C até serem necessárias para o resto da caracterização química das mesmas.

2.6 Ensaio de Diafiltração

Para o ensaio de diafiltração foi necessário preparar mais 1.5 L de extrato de cardo, visto que, os 3 L preparados anteriormente foram concentrados no ensaio anterior.

O início do ensaio de diafiltração, passo de estabilização, foi igual ao de concentração. Similarmente ao ensaio anterior, o ensaio começou quando se moveram os tubos de recolha de permeado para uma proveta, de forma a poder acompanhar-se o volume de permeado recolhido ao longo do tempo. À medida que se observou a remoção de 100 mL de permeado, eram adicionados 100 mL de água desionizada à alimentação. Excepcionalmente no início do processo foram adicionados 50 mL de água desionizada de forma a compensar os 50 mL de alimentação removidos na primeira amostra. Quando se atingiu os valores de volume de permeado de 50 mL, 550 mL, 1050 mL e 1550 mL, foram retiradas amostras de permeado e da alimentação, utilizando os mesmos métodos mencionados anteriormente. Quando se obteve um volume de permeado de 1550 mL, desligou-se a bomba e tratou-se as amostras de permeado e de alimentação como no ensaio anterior.

Através dos volumes de permeado removidos foi possível determinar os fatores de diafiltração do processo (F_d) utilizando a equação 2.5-2.

$$F_d = \frac{V_p}{V_a} \quad (2.5-2)$$

onde:

F_d – Fator de diafiltração

V_p – Volume de permeado

V_a – Volume de alimentação

2.7 Caracterização Química do Extrato

2.7.1 Atividade Coagulante

Para entender a influência dos ensaios na atividade enzimática específica do extrato é de extrema importância realizar testes de atividade coagulante. Estes testes foram realizados segundo o protocolo descrito na Norma ISO23058/IDF199:2006.

O primeiro passo foi a preparação do substrato, que neste caso é leite padronizado segundo a norma. Para tal foi utilizado leite magro em pó, que foi reconstituído a 11% (m/v), com uma solução de 0.5 g/L de CaCl_2 . De seguida o pH do leite é ajustado com soluções de hidróxido de Sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) de forma a obter-se um valor de 6,5. Posteriormente, com o auxílio de um banho termostatizado com agitação, a temperatura do leite foi mantida a 32 °C, por 15 min.. De seguida foram transferidos 25 mL de leite a 32 °C para um balão de fundo redondo adicionando, de seguida,

0.5 mL do extrato a ser analisado. Após a adição do extrato colocou-se o balão num rota-vapor com banho termostatizado a 32 °C e esperou-se até observar-se a floculação do leite. Quando o extrato é adicionado ao balão com o leite, começou-se a cronometrar o tempo, parando-se quando se observou a floculação. Ao tempo obtido, deu-se o nome de tempo de coagulação. Todas as análises foram realizadas em duplicado.

É possível visualizar o esquema deste procedimento na figura 2.7-1.

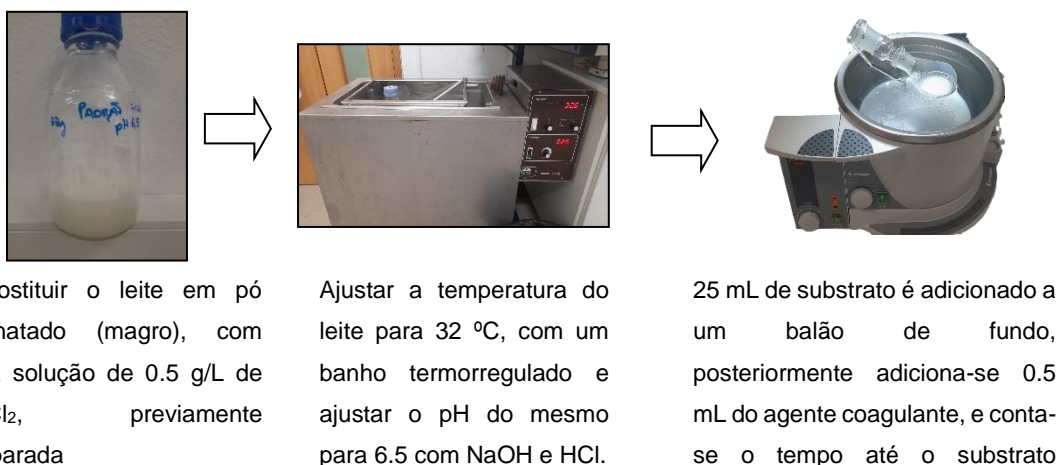


Figura 2.7-1 - Esquema dos ensaios de determinação da atividade coagulante ao leite

2.7.2 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação dos compostos fenólicos, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu. Primeiramente foram preparados os reagentes necessários para o método, que no caso, foram: uma solução de 0.25 N do reagente de Folin-Ciocalteu, preparado por diluição do reagente de Folin-ciocalteu 2 N disponível comercialmente, e uma solução de 1 N de carbonato de sódio.

Adicionalmente foi preparada uma solução mãe de 0.6 g.L⁻¹ de ácido gálico, pela qual foram preparados os padrões presentes na tabela 2.7-1. Estes padrões foram utilizados para realizar uma curva de calibração do método e todos os resultados obtidos do mesmo vêm expressos em mg equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra.

De forma a iniciar o método, foram colocados para *covete* de 0.150 mL de amostra e 2.400 mL de água nanopura. De seguida, foi adicionado o reagente de Folin-Ciocalteu 0.25 N e agitou-se a mistura com um *vortex*, deixando incubar no escuro, por 3 min.. Após a incubação, foram adicionados 0.300 mL de carbonato de sódio 1 N, repetindo-se de seguida a agitação no *vortex*. Por fim realizou-se uma incubação de 2 horas no escuro, lendo depois o valor da absorbância das amostras contra o branco a 725 nm. O branco utilizado foi preparado pelo mesmo método descrito anteriormente, apenas

utilizando metanol 100% como amostra. Todas as amostras foram preparadas em triplicado, incluindo a curva de calibração.

2.7.3 Determinação das proteínas totais

Para a determinação das proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford. Para este método, como reagente, apenas foi utilizado o corante de comassie que sofreu uma diluição de 1:4, sobre o adquirido comercialmente.

Adicionalmente, para a elaboração de uma curva de calibração, foi necessário preparar uma solução mãe de albumina do soro bovino (BSA) de concentração de 2 g/L e uma solução tampão fosfato de 50 mM, preparado a partir de fosfato de potássio trihidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$), cujo pH foi acertado para 6.5 com uma solução de HCl 1 M. Foram preparados os padrões com as concentrações presentes na tabela 2.7-2, onde a solução mãe foi diluída com o tampão fosfato.

Para a elaboração do método apenas foi necessário adicionar 20 μ L do padrão ou da amostra a analisar seguido de 1 mL do corante diluído. De seguida agitou-se no vortex e esperou-se 5 min. de forma ao corante reagir com as bases azotadas dos aminoácidos. Por fim foram medidas as absorbâncias das soluções a 595 nm. Todas as amostras foram preparadas em triplicado.

3 – Resultados e Discussão

3.1 Caracterização das Membranas de Acetato de Celulose

Para permitir a escolha da membrana mais adequada para os processos de concentração e diafiltração do extrato de cardo foi necessário realizar a caracterização das membranas.

3.1.1 Determinação das Permeabilidades Hidráulicas

Após os ensaios de permeabilidade hidráulica, foram obtidos os gráficos como o presente na figura 3.1-1, de onde se determinou a mesma através do declive das retas, como é possível visualizar na equação 1.12-1.

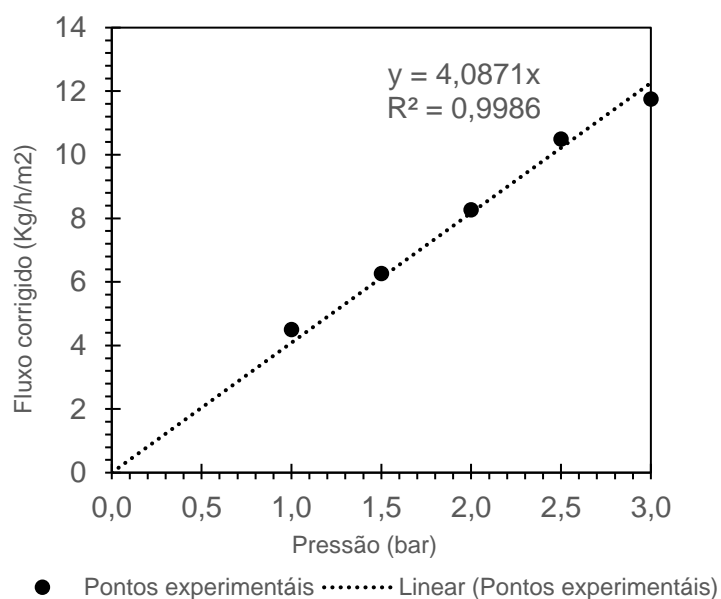


Figura 3.1-1 - Gráfico da permeabilidade hidráulica para a membrana CA-22

Tabela 3.1-1 - Permeabilidade Hidráulica das membranas caracterizadas

Membrana	Permeabilidade Hidráulica (Lp) kg/(m ² .h.bar)
CA-22	4.09
CA-27	29.952
CA-29	32.442
CA-31	58.581

Analisando os resultados da permeabilidade hidráulica, tabela 3.1-1, é fácil de entender que, quando maior a fração de formamida utilizada na formulação da *casting solution* da membrana maior a permeabilidade hidráulica da mesma. Tal resultado era de esperar visto que a formamida tem a função de promotor de poros, sendo que, o aumento na

sua quantidade, irá aumentar a dimensão dos poros, permitindo assim, a criação de mais espaço vazio na membrana que permitirá uma permeação de água mais facilitada.

3.1.2 Determinação dos Coeficientes de Rejeição Aparente aos Sais

Os coeficientes de rejeição aparente aos sais foram determinados pela equação 1.12-2 e estão representados na tabela 3.1-2.

Tabela 3.1-2 - Resultados dos coeficientes de rejeição aparente aos sais

Membrana	Coeficiente de Rejeição Aparente (%)	
	NaCl	NaSO ₄
CA-22	45	60
CA-27	1	15
CA-29	2	13
CA-31	1	10

Os resultados da tabela 3.1-1 mostram que todas as membranas são de UF, uma vez que apresentam valores de f bastante baixos, excluindo a membrana mais “apertada” a CA22.

3.1.3 Determinação dos Limites de Exclusão Molecular

Como explicado anteriormente, foi determinado o limite de exclusão molecular utilizando moléculas orgânicas modelo de diferentes tamanhos moleculares.

Como exemplo é apresentado o gráfico, fig. 3.1-2, utilizado para a determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA22.

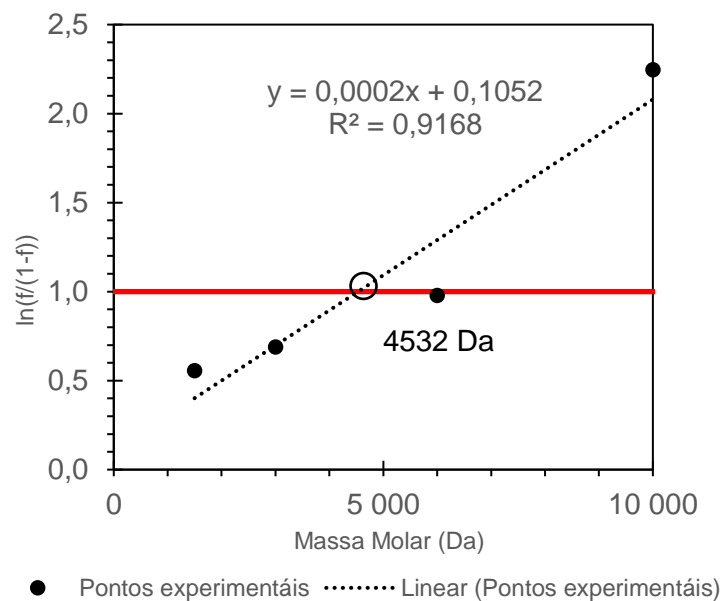


Figura 3.1-2 - Gráfico da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-22

Tabela 3.1-3 - Limites de exclusão molecular das membranas caracterizadas

Membrana	Limite de exclusão molecular (Da)
CA-22	4532
CA-27	10224
CA-29	11547
CA-31	52155

Analisando os valores obtidos para o limite de exclusão molecular, tabela 3.1-3, similarmente aos resultados obtidos para a permeação hidráulica, é possível visualizar que quando a fração de formamida aumenta, o limite de exclusão molecular da membrana também aumenta. A justificação para este fenómeno é a mesma que para a permeabilidade hidráulica visto que, um aumento na quantidade do agente promotor dos poros irá causar um aumento no tamanho médio dos poros, resultado num aumento do limite de exclusão molecular.

3.2 Curvas de calibração dos métodos analíticos

3.2.1 Curva de calibração da atividade coagulante ao leite

Sabendo que, o coeficiente de rejeição aparente às enzimas responsáveis pela coagulação do leite seria muito elevado, foi necessário realizar uma curva de calibração que permitisse relacionar o coeficiente de rejeição aparente às enzimas de coagulação do leite e o tempo de coagulação.

Sendo assim, foram preparadas as diluições presentes na tabela 3.2-1, a partir de um extrato de cardo inicial, preparado pelo método descrito no capítulo 2.3-1, com as quantidades ajustadas de forma a obter apenas 5 mL de extrato final.

Tabela 3.2-1 - Volumes utilizados para a realização das diluições necessárias para a determinação da curva de calibração da atividade coagulante do leite

Fator de diluição (n)	Volume de extrato (mL)	Volume de água (mL)
1	5	0
1.5	3.33	1.67
2	2.5	2.5
4	1.25	3.75
10	0.5	4.5
20	0.25	4.75

Para cada amostra foram determinados os tempos de coagulação do leite como descrito no capítulo 2.7.1. Foram obtidos os resultados presentes na tabela 3.2-2.

Tabela 3.2-2 - Tempos médios de coagulação obtidos, para os diferentes fatores de diluição utilizados

Fator de diluição	Tempo médio de coagulação (s)
1	477
1.5	721
2	936
4	1769
10	4560
20	10080

Posteriormente foi necessário relacionar os fatores de diluição com os coeficientes de rejeição aparente à atividade enzimática de coagulação do leite. Para tal partiu-se das equações 3.2-1, 3.2-2 e 1.12-2.

$$n_A = \frac{C_{APa}}{C_A} \quad (3.2-1)$$

$$n_P = \frac{C_{APa}}{C_{AP}} \quad (3.2-2)$$

Onde:

n_A – Fator de diluição da alimentação em relação ao extrato de cardo padrão

n_p - Fator de diluição do permeado em relação ao extrato de cardo padrão
 C_{APa} – Concentração de enzimas coagulantes do leite do extrato de cardo padrão
 C_A - Concentração de enzimas coagulantes do leite da alimentação
 C_{AP} - Concentração de enzimas coagulantes do leite do Permeado

De seguida dividiu-se o denominador e o numerador por C_{APa} obtendo-se a equação 3.2-3.

$$f_{MCA} = \frac{\frac{C_A}{C_{APa}} - \frac{C_{AP}}{C_{APa}}}{\frac{C_A}{C_{APa}}} \quad (3.2-3)$$

Onde:

f_{MCA} – Coeficiente aparente de rejeição à atividade coagulante de leite
 C_{APa} – Concentração de enzimas coagulantes do leite do extrato de cardo padrão
 C_A - Concentração de enzimas coagulantes do leite da alimentação
 C_{AP} - Concentração de enzimas coagulantes do leite do Permeado

Posteriormente substituiu-se onde possível os fatores de concentração por n_A e n_P obtendo-se a equação 3.2-4.

$$f_{MCA} = \frac{\frac{1}{n_A} - \frac{1}{n_P}}{\frac{1}{n_A}} \quad (3.2-4)$$

Onde:

f_{MCA} – Coeficiente aparente de rejeição à atividade coagulante de leite
 n_A – Fator de diluição da alimentação em relação ao extrato de cardo padrão
 n_P - Fator de diluição do permeado em relação ao extrato de cardo padrão

Por fim, desenvolveu-se a equação até obter-se a equação 3.2-5, que relaciona os fatores de diluição da alimentação e do permeado e relação ao extrato padrão com o coeficiente de rejeição aparente à atividade coagulante do leite.

$$f_{MCA} = 1 - \frac{n_A}{n_P} \quad (3.2-5)$$

Onde:

f_{MCA} – Coeficiente aparente de rejeição à atividade coagulante de leite
 n_A – Fator de diluição da alimentação em relação ao extrato de cardo padrão
 n_P - Fator de diluição do permeado em relação ao extrato de cardo padrão

Utilizando a equação 3.2-5, considerando que o fator de diluição da alimentação é 1 e o fator de diluição do permeado tem o valor dos extratos diluídos preparados para a curva de calibração é possível obter os valores da tabela 3.2-3.

Tabela 3.2-3 - Valores utilizados para a obtenção da curva de calibração da atividade coagulante do leite

Fator de diluição	f_{MCA} (%)	Tempo de coagulação (t) (s)	$\frac{1}{t}$ (s^{-1}) $\times 10^4$
1	0	477	20.96
1.5	33	721	13.87
2	50	936	10.68
4	75	1769	5.65
10	90	4560	2.19
20	95	10080	0.99

Através da análise dos dados presentes na tabela 3.2-3 foi possível visualizar um comportamento linear entre o coeficiente de rejeição aparente à atividade coagulante do leite e o inverso do tempo de coagulação, obteve-se assim a reta de calibração presente na figura 3.2-1

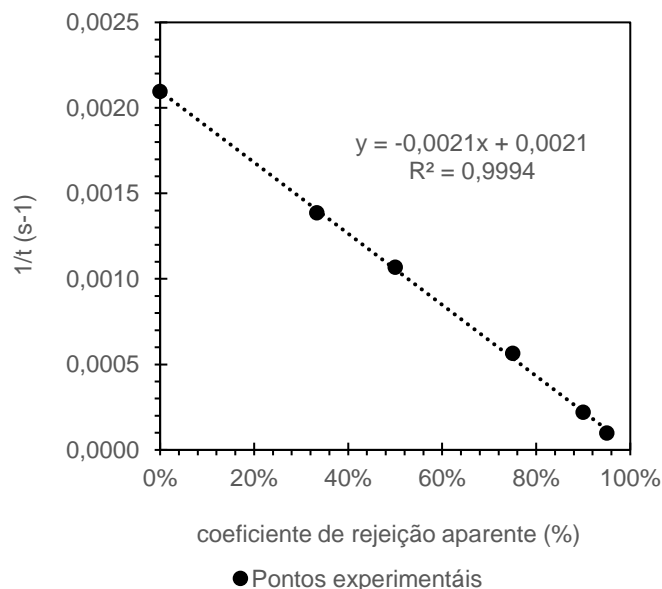


Figura 3.2-1 - Curva de calibração para a determinação do tempo de coagulação do leite para diferentes coeficientes de rejeição aparentes

3.2.2 Curva de calibração do método de Folin-Ciocalteu

Como explicado no capítulo 2.7.2, foi necessário realizar uma curva de calibração utilizando os padrões da tabela 2.7-1. Sendo assim obteve-se a reta de calibração presente na figura 3.2-2, com os valores presentes na tabela 3.2-3.

Tabela 3.2-4 - Valores de absorbância obtidos para os diferentes padrões utilizados no método de Folin-Ciocalteu

Concentração (mg/mL)	Absorbância
0.0025	0.0157
0.0050	0.0173
0.0100	0.0447
0.0250	0.0957
0.0500	0.2410
0.1000	0.4270
0.1500	0.5953
0.2000	0.6787

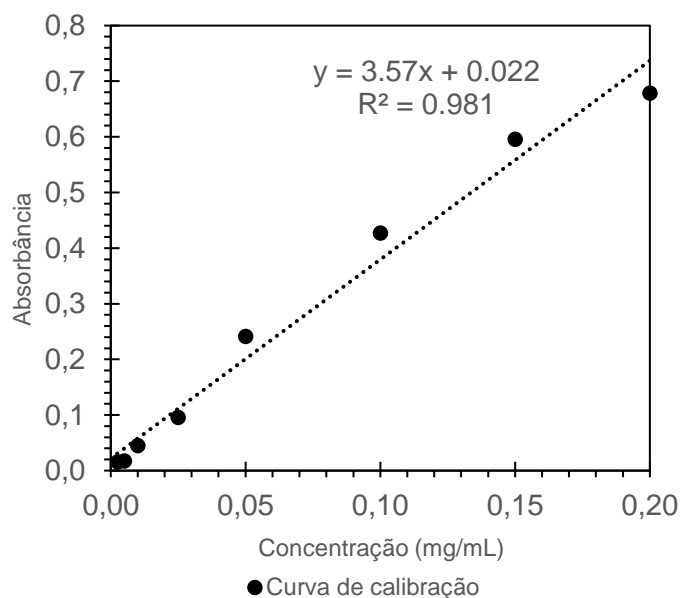


Figura 3.2-2 - Gráfico da curva de calibração do método de Folin-Ciocalteu

Esta curva de calibração foi utilizada posteriormente para obter a concentração dos compostos fenólicos totais em mg equivalente de catequina por mL de extrato

3.2.3 Curva de calibração do método de Bradford

Como explicado no capítulo 2.7.3, foi necessário realizar uma curva de calibração utilizando os padrões da tabela 2.7-2. Sendo assim obteve-se a reta de calibração presente na figura 3.2-3, com os valores presentes na tabela 3.2-4.

Tabela 3.2-5 - Valores de absorvância obtidos para os diferentes padrões utilizados no método de Bradford

Concentração (mg/L)	Absorvância
0	0.0000
20	0.0313
60	0.0273
80	0.0333
100	0.0250
200	0.1533
400	0.2303
800	0.4857
1000	0.6037

De forma a obter a melhor curva de calibração possível, foi necessário descartar 2 pontos considerados *outliers*, nomeadamente o valor do padrão de concentração 20 mg/L e 100 mg/L.

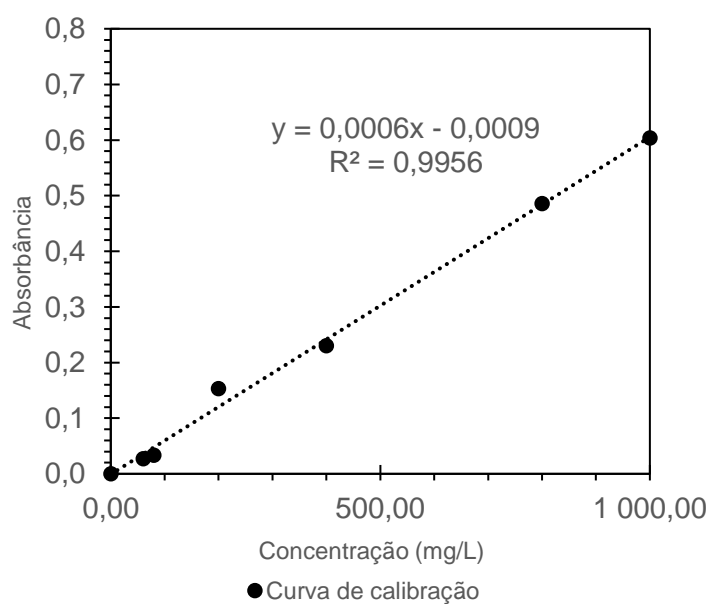


Figura 3.2-3 - Gráfico da curva de calibração do método de Bradford

Esta curva de calibração foi utilizada posteriormente para obter a concentração das proteínas totais em mg equivalente de BSA por mL de extrato

3.3 Estudo da Seleção da Membrana e da Pressão de Operação.

Posteriormente à caracterização das membranas foi necessário realizar testes preliminares para a seleção das membranas. Para tal, como explicado anteriormente, foram realizados ensaios em refluxo total, tirando amostras de permeado e alimentação para cada membrana. Sendo assim foram primeiramente obtidos diferentes fluxos de permeado para as diferentes membranas, representado na figura 3.3-1.

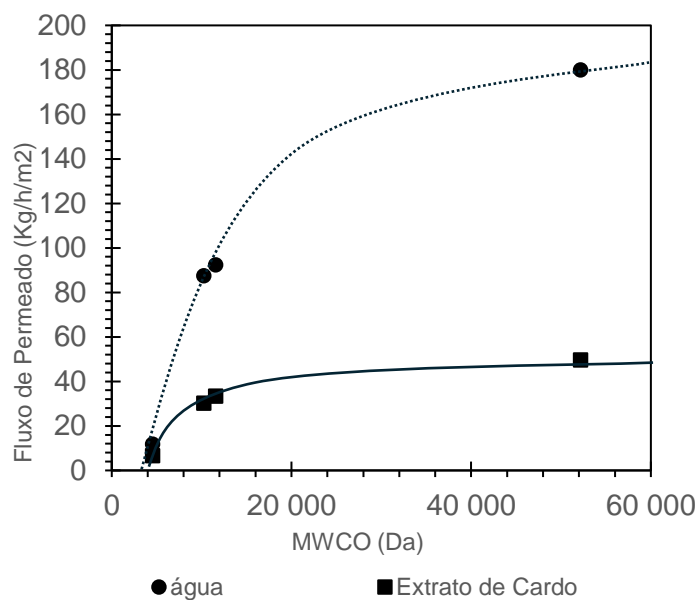


Figura 3.3-1 - Fluxos de Permeado com água e com o extrato de cardo para as diferentes membranas

É possível visualizar que o fluxo de permeado aumenta, tanto com água como com o extrato, em consequência com o aumento do limite de exclusão molecular das membranas utilizadas. No entanto, é de denotar que o aumento do fluxo de permeado é muito menor com o extrato do que com a água. Tal acontece visto que o extrato de flor de cardo tem uma composição complexa, com moléculas de grande dimensão, intensificando os fenómenos de colmatação das membranas. Adicionalmente, esta diminuição é mais significativa em membranas de maior dimensão devido aos

fenómenos de polarização de concentração que causam maiores acumulação de solutos na superfície da membrana bloqueando os poros das mesmas.

Aliado ao estudo do fluxo de permeado, também foram realizados diversos testes analíticos às amostras de permeado e de alimentação, sendo assim, foram realizadas as análises mencionadas anteriormente, sendo estas, a atividade coagulante ao leite (MCA), os compostos fenólicos totais (TPC), as proteínas totais (TP) e o carbono orgânico total (TOC).

É possível analisar os resultados obtidos nas figuras 3.3-2 a 3.3-4 e na tabela 3.3-1.

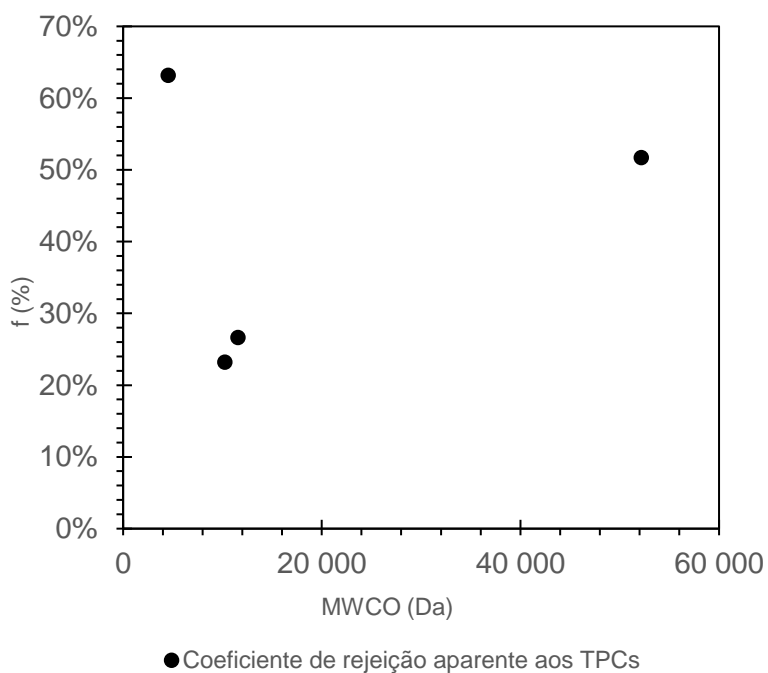


Figura 3.3-2 - Coeficiente de rejeição aparente ao TPC para as diferentes membranas

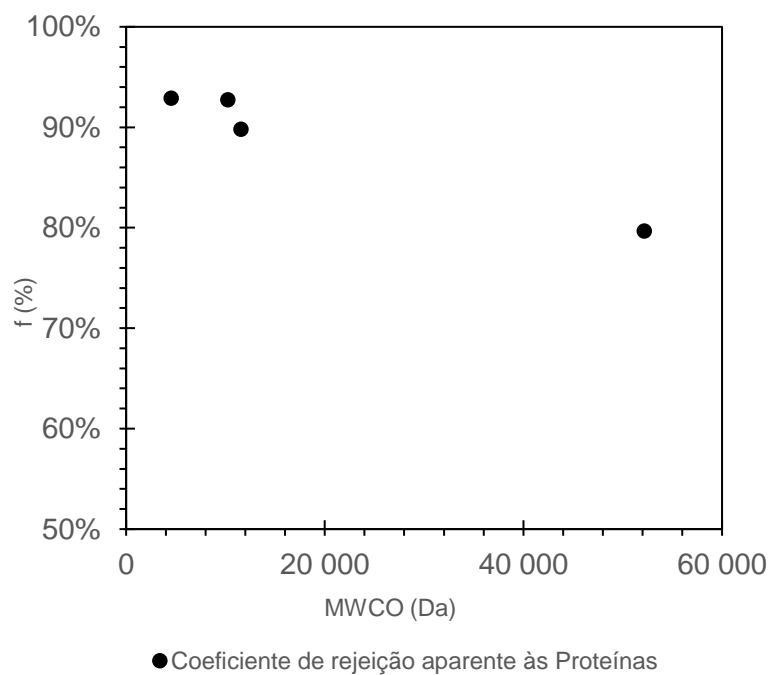


Figura 3.3-3 - Coeficiente de rejeição aparente às Proteínas para as diferentes membranas

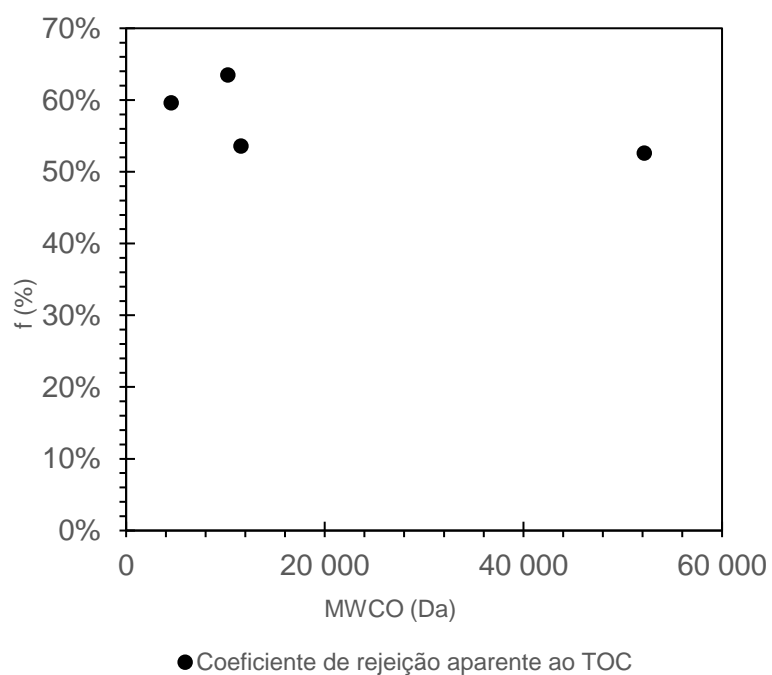


Figura 3.3-4 - Coeficiente de rejeição aparente ao TOC para as diferentes membranas

Tabela 3.3-1 - Coeficiente de rejeição aparente à MCA para as diferentes membranas

Membrana	MWCO (Da)	Tempo de coagulação do permeado (h)	Tempo de coagulação da alimentação (s)	f ao MCA (%)
CA-22	4533	>2	412.5	>90
CA-27	10224	>2	440.0	>90
CA-29	11548	>2	438.5	>90
CA-31	52155	>2	436.0	>90

Analisando os resultados obtidos é possível observar que para todas as membranas, o coeficiente de rejeição aparente às proteínas é superior ao coeficiente de rejeição aparente aos TPCs. Isto acontece devido ao tamanho molecular destes dois tipos de solutos, visto que, por norma, as proteínas têm dimensões superiores aos compostos fenólicos. Também é possível visualizar que o coeficiente de rejeição aparente para ambos solutos é menor para a membrana de maior tamanho molecular (CA-31), isto poderia ser problemático, principalmente devido ao facto do coeficiente de rejeição às proteínas, visto que as moléculas de interesse, Cardosina A e B, são proteínas, e ao facto de um menor coeficiente de rejeição aparente às proteínas poder resultar na perda de cardosina A e B para o permeado e conseqüente perda de atividade enzimática específica à coagulação do leite. No entanto, na tabela 3.3-1 é possível observar que o coeficiente de rejeição aparente em relação à atividade de coagulação ao leite é superior em a 90% em todas as membranas, sendo assim considerou-se que apenas estava a existir perda significativa de proteínas desnecessárias na coagulação do leite.

Dito isto, foi considerado (tendo em conta o fluxo e os testes analíticos) que a membrana CA-31 seria a mais promissora para a concentração e diafiltração do extrato de flor de cardo, sendo assim, em todos os ensaios posteriores foram utilizadas unicamente estas membrana.

Após a seleção da membrana foi necessário seleccionar a pressão de funcionamento que maximiza o fluxo para esta membrana. Sendo assim obtiveram-se os resultados de variação de fluxo de permeado presentes na figura 3.3-5.

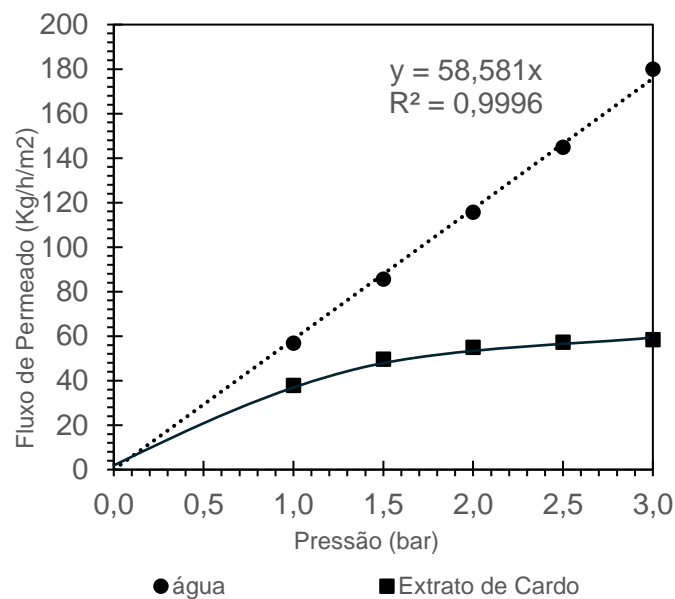


Figura 3.3-5 - Variação do fluxo de permeado com água e com o extrato de flor de cardo, para a membrana CA-31, a diferentes pressões de funcionamento

Realizaram-se também análises à MCA das amostras da alimentação e do permeado para as diversas pressões, obtendo-se os resultados presentes na tabela 3.3-2.

Tabela 3.3-2 - Coeficiente de rejeição aparente à MCA para a membrana CA-31, a diferentes pressões de funcionamento

Pressão (Bar)	Tempo de coagulação do permeado (h)	Tempo de coagulação da alimentação (s)	f ao MCA (%)
1	>2	567.5	>90
1.5	>2	580.0	>90
2	>2	567.0	>90
2.5	>2	565.0	>90
3	>2	526.0	>90

Analisando a tabela 3.3-2, foi possível perceber que a variação da pressão não influencia significativamente o coeficiente de rejeição aparente à MCA, sendo assim para a escolha da pressão apenas foi levado em consideração a pressão que maximizava o fluxo de permeado.

Observando o gráfico presente na figura 3.3-5, é possível visualizar que, a partir da pressão de 1.5 bar, o fluxo de permeado tende a estabilizar. Tal acontece devido ao aumento da polarização de concentração e da colmatação da membrana a pressões

mais elevadas de funcionamento. Sendo assim, o suposto aumento de fluxo devido ao aumento da força motriz deste processo, a pressão, é contrariado pela obstrução dos poros por moléculas de maior dimensão. Nestes casos o fluxo irá estabilizar a um determinado valor de pressão – Fluxo Limite. Neste caso, considerou-se que a partir da pressão 1.5 bar, o fluxo já não aumenta significativamente, sendo por isso, esta a pressão que maximiza o fluxo, minimizando os custos energéticos referentes ao aumento da pressão de funcionamento do módulo.

Dito isto, foi decidido que a pressão de 1.5 bar seria a mais indicada para os ensaios de concentração e diafiltração.

3.4 Ensaio de Concentração

Após a realização dos ensaios preliminares de escolha de membrana e pressão de funcionamento foi então realizado o ensaio de concentração segundo a metodologia descrita no capítulo 2.5

O primeiro parâmetro importante de analisar é a variação do fluxo de permeado ao longo do tempo e do fator de concentração, figuras 3.4-1 e 3.4-2, respetivamente.

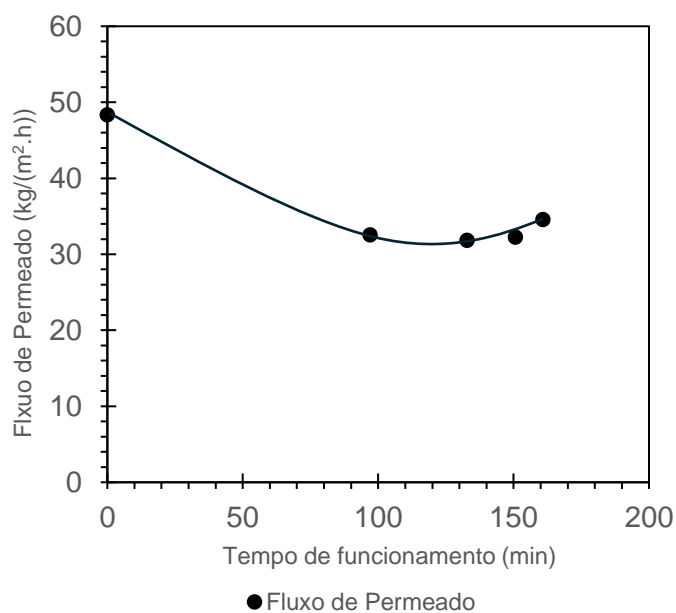


Figura 3.4-1 - Fluxo de permeado ao longo do tempo, no ensaio de concentração

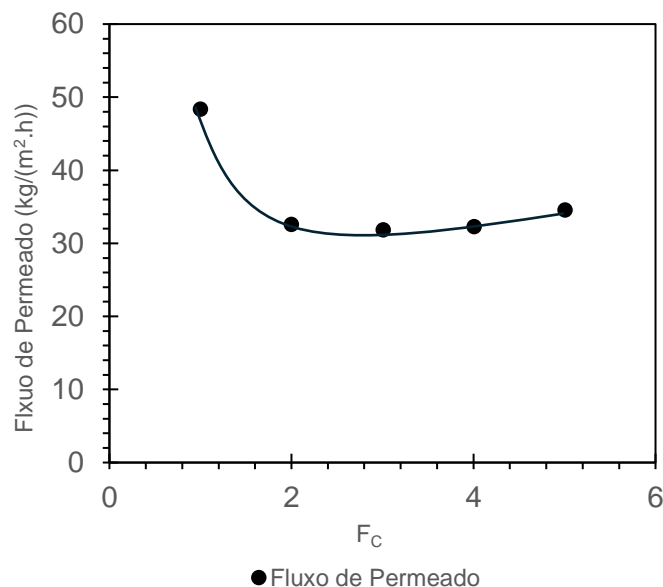


Figura 3.4-2 - Fluxo de permeado em relação do F_c , no ensaio de concentração

Analisando as figuras 3.4-1 e 3.4-2 é possível visualizar que o fluxo de permeado no início do ensaio é cerca de 50 kg/(m².h), o que é um valor relativamente elevado. No entanto pouco depois do início do ensaio existe uma redução de cerca de 30% neste fluxo, diminuindo para valores perto dos 32 kg/(m².h). Esta redução, como explicado anteriormente, deve-se à colmatagem e polarização de concentração na membrana, o que causam uma diminuição na transferência de massa e a respetiva redução no fluxo. De qualquer modo, após a redução inicial o fluxo manteve-se aproximadamente constante pelo resto do ensaio, muito provavelmente, por ter sido alcançado o equilíbrio do sistema.

Como explicado anteriormente, foram realizadas análises físico-químicas às amostras do permeado e do concentrado retiradas ao longo do ensaio, obtendo-se os gráficos presentes nas figuras 3.4-3 a 3.4-6.

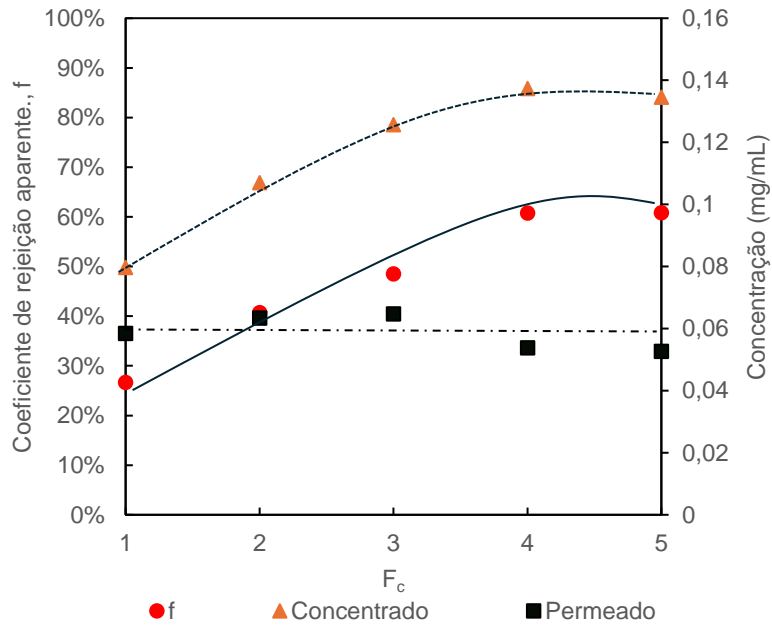


Figura 3.4-3 - Resultados do TPC do ensaio de concentração

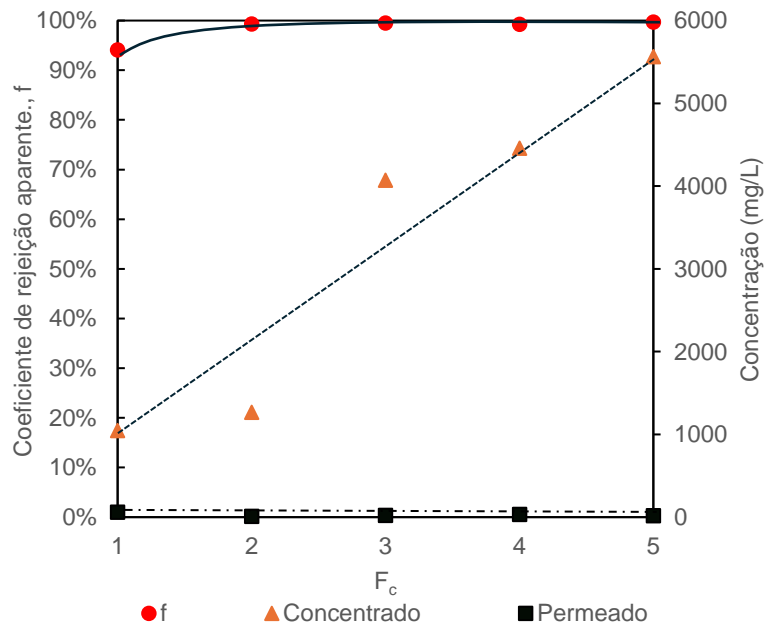


Figura 3.4-4 - Resultados do TP do ensaio de concentração

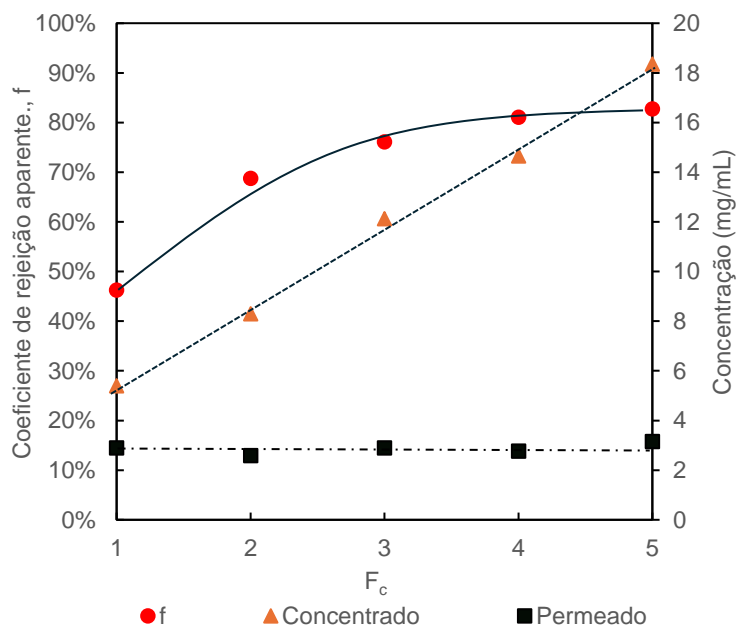


Figura 3.4-5 - Resultados do TOC do ensaio de concentração

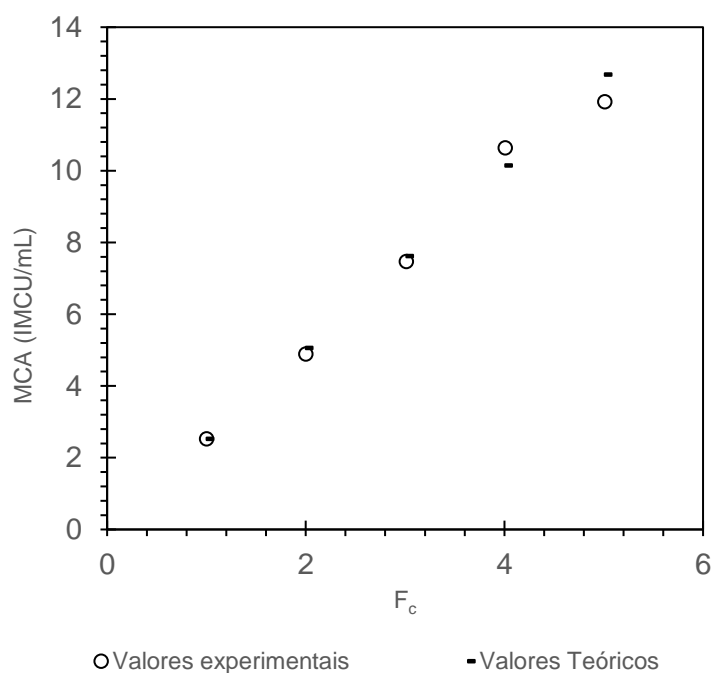


Figura 3.4-6 - Resultados da MCA do ensaio de concentração

Analisando as figuras 3.4-3 a 3.4-5 é possível observar que, independentemente dos compostos, o coeficiente de rejeição aparente aumenta ao longo do processo de concentração. Tal acontece visto que, no início do processo, existe uma maior quantidade molar de solutos com tamanho molecular inferior aos poros da membrana,

no entanto, ao longo do processo estas moléculas não irão ser rejeitadas em grande quantidade pela membrana, sendo assim perdidas para o permeado que é descartado, isto resultará num aumento contínuo na percentagem de compostos de maior tamanho molecular que os poros da membrana, resultando num coeficiente de rejeição global maior.

Quanto ao coeficiente de rejeição aparente ao TPC, foi possível visualizar que inicialmente o coeficiente de rejeição é relativamente baixo, sendo este inferior a 30%, no entanto, ao longo do processo de concentração este aumenta, alcançando um valor final de cerca de 60%, onde este valor estabiliza. Esta poderá ser justificada pela perda dos compostos fenólicos de menor dimensão, apenas restando os compostos fenólicos com dimensões que permitam um coeficiente de rejeição aparente perto do 60%.

Foi também possível reparar que o coeficiente de rejeição aparente para as proteínas é muito elevado, alcançando valores de quase 100% no final da concentração. Este resultado é positivo, visto que, a perda de enzima, um subgrupo das proteínas também é baixo. Este resultado é facilmente justificado pelo tamanho molecular das proteínas, sendo que estas têm um tamanho muito elevado, devendo assim ser rejeitadas quase na íntegra pela membrana.

Em relação ao coeficiente de rejeição aparente ao TOC, inicialmente foi observado um valor de cerca de 50%, aumentando para 80% no final da concentração. É possível observar que este valor está entre os valores obtidos para os compostos fenólicos e para as proteínas, tal era de esperar visto que o TOC incluía ambos os tipos de composto, e adicionalmente todos os outros compostos orgânicos.

Em relação ao gráfico da figura 3.4-6 é possível observar que os valores teóricos para a atividade enzimática são muito semelhantes aos valores obtidos experimentalmente, sendo assim, é possível concluir que não existiu perda significativa para o permeado de compostos que facultem essa atividade enzimática. Tal fator é decisivo para a exequibilidade deste processo, visto que, caso existisse perda significativa de atividade enzimática, este processo não seria viável industrialmente.

Os valores teóricos presentes no gráfico da figura 3.4-6 foram determinados pela equação 3.4-1.

$$A_T = A_0 \times F_c \quad (3.4-1)$$

Onde:

A_T – Atividade enzimática para a coagulação do leite teórica

A_0 – Atividade enzimática para a coagulação do leite experimental inicial

F_c – Fator de concentração

Após a análise do gráfico 3.4.3 a 3.4.6, foi possível observar um aumento maior para o coeficiente de rejeição aparente ao TOC do que às proteínas, sendo assim decidiu-se determinar através da equação 3.4-2 a razão entre a concentração de proteínas e a concentração de carbono orgânico total.

$$Rz = \frac{C_{PT}}{C_{TOC}}$$

Onde:

Rz – Razão entre a concentração de proteínas e TOC.

C_{PT} – Concentração de proteínas

C_{TOC} – Concentração de TOC

Sendo assim é possível observar o gráfico desta razão na figura 3.4-7.

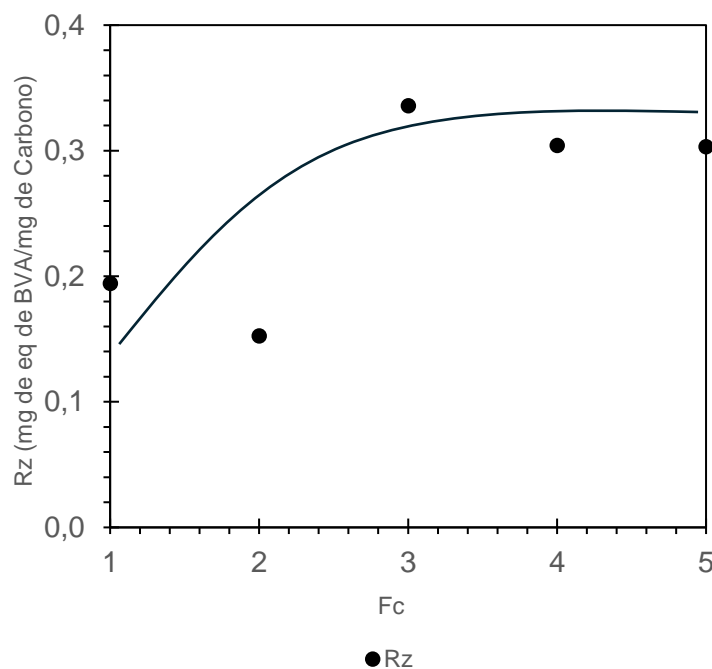


Figura 3.4-7 - Resultados da Rz do ensaio de concentração

Analisando a figura 3.4-7 é possível observar que o rácio de proteínas/TOC aumenta de 0.2 para 0.3 mg de eq de BVA/mg de Carbono. Tal era de esperar visto que a proteínas são dos compostos orgânico de maior dimensão, sendo assim são rejeitados mais facilmente que os outros compostos orgânicos de menor dimensão, aumentado por sua

vez a sua fração parcial no extrato. Sendo assim, esta razão poderá ser utilizada futuramente para determinar o momento de paragem da diafiltração.

3.5 Ensaio de Diafiltração

Após os ensaios de concentração foram realizados os ensaios de diafiltração. Similarmente aos ensaios de concentração o primeiro parâmetro a analisar foi o fluxo de permeado fazendo variar o fator de diafiltração e ao longo do tempo. É possível visualizar nos gráficos 3.5-1 e 3.5-2 os fluxos de permeado em função do fator de diafiltração e em função do tempo longo do tempo, respetivamente.

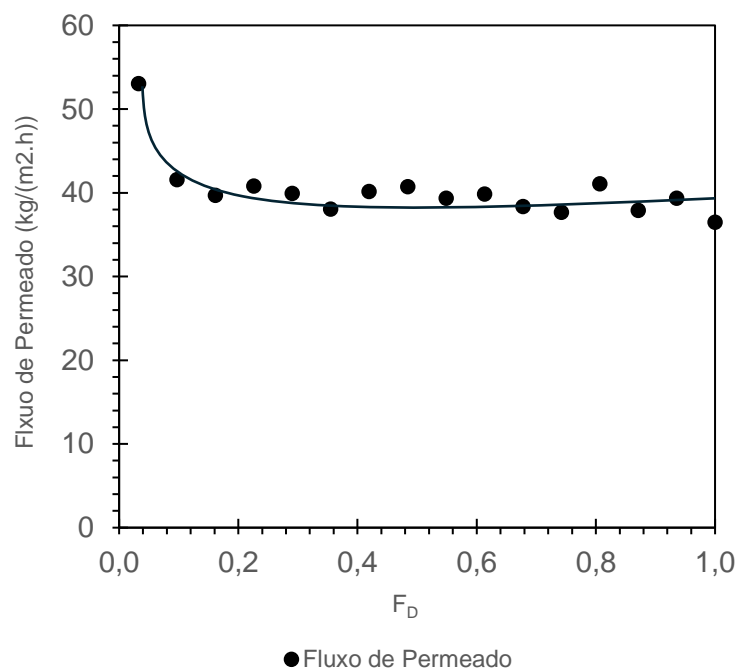


Figura 3.5-1 - Fluxo de permeado em função do fator de diafiltração, no ensaio de diafiltração

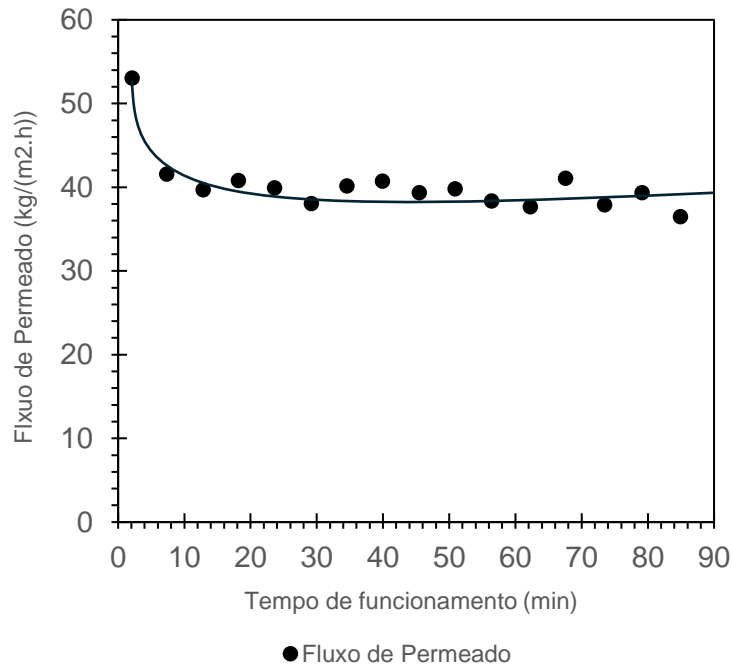


Figura 3.5-2 - Fluxo de permeado em função do tempo, no ensaio de diafiltração

Como é possível observar, o fluxo de permeado começa num valor próximo a $55 \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, mas rapidamente, em cerca de 10 min., desce para um valor de cerca de $40 \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, onde estabiliza pelo resto do ensaio, decréscimo de 25%. Este resultado é superior ao obtido no ensaio de concentração, onde o decréscimo foi de 40%. Tal como no processo de concentração, este fenómeno deve-se à polarização de concentração à superfície da membrana e é como esperado menos importante nos ensaios de diafiltração.

De seguida, tal como no ensaio de concentração, foram obtidos os resultados dos testes analíticos presentes na figura 3.5-3 a 3.5-6.

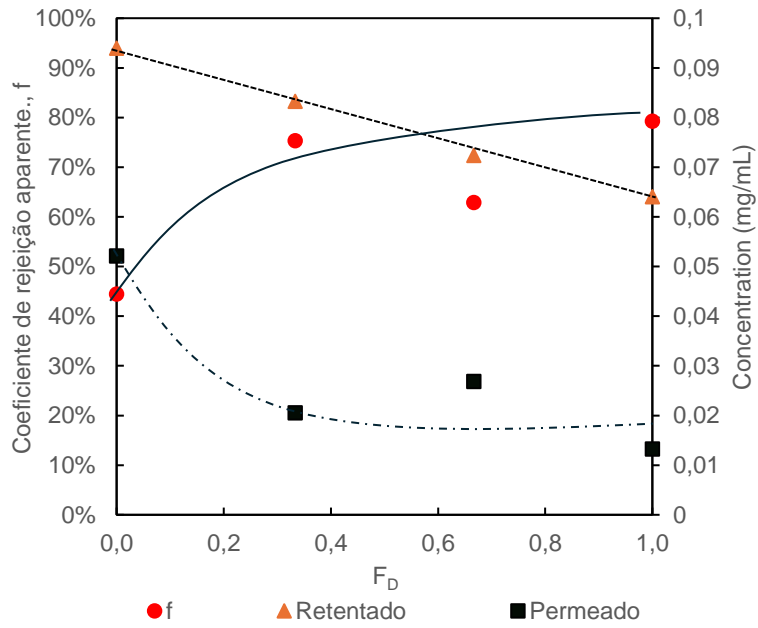


Figura 3.5-3 - Resultados do TPC do ensaio de diafiltração

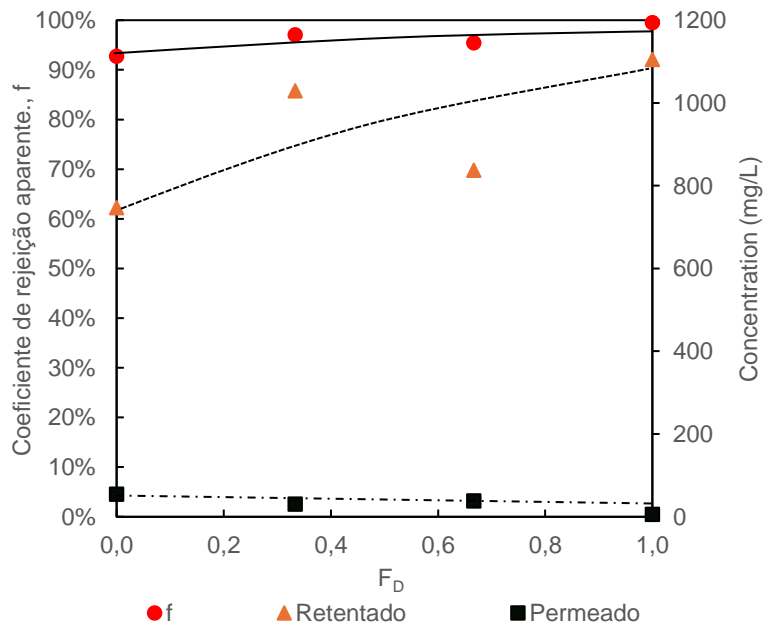


Figura 3.5-4 - Resultados do TP do ensaio de diafiltração

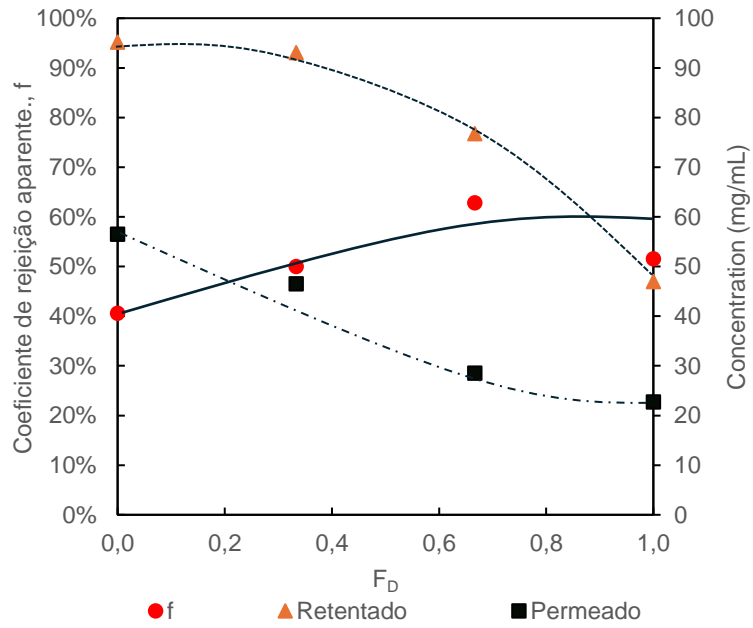


Figura 3.5-5 - Resultados do TOC do ensaio de concentração

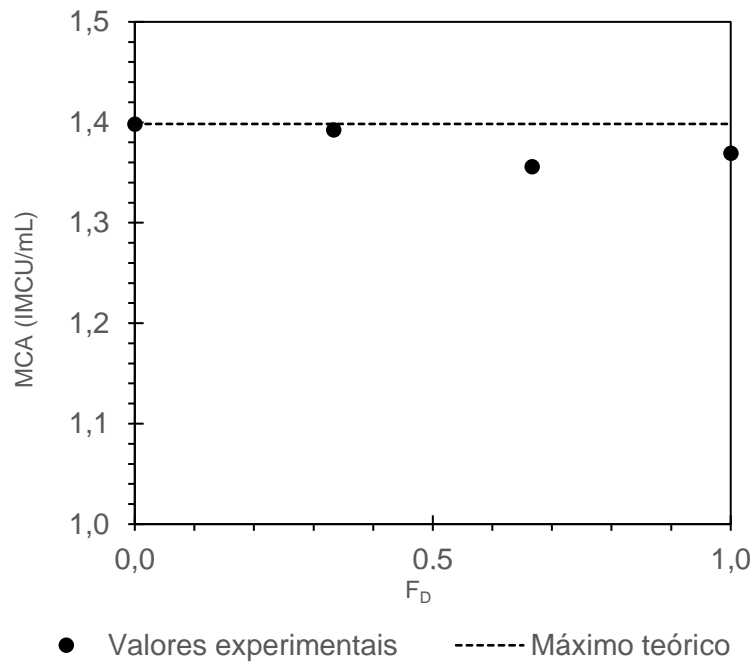


Figura 3.5-6 - Resultados da MCA do ensaio de diafiltração

Analisando a figura 3.5-3, é possível observar que o coeficiente de rejeição aparente ao TPC tem um valor relativamente baixo, de cerca de 40%, no entanto no final da diafiltração é possível obter um coeficiente de 80%. Tal pode significar a perda dos polifenóis de baixo tamanho molecular e a manutenção da concentração dos polifenóis de maior tamanho molecular.

Em relação às proteínas totais é possível observar na figura 3.5-4 que o coeficiente de rejeição aparente à mesma apresenta um valor inicial elevado, cerca de 92%, muito semelhante ao teste de concentração. No final do ensaio foi possível obter um coeficiente de rejeição aparente perto dos 100%, tal como no ensaio de concentração. No entanto, foi possível observar que esta rejeição só foi obtida mesmo no final do ensaio, ao contrário do ensaio de concentração, onde foi possível obter esta rejeições numa fase relativamente inicial do processo.

Quanto ao TOC, analisando a figura 3.5-5 é possível observar um coeficiente de rejeição aparente de cerca de 40%, muito semelhante ao coeficiente de rejeição aparente inicial ao TPC. No entanto, no final do ensaio apenas foi possível obter coeficiente de rejeição de cerca de 60% para o TOC, em relação aos 80% e 100% obtidos para o TPC e TP, respetivamente. Uma possível justificação é a existência de hidrocarbonetos pequenos, tais como os iões do tampão acetato utilizado, que serão descartados quase na integra para o permeado e não são repostos pelo *make-up* de água desionizada. Sendo assim, seria de esperar, que continuando a diafiltração, seria possível obter um coeficiente de rejeição aparente ao TOC superior ao obtido neste ensaio.

Por último é possível observar na figura 3.5-6, que não existiu perda significativa de atividade enzimática, mantendo assim a viabilidade deste processo de diafiltração.

Após analisar os resultados obtidos foi necessário tentar descobrir um parâmetro interessante que possa levar à decisão de quanto parar a diafiltração. Sendo assim foi decidido analisar a possibilidade de utilizar a razão entre as proteínas totais e o TOC. Obteve-se então os resultados presentes na figura 3.5-7.

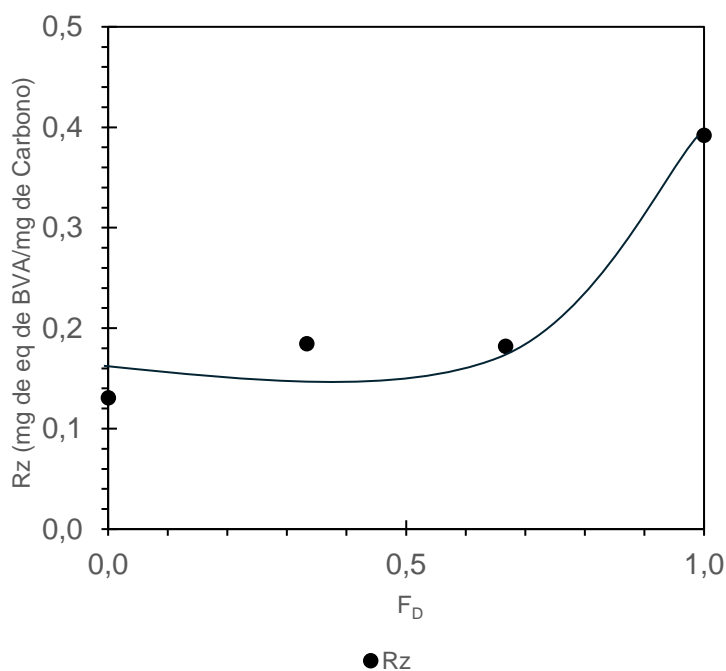


Figura 3.5-7 - Resultados da R_z do ensaio de diafiltração

O que se esperava da razão entre as proteínas e o carbono orgânico total, seria que ao longo do processo, esta razão aumentasse, até se atingir um valor máximo onde esta iria estabilizar, no entanto, como é possível observar na figura 3.5-7, até de um fator de diafiltração de 2/3 esta razão manteve-se aproximadamente constante, aumentando significativamente para um valor de 0.4 entre os fatores de diafiltração de 2/3 e 1. Sendo assim será de extrema importância repetir este ensaio até fatores de diafiltração maiores de forma a tentar obter-se este valor máximo de razão. Adicionalmente, para entender se este parâmetro é adequado como parâmetro determinante para calcular o momento de paragem de diafiltração, é necessário entender como esta razão irá influenciar o produto final obtido da coagulação do leite, o queijo. Caso se verifique a importância deste parâmetro será necessário definir qual o valor da razão que irá maximizar a qualidade do queijo.

4 – Conclusões

No decorrer deste trabalho foi possível retirar diversas conclusões que permitem a melhor compreensão do processo de concentração e diafiltração do extrato de flor de cardo.

Primeiramente, foi possível verificar, como esperado que as membranas de ultrafiltração são indicadas para este processo, descartando-se a necessidade de utilizar membranas mais “apertadas” como a CA-22.

Posteriormente, foi possível verificar que tanto o processo de concentração como o processo de diafiltração foram possíveis de realizar com fluxos relativamente elevados a pressões baixas, confirmando-se que os fenômenos de polarização de concentração e colmatação da membrana, limitam o fluxo máximo de permeado que é possível alcançar, causando a pouca efetividade do aumento da pressão no aumento do fluxo de permeado para valores acima de 1.5 bar. De qualquer modo, este resultado é bastante positivo para a possível rentabilidade do processo visto que o processo poderá ser realizado a baixas pressões, diminuindo os seus custos energéticos.

Focando-nos apenas nos resultados da concentração, concluiu-se que a concentração do extrato foi possível com perdas indetectáveis de atividade enzimática. Como explicado anteriormente, tal deve-se, provavelmente, a manutenção das enzimas responsáveis pela mesma no concentrado, como seria de esperar devido ao tamanho elevado das moléculas destas enzimas.

Além disso foi possível concluir também que durante o processo de concentração o perfil químico do extrato foi alterado ligeiramente, visto que, a concentração de proteínas aumentou muito mais do que a concentração de TOC. Este resultado poderá ter alguma influência no desempenho do extrato como agente coagulante, no entanto, serão necessários testes sensoriais e químicos ao queijo preparado com este extrato para retirar mais conclusões sobre a eficácia deste processo.

Quanto à diafiltração, foi possível alterar o perfil químico do extrato, mantendo a atividade enzimática e diminuindo a concentração dos outros compostos orgânicos não responsáveis pela mesma. Foi também possível visualizar que a razão entre a TP e o TOC aumentou com o processo de diafiltração, concluindo-se que este parâmetro pode ser fundamental para a determinação do momento de paragem da diafiltração.

Dito isto, o presente trabalho tinha como objetivo ser um ponto de partida para a determinação a viabilidade deste processo, sendo necessário ainda muito trabalho futuro para efetuar a sua otimização.

Também será necessário a produção de queijo a partir de extrato submetido ao processo de diafiltração e concentração, de forma a comparar o perfil químico e sensorial dos queijos resultantes. Será de extrema importância também, no caso dos

extratos obtidos por diafiltração, estudar qual o efeito de diferentes razões TP/TOC no perfil químico e sensorial do queijo.

Paralelamente a este teste, também será de extrema importância estudar a utilização de membranas de microfiltração para o passo de clarificação previa do extrato, visto que a utilização de papel de filtro torna-se um processo muito moroso aquando da produção de elevadas quantidades de extrato.

Em suma este trabalho permitiu concluir a viabilidade dos processos membranares, a uma escala laboratorial, com quantidades relativamente pequenas de extrato, sendo ainda necessários diversos testes para concluir a efetividade do processo proposto a larga escala e a influência deste processo no perfil químico e sensorial dos queijos produzidos com extratos submetidos aos mesmos.

5 – Bibliografia

- (1) Perry, K. S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. *Quim Nova* **2004**, 27 (2), 293–300. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000200020>.
- (2) Marques, J. Avaliação Da Qualidade Microbiológica de Leite Pasteurizado Como Matéria-Prima e de Queijo Flamengo Como Produto Final. . Master, Universidade do Porto, Porto, 1997.
- (3) Oliveira, T. Evolução Ao Longo Do Tempo de Vida Útil Do Teor Micorbiológico de Queijos Frescos Mantidos Sob Refrigeração Doméstica. Masters, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- (4) Veiga, S. Qualidade Microbiológica e Físico-Química de Queijos Comercializados Em Portugal, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.
- (5) Kongo, J. M.; Malcata, F. X. Cheese: Types of Cheeses. In *Encyclopedia of Food and Health*; Elsevier Ref. Module Food Sci, 2016; pp 768–773.
- (6) Kongo, J. M.; Malcata, F. X. Cheese: Chemistry and Microbiology. In *Encyclopedia of Food and Health*; Elsevier Ref. Module Food Sci, 2016; pp 740–753.
- (7) Kongo, J. M.; Malcata, F. X. Cheese: Processing and Sensory Properties. In *Elsevier Ref. Module Food Sci*; Elsevier Ref. Module Food Sci, 2016; pp 748–754.
- (8) Luquet, F. M. *O Leite – Leites, Queijos e Produtos Derivados*; Publicações Europa-América, Lda.: Mem Martins, 1985; Vol. 2.
- (9) Barbosa, M.; Vieira De Sá, F. *O Leite e Os Seus Produtos Linhas de Desenvolvimento. Qualidade. Tecnologia*, 5ª edição.; Clássica editora, 1990.
- (10) Gomes, S. Qualidade Do Leite Cru de Ovinos Da Área Geográfica de Produção Do Queijo Terrincho DOP (Trás-Os-Montes): Dos Factores de Produção Animal à Qualidade Do Queijo. Relatório Final de Estágio Profissional para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, 2012.
- (11) Morris, G. A. The Self-Assembly and Structure of Caseins in Solution. *Biotechnol Genet Eng Rev* **2002**, 19 (1), 357–376. <https://doi.org/10.1080/02648725.2002.10648034>.
- (12) Fresno, M.; Argüello, A.; Torres, A.; Castro, N.; Álvarez, S.; Sepe, L. Invited Review. Milk Clotting Enzymes: A Transcendental Decision in Goat’s Milk Cheese

- Quality. *Small Ruminant Research* **2023**, *229*, 107147. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2023.107147>.
- (13) Jacob, M.; Jaros, D.; Rohm, H. Recent Advances in Milk Clotting Enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. February 2011, pp 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>.
- (14) García, V.; Rovira, S.; Teruel, R.; Boutoial, K.; Rodríguez, J.; Roa, I.; López, M. B. Effect of Vegetable Coagulant, Microbial Coagulant and Calf Rennet on Physicochemical, Proteolysis, Sensory and Texture Profiles of Fresh Goats Cheese. *Dairy Sci Technol* **2012**, *92* (6), 691–707. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0086-1>.
- (15) Şeker, Ş.; Beyenal, H.; Ayhan, F.; Tanyolaç, A. Production of Microbial Rennin from *Mucor Miehei* in a Continuously Fed Fermenter. *Enzyme Microb Technol* **1998**, *23* (7–8), 469–474. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00077-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00077-5).
- (16) Ben Amira, A.; Besbes, S.; Attia, H.; Blecker, C. Milk-Clotting Properties of Plant Rennets and Their Enzymatic, Rheological, and Sensory Role in Cheese Making: A Review. *International Journal of Food Properties*. Taylor and Francis Inc. December 18, 2017, pp S76–S93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>.
- (17) Gomes, S.; Belo, A. T.; Alvarenga, N.; Dias, J.; Lage, P.; Pinheiro, C.; Pinto-Cruz, C.; Brás, T.; Duarte, M. F.; Martins, A. P. L. Characterization of *Cynara Cardunculus* L. Flower from Alentejo as a Coagulant Agent for Cheesemaking. *Int Dairy J* **2019**, *91*, 178–184. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.09.010>.
- (18) García, V.; Rovira, S.; Boutoial, K.; Álvarez, D.; López, M. B. A Comparison of the Use of Thistle (*Cynara Cardunculus* L.) and Artichoke (*Cynara Scolymus* L.) Aqueous Extracts for Milk Coagulation. *Dairy Sci Technol* **2015**, *95* (2), 197–208. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0197-y>.
- (19) Ordiales, E.; Martín, A.; Benito, M. J.; Hernández, A.; Ruiz-Moyano, S.; Córdoba, M. D. G. Technological Characterisation by Free Zone Capillary Electrophoresis (FCZE) of the Vegetable Rennet (*Cynara Cardunculus*) Used in “Torta Del Casar” Cheese-Making. *Food Chem* **2012**, *133* (1), 227–235. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.01.012>.
- (20) Silva, S. V.; Allmere, T.; Malcata, F. X.; Andr, A.; En, ! *Comparative Studies on the Gelling Properties of Cardosins Extracted from Cynara Cardunculus and Chymosin on Cow's Skim Milk*; 2003.
- (21) Frazão, C.; Bento, I.; Costa, J.; Soares, C. M.; Veríssimo, P.; Faro, C.; Pires, E.; Cooper, J.; Carrondo, M. A. Crystal Structure of Cardosin A, a Glycosylated and Arg-Gly-Asp- Containing Aspartic Proteinase from the Flowers of *Cynara*

- Cardunculus L. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274 (39), 27694–27701. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27694>.
- (22) Almeida, C. M.; Manso, J. A.; Figueiredo, A. C.; Antunes, L.; Cruz, R.; Manadas, B.; Bur, D.; Pereira, P. J. B.; Faro, C.; Simões, I. Functional and Structural Characterization of Synthetic Cardosin B-Derived Rennet. *Appl Microbiol Biotechnol* **2017**, 101 (18), 6951–6968. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8445-8>.
- (23) Louro Martins, A. P.; Pestana de Vasconcelos, M. M.; de Sousa, R. B. Thistle (Cynara Cardunculus L.) Flower as a Coagulant Agent for Cheesemaking. Short Characterization. *Lait* **1996**, 76 (5), 473–477. <https://doi.org/10.1051/lait:1996536>.
- (24) Noble, J. E. Quantification of Protein Concentration Using UV Absorbance and Coomassie Dyes. *Methods Enzymol* **2014**, 536, 17–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7>.
- (25) Folin, O.; Macallum, A. B. A NEW METHOD FOR THE (COLORIMETRIC) DETERMINATION OF URIC ACID IN URINE; 1912; Vol. 13. <http://www.jbc.org/content/13/3/363.citationhttp://www.jbc.org/content/13/3/363.citation.full.ht>.
- (26) Folin, O.; Denis, W. ON PHOSPHOTUNGSTIC-PHOSPHOMOLYBDIC COMPOUNDS AS COLOR REAGENTS. *Journal of Biological Chemistry* **1912**, 12 (2), 239–243. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)88697-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)88697-5).
- (27) Folin, O.; Denis, W. A New Colorimetric Method for the Determination of Vanillin in Flavoring Extracts. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry* **1912**, 4 (9), 670–672. <https://doi.org/10.1021/ie50045a015>.
- (28) Folin, O.; Denis, W. TYROSINE IN PROTEINS AS DETERMINED BY A NEW COLORIMETRIC METHOD. *Journal of Biological Chemistry* **1912**, 12 (2), 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)88698-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)88698-7).
- (29) Folin, O.; Denis, W. A COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHENOLS (AND PHENOL DERIVATIVES) IN URINE. *Journal of Biological Chemistry* **1915**, 22 (2), 305–308. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)87648-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)87648-7).
- (30) Folin, O.; Denis, W. THE RELATIVE EXCRETION OF PHENOLS BY THE KIDNEYS AND BY THE INTESTINE. *Journal of Biological Chemistry* **1916**, 26 (2), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)87432-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)87432-4).
- (31) Simoni, R. D.; Hill, R. L.; Vaughn, M. A SYSTEM OF BLOOD ANALYSIS. *Journal of Biological Chemistry* **1919**, 38 (1), 81–110. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)87378-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)87378-1).

- (32) Wu, H. CONTRIBUTION TO THE CHEMISTRY OF PHOSPHOMOLYBDIC ACIDS, PHOSPHOTUNGSTIC ACIDS, AND ALLIED SUBSTANCES. *Journal of Biological Chemistry* **1920**, 43 (1), 189–220. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86325-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86325-6).
- (33) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol* **1999**, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- (34) Folin, O.; Ciocalteu, V. ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry* **1927**, 73 (2), 627–650. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6).
- (35) Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* **2005**, 53 (6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
- (36) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* **1965**, 16 (3), 144. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.
- (37) Ainsworth, E. A.; Gillespie, K. M. Estimation of Total Phenolic Content and Other Oxidation Substrates in Plant Tissues Using Folin–Ciocalteu Reagent. *Nat Protoc* **2007**, 2 (4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.
- (38) ISO23058/IDF199. ISO/IDF September 15, 2006.
- (39) de Pinho, M. N.; Minhalma, M. Chapter 1 - Introduction in Membrane Technologies. In *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*; Galanakis, C. M., Ed.; Academic Press, 2019; pp 1–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815056-6.00001-2>.
- (40) Socaci, S. A.; Fărcaș, A. C.; Galanakis, C. M. Chapter 2 - Introduction in Functional Components for Membrane Separations. In *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*; Galanakis, C. M., Ed.; Academic Press, 2019; pp 31–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815056-6.00002-4>.
- (41) Vermaak, L.; Neomagus, H. W. J. P.; Bessarabov, D. G. Recent Advances in Membrane-Based Electrochemical Hydrogen Separation: A Review. *Membranes (Basel)* **2021**, 11 (2), 1–32. <https://doi.org/10.3390/membranes11020127>.
- (42) Ambrosi, A.; Cardozo, N. S. M.; Tessaro, I. C. Membrane Separation Processes for the Beer Industry: A Review and State of the Art. *Food and Bioprocess Technology*. April 2014, pp 921–936. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1275-0>.

- (43) Dürkop, D.; Widdecke, H.; Schilde, C.; Kunz, U.; Schmiemann, A. Polymer Membranes for All-Vanadium Redox Flow Batteries: A Review. *Membranes (Basel)* **2021**, *11* (3). <https://doi.org/10.3390/membranes11030214>.
- (44) ZhA, K.; Aleksandr Vladimirovich, P.; Zhanar Adilbekkyzy, K.; Arman Professor, S. The Effect of the Catalytic Layer Composition on the Hydrogen Permeability of Assymmetric Tantalum-Based Membranes. *Complex Use of Mineral Resources 4* (315). <https://doi.org/10.31643/2020/6445.40>.
- (45) Vatanpour, V.; Pasaoglu, M. E.; Barzegar, H.; Teber, O. O.; Kaya, R.; Bastug, M.; Khataee, A.; Koyuncu, I. Cellulose Acetate in Fabrication of Polymeric Membranes: A Review. *Chemosphere* **2022**, 295. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133914>.
- (46) Fischer, S.; Thümmel, K.; Volkert, B.; Hettrich, K.; Schmidt, I.; Fischer, K. Properties and Applications of Cellulose Acetate. In *Macromolecular Symposia*; 2008; Vol. 262, pp 89–96. <https://doi.org/10.1002/masy.200850210>.
- (47) Nikolaeva, D.; Verachtert, K.; Azcune, I.; Jansen, J. C.; Vankelecom, I. F. J. Influence of Ionic Liquid-like Cationic Pendants Composition in Cellulose Based Polyelectrolytes on Membrane-Based CO₂ Separation. *Carbohydr Polym* **2021**, *255*, 117375. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117375>.
- (48) Sabir, A.; Shafiq, M.; Islam, A.; Jabeen, F.; Shafeeq, A.; Ahmad, A.; Zahid Butt, M. T.; Jacob, K. I.; Jamil, T. Conjugation of Silica Nanoparticles with Cellulose Acetate/Polyethylene Glycol 300 Membrane for Reverse Osmosis Using MgSO₄ Solution. *Carbohydr Polym* **2016**, *136*, 551–559. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.09.042>.
- (49) Li, S.; Wang, D.; Xiao, H.; Zhang, H.; Cao, S.; Chen, L.; Ni, Y.; Huang, L. Ultra-Low Pressure Cellulose-Based Nanofiltration Membrane Fabricated on Layer-by-Layer Assembly for Efficient Sodium Chloride Removal. *Carbohydr Polym* **2021**, *255*, 117352. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117352>.
- (50) Silva, M. A.; Belmonte-Reche, E.; de Amorim, M. T. P. Morphology and Water Flux of Produced Cellulose Acetate Membranes Reinforced by the Design of Experiments (DOE). *Carbohydr Polym* **2021**, *254*, 117407. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117407>.
- (51) Hashino, M.; Hiram, K.; Katagiri, T.; Kubota, N.; Ohmukai, Y.; Ishigami, T.; Maruyama, T.; Matsuyama, H. Effects of Three Natural Organic Matter Types on Cellulose Acetate Butyrate Microfiltration Membrane Fouling. *J Memb Sci* **2011**, *379* (1–2), 233–238. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2011.05.068>.
- (52) Ang, M. B. M. Y.; Devanadera, K. P. O.; Duena, A. N. R.; Luo, Z. Y.; Chiao, Y. H.; Millare, J. C.; Aquino, R. R.; Huang, S. H.; Lee, K. R. Modifying Cellulose Acetate

- Mixed-Matrix Membranes for Improved Oil-Water Separation: Comparison between Sodium and Organo-Montmorillonite as Particle Additives. *Membranes (Basel)* **2021**, *11* (2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/membranes11020080>.
- (53) Ali, M.; Jahan, Z.; Sher, F.; Khan Niazi, M. B.; Kakar, S. J.; Gul, S. Nano Architected Cues as Sustainable Membranes for Ultrafiltration in Blood Hemodialysis. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *128*, 112260. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2021.112260>.
- (54) Safarpour, M.; Safikhani, A.; Vatanpour, V. Polyvinyl Chloride-Based Membranes: A Review on Fabrication Techniques, Applications and Future Perspectives. *Sep Purif Technol* **2021**, *279*, 119678. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2021.119678>.
- (55) Poolachira, S.; Velmurugan, S. Effect of Solvents in the Formation of PES-Based Asymmetric Flat Sheet Membranes in Phase Inversion Method: Phase Separation and Rheological Studies. *Iranian Polymer Journal (English Edition)* **2023**, *32* (3), 365–376. <https://doi.org/10.1007/s13726-022-01131-y>.
- (56) Bolandi, S.; Ashtiani, F. Z.; Okhovat, A.; Ghandashtani, M. B. The Effects of Surfactant Additives on Properties and Morphologies of Cellulose Acetate Membranes Prepared by Phase Inversion. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering* **2020**, *54* (5), 931–939. <https://doi.org/10.1134/S0040579520050292>.
- (57) Zhang, J.; Li, G.; Yuan, X.; Li, P.; Yu, Y.; Yang, W.; Zhao, S. Reduction of Ultrafiltration Membrane Fouling by the Pretreatment Removal of Emerging Pollutants: A Review. *Membranes*. MDPI January 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/membranes13010077>.
- (58) Abdullah, N.; Rahman, M. A.; Dzarfan Othman, M. H.; Jaafar, J.; Ismail, A. F. Chapter 2 - Membranes and Membrane Processes: Fundamentals. In *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes*; Basile, A., Mozia, S., Molinari, R., Eds.; Elsevier, 2018; pp 45–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813549-5.00002-5>.
- (59) Singh, R. Chapter 1 - Introduction to Membrane Technology. In *Hybrid Membrane Systems for Water Purification*; Singh, R., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2005; pp 1–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-185617442-8/50002-6>.
- (60) Yadav, D.; Karki, S.; Ingole, P. G. Nanofiltration (NF) Membrane Processing in the Food Industry. *Food Engineering Reviews*. Springer December 1, 2022, pp 579–595. <https://doi.org/10.1007/s12393-022-09320-4>.
- (61) Karki, S.; Gohain, M. B.; Yadav, D.; Ingole, P. G. Nanocomposite and Bio-Nanocomposite Polymeric Materials/Membranes Development in Energy and

- Medical Sector: A Review. *Int J Biol Macromol* **2021**, 193, 2121–2139. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.044>.
- (62) Conidi, C.; Castro-Muñoz, R.; Cassano, A. Nanofiltration in Beverage Industry. *Nanotechnology in the Beverage Industry* **2020**, 525–548. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819941-1.00018-3>.
- (63) Pant, K.; Thakur, M.; Nanda, V. Applications of Membrane Technology in Whey Processing; 2020; pp 167–200. <https://doi.org/10.1201/9780429276408-7>.
- (64) Simonič, M.; Pintarič, Z. N. Study of Acid Whey Fouling after Protein Isolation Using Nanofiltration. *Membranes (Basel)* **2021**, 11 (7). <https://doi.org/10.3390/membranes11070492>.
- (65) Esfandian, F.; Peyravi, M.; Ghoreyshi, A. A.; Jahanshahi, M.; Rad, A. S. Fabrication of TFC Nanofiltration Membranes via Co-Solvent Assisted Interfacial Polymerization for Lactose Recovery. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, 12 (8), 5325–5338. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.01.004>.
- (66) Kentish, S. E.; Rice, G. Demineralization of Dairy Streams and Dairy Mineral Recovery Using Nanofiltration. In *Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation*; 2015; pp 112–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118590331.ch5>.
- (67) Tavares, T.; Malcata, F. X. Whey and Whey Powders, Principles and Applications of Dialysis. *Encyclopedia of Food and Health* **2016**, 493–497. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00750-9>.
- (68) Alexandri, M.; Schneider, R.; Venus, J. Membrane Technologies for Lactic Acid Separation from Fermentation Broths Derived from Renewable Resources. *Membranes (Basel)* **2018**, 8 (4). <https://doi.org/10.3390/membranes8040094>.
- (69) Komesu, A.; Regina, M.; Maciel, W.; Filho, R. M. *Lactic Acid Purification*; 2017; Vol. 12.
- (70) Sluková, M.; Hinková, A.; Henke, S.; Smrž, F.; Lukačíková, M.; Pour, V.; Bubník, Z. Cheese Whey Treated by Membrane Separation as a Valuable Ingredient for Barley Sourdough Preparation. *J Food Eng* **2016**, 172, 38–47. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2015.03.023>.
- (71) Ganju, S.; Gogate, P. R. A Review on Approaches for Efficient Recovery of Whey Proteins from Dairy Industry Effluents. *J Food Eng* **2017**, 215, 84–96. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2017.07.021>.
- (72) Bansal Nidhi and Bhandari, B. Functional Milk Proteins: Production and Utilization—Whey-Based Ingredients. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*; McSweeney Paul L. H. and O'Mahony, J. A., Ed.;

Springer New York: New York, NY, 2016; pp 67–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_3.

6 – Anexos

Anexo I – Tabelas das curvas de calibração

Tabela 6.I-1 - Concentrações utilizadas para a curva de calibração do método de Folin-Ciocalteu

Concentração (g/L)	Volume de solução mãe (µL)	Volume de metanol (µL)
0.200	1000	2000
0.150	750	2250
0.100	500	2500
0.050	250	2750
0.025	100	2900
0.010	50	2950
0.005	25	2975
0.0025	12,5	2987,5

Tabela 6.I-2 - Concentrações utilizadas para a curva de calibração do método de Bradford

Concentração (g/L)	Volume de solução mãe (µL)	Volume tampão (µL)
1.000	500	500
0.800	400	600
0.600	200	800
0.200	100	900
0.100	50	950
0.080	40	960
0.060	30	970
0.020	10	990
0.000	0	1000

Anexo II – Gráficos referentes à caracterização das membranas.

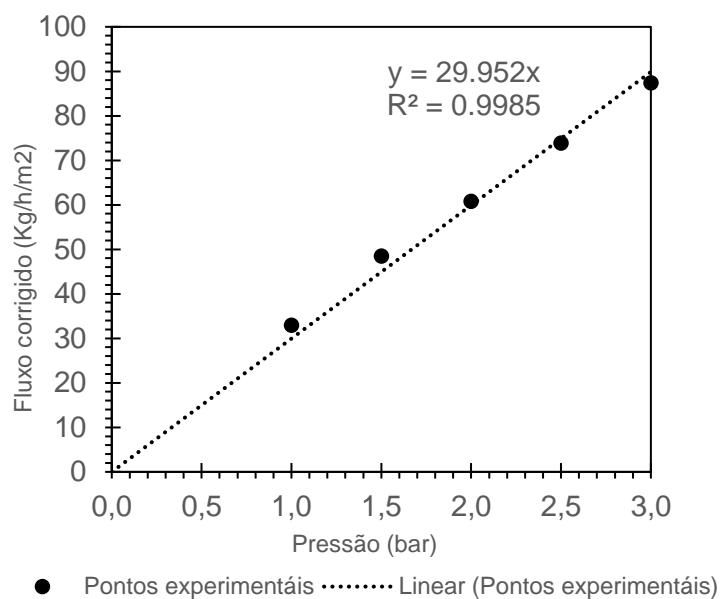


Figura 6.II-1 - Gráfico da permeabilidade hidráulica para a membrana CA-27

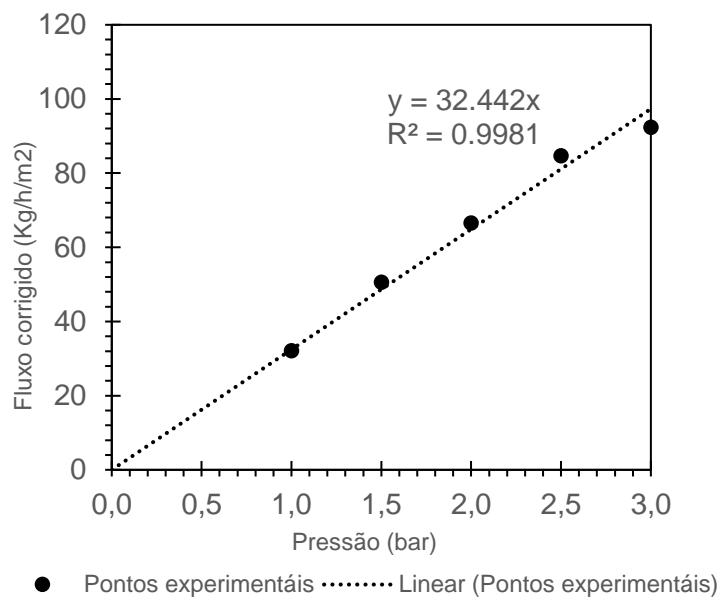


Figura 6.II-2 - Gráfico da permeabilidade hidráulica para a membrana CA-29

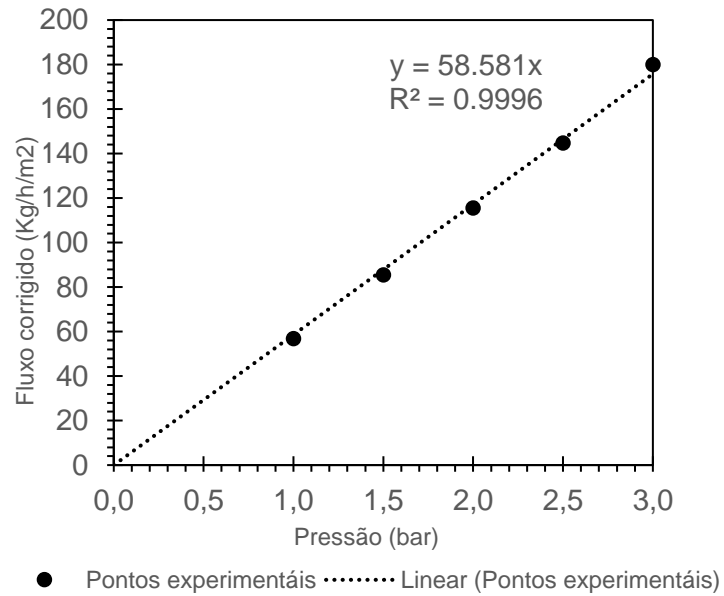


Figura 6.II-3 - Gráfico da permeabilidade hidráulica para a membrana CA-31

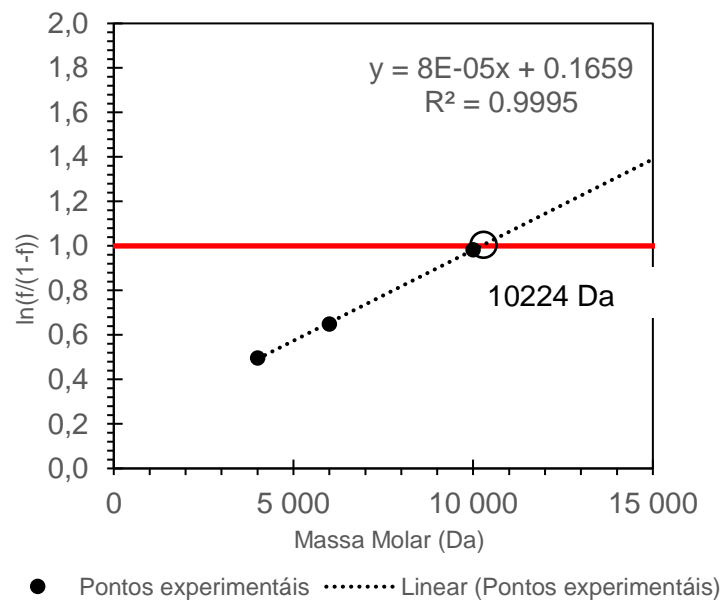


Figura 6.II-4 - Gráfico da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-27

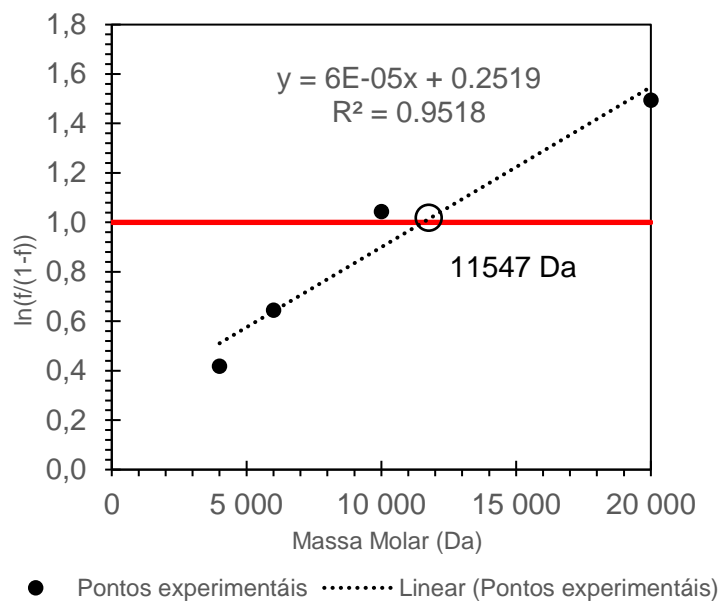


Figura 6.II-5 - Gráfico da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-29

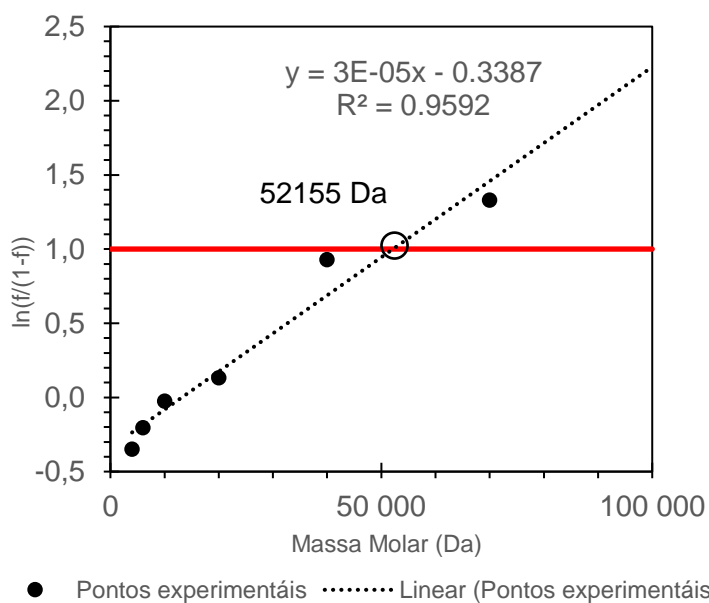


Figura 6.II-6 - Gráfico da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-31

Anexo III – Dados determinação da Permeabilidade hidráulica

Tabela 6.III-1 – Tabela dos ensaios de Permeabilidade hidráulica da membrana CA-22

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)				
Água	1.0	34.3	51.2	64.85	0.01365	5	5.54	4.50
Água	1.5	33.8	55.11	73.91	0.0188	5	7.63	6.27
Água	2.0	32.6	56.69	80.86	0.02417	5	9.81	8.27
Água	2.5	31.4	55.18	85.06	0.02988	5	12.13	10.50
Água	3.0	29.5	80.51	112.59	0.03208	5	13.02	11.76

Tabela 6.III-2 – Tabela dos ensaios de Permeabilidade hidráulica da membrana CA-27

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)				
Água	1.0	20.9	86.24	130.47	0.04423	3	29.92	32.91
Água	1.5	19.5	86.26	149.28	0.06302	3	42.63	48.48
Água	2.0	18.7	86.71	138.37	0.05166	2	52.41	60.77
Água	2.5	18.2	86.63	148.65	0.06202	2	62.93	73.83
Água	3.0	18.4	87.17	142.49	0.05532	1.5	74.84	87.39

Tabela 6.III-3 – Tabela dos ensaios de Permeabilidade hidráulica da membrana CA-29

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)				
Água	1.0	17.1	86.76	139.39	0.05263	4	26.70	32.17
Água	1.5	17.1	79.87	141.93	0.06206	3	41.98	50.58
Água	2.0	17.4	86.62	141.44	0.05482	2	55.62	66.54
Água	2.5	18.1	87.1	158.07	0.07097	2	72.01	84.69
Água	3.0	30	80.5	156.96	0.07646	1,5	103.44	92.36

Tabela 6.III-4 – Tabela dos ensaios de Permeabilidade hidráulica da membrana CA-31

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)				
Água	1.0	17.4	120.14	166.98	0.04684	2	47.52	56.85
Água	1.5	17.4	107.02	177.46	0.07044	2	71.47	85.49
Água	2.0	17.4	127.43	175.04	0.04761	1	96.61	115.57
Água	2.5	17.2	115.95	175.30	0.05935	1	120.43	144.77
Água	3.0	16.8	121.15	194.22	0.07307	1	148.28	179.97

Anexo IV – Dados determinação do fator de rejeição aparente aos sais

Tabela 6.IV-1 – Tabela dos ensaios de determinação do fator de rejeição aparente aos sais da membrana CA-22

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Cond A	Cond P
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)						
NaCl	1.0	30.8	117.45	141.29	0.02384	10	4.84	4.24	882	483
Na ₂ SO ₄	1.0	30.8	116.03	150.55	0.03452	15	4.67	4.10	727	292

Tabela 6.IV-2 – Tabela dos ensaios de determinação do fator de rejeição aparente aos sais da membrana CA-27

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Cond A	Cond P
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)						
NaCl	1.0	17.2	87.07	139.85	0.05278	4	26.78	32.19	897	888
Na ₂ SO ₄	1.0	23.6	79.87	140.93	0.06106	4	30.98	31.99	689	589

Tabela 6.IV-3 – Tabela dos ensaios de determinação do fator de rejeição aparente aos sais da membrana CA-29

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Cond A	Cond P
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)						
NaCl	1.0	30.6	154.15	216.44	0.06229	4	31.60	27.84	1041	1020
Na ₂ SO ₄	1.0	31.2	153.51	217.65	0.06414	4	32.54	28.29	813	709

Tabela 6.IV-4 – Tabela dos ensaios de determinação do fator de rejeição aparente aos sais da membrana CA-31

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)		Peso de permeado (Kg)	Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Cond A	Cond P
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)						
NaCl	1.0	17.4	120.16	170.15	0.04999	2	50.72	60.67	1041	1035
Na ₂ SO ₄	1.0	17.5	121.14	169.98	0.04884	2	49.55	59.13	813	731

Anexo V – Dados determinação do limite de exclusão molecular

Tabela 6.V-1 – Tabela dos ensaios da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-22

M _w	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)			Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Conc A (ppm)	Conc P (ppm)
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)	Peso de permeado (Kg)					
1500	1.0	31.8	94.29	132.77	0.03848	15	5.21	4.47	957.2	208.4
3000	1.0	32.0	87.09	124.31	0.03722	15	5.04	4.30	502.6	85.4
6000	1.0	31.0	51.05	86.02	0.03497	15	4.73	4.13	434.4	41.4
10000	1.0	31.5	48.80	85.96	0.03716	15	5.03	4.34	460.1	2.6

Tabela 6.V-2 – Tabela dos ensaios da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-27

M _w	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)			Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Conc A (ppm)	Conc P (ppm)
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)	Peso de permeado (Kg)					
4000	1.0	16.5	79.87	128.74	0.04887	4	24.79	30.31	945.9	228.6
6000	1.0	15.7	87.79	136.94	0.04915	4	24.93	31.09	960.9	176.1
10000	1.0	15.4	86.70	135.54	0.04884	4	24.78	31.12	979.5	92.0

Tabela 6.V-3 – Tabela dos ensaios da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-29

M _w	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)			Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Conc A (ppm)	Conc P (ppm)
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)	Peso de permeado (Kg)					
4000	1.0	16.5	48.55	85.74	0.03719	3	25.16	30.76	1138.1	314.5
6000	1.0	16.5	48.55	85.74	0.03719	3	25.16	30.76	1092.8	202.1
10000	1.0	17.1	51.19	85.36	0.03417	3	23.11	27.85	1086.3	90.1
20000	1.0	16.6	48.78	85,10	0.03632	3	24.57	29.96	1097.8	34.1

Tabela 6.V-4 – Tabela dos ensaios da determinação do limite de exclusão molecular da membrana CA-31

M _w	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa (g)			Tempo de recolha (min)	Fluxo (Kg/h.m2)	Fluxo corrigido	Conc A (ppm)	Conc P (ppm)
			Massa vazio (g)	Massa cheio (g)	Peso de permeado (Kg)					
4000	1.0	17.4	127.52	176.46	0.04894	2	49.66	59.40	816.3	563.5
6000	1.0	17.8	107.10	156.21	0.04911	2	49.83	59.03	1031.8	634.8
10000	1.0	17.9	119.81	180.74	0.06093	2.5	49.46	58.45	959.0	492.9
20000	1.0	18.0	118.06	165.26	0.0472	2	47.89	56.46	983.9	417.1
40000	1.0	14.6	145.54	195.85	0.05031	2.5	40.84	52.31	550.3	57.8
70000	1.0	18.1	87.09	128.75	0.04166	2	42.27	49.72	1025.8	45.6
100000	1.0	15.0	96.32	134.42	0.0381	2	38.66	49.03	518.2	71.9