



**CAMILLA SOARES DUARTE**

**EFEITOS DE ADITIVOS NA CONCENTRAÇÃO POR  
CONGELAMENTO DE SORO DE LEITE BOVINO**

**LAVRAS – MG**

**2020**

**CAMILLA SOARES DUARTE**

**EFEITOS DE ADITIVOS NA CONCENTRAÇÃO POR CONGELAMENTO DE  
SORO DE LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende  
Orientador

Prof. Dr. Fabiano Freire Costa  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Duarte, Camilla Soares.

Efeitos de aditivos na concentração por congelamento de soro de leite bovino / Camilla Soares Duarte. - 2020.

64 p.

Orientador(a): Jaime Vilela de Resende.

Coorientador(a): Fabiano Costa Freire.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Concentração por congelamento. 2. Soro de leite bovino. 3. Aditivos. I. Resende, Jaime Vilela de. II. Freire, Fabiano Costa. III. Título.

**CAMILLA SOARES DUARTE**

**EFEITOS DE ADITIVOS NA CONCENTRAÇÃO POR CONGELAMENTO DE  
SORO DE LEITE BOVINO**

**EFFECTS OF ADDITIVES ON THE FREEZING CONCENTRATION OF BOVINE  
WHEY.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de junho de 2020.  
Prof. Dr. Fabiano Freire Costa – UFJF  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Maria Pinto - UFLA

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

*À Manoel, meu pai, meu grande exemplo de vida, por todo amor, confiança e cumplicidade.*

*Todas as minhas conquistas foram adquiridas graças a sua dedicação e força.*

*À Idelze, minha mãe, pela paciência e afeto.*

*À Kenia, minha irmã, por ser a minha conselheira e por ser presente.*

*À Adeilson, meu irmão, pelos risos, proteção e ajuda.*

*Aos meus cunhados, Leide Prado e Patrício Gallardo, pelo companheirismo e positivismo.*

*Ao Ivo Soares, meu tio, e família pelo carinho e cuidado.*

*Aos meus melhores amigos, Anderson Ganem, Érico Pimenta, Karen Nunes e Paloma Simeão*

*por serem meus confidentes e incentivadores.*

*À família Duarte e aos meus amigos/irmãos de coração pelas orações e por crerem.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por ter estado ao meu lado me protegendo, guiando e dando forças para a realização do mestrado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pela concessão de bolsa de mestrado e apoio financeiro à pesquisa.

Ao meu orientador, professor Dr. Jaime Vilela de Resende, pela orientação, dedicação, paciência e confiança.

A todos do Laboratório de Refrigeração de Alimentos pela amizade, apoio, companheirismo e dedicação. Em especial a Larissa Moraes, Ana Cristina Meira, Adrise Rodrigues, Sérgio Silva, Isabelle Neves e Natália Leite, obrigada pelas conversas, risos, conselhos e carinho. Vocês sempre serão pessoas especiais para mim.

Ao professor Dr. Fabiano Freire Costa, por aceitar me coorientar e por sempre apoiar e incentivar.

À técnica Creusa pela dedicação, carinho, ensinamentos, paciência e auxílio concedido, e aos professores Dr. Luiz Ronaldo e Dra. Sandra do Laboratório de Leites pela disponibilidade, ensinamentos e confiança.

Ao meu terapeuta André Garcia, pelo auxílio e dedicação; e ao médico Alexander por todo carinho e compreensão.

A todos os funcionários, professores e alunos do Departamento de Ciência dos Alimentos pelos conselhos, ajuda e convivência diária, em especial as técnicas Lucilene e Killian.

Muito obrigada!

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi concentrar por congelamento o soro de leite bovino (SLB) proveniente da coagulação enzimática da produção de queijo como uma etapa de pré-processamento da liofilização para a obtenção do produto em pó. Neste processo, os efeitos da adição de etanol ( $C_2H_5OH$ ), cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) e Carboximetilcelulose (CMC) em diferentes concentrações sobre parâmetros físico-químicos, reológicos e perfis de temperatura no processo de concentração por congelamento do SLB foram avaliados. O processo completo foi realizado em três estágios sendo as frações avaliadas ao término de cada estágio. Um planejamento rotacional central composto (DCCR) foi usado para avaliar os efeitos dos aditivos sobre as variáveis respostas que foram as variações percentuais da densidade, do teor de lactose, do teor de sólidos solúveis totais (SST) e do teor de proteínas calculadas em relação a uma amostra de SLB padrão. Os valores de pH e ângulo Hue também foram medidos. Os registros de temperatura durante processo de concentração foram obtidos usando um sistema de aquisição de dados e, os parâmetros reológicos, índice de consistência ( $k$ ) e índice de comportamento de fluxo ( $n$ ) foram obtidos pelo ajuste dos dados experimentais ajustados ao modelo da lei da potência. Os resultados da análise de regressão por metodologia de superfícies de respostas mostraram que os efeitos da adição de etanol,  $CaCl_2$  e CMC foram significativos ( $p < 0,05$ ) sobre as variações percentuais da densidade, do teor de lactose, do teor de sólidos solúveis totais e do teor de proteínas e, foram parcialmente significativos para o ângulo Hue e não significativos para o pH. O número de estágios também influenciou no processo de concentração. Na fração de concentrado, as maiores variações na densidade (3,35), teor de lactose (6,40), teor de SST (4,60) e teor de proteínas (3,15) foram encontrados no tratamento constituído de 10% de etanol, 0,5% de  $CaCl_2$  e 0,05% de CMC. Os resultados foram suportados pelas análises dos níveis de subresfriamento e temperaturas de início de congelamento obtidas nos perfis de temperatura e pelo aumento das viscosidades das frações “concentrados” e “cristais de gelo” analisadas através dos parâmetros reológicos  $k$  e  $n$ . Todas as amostras de SLB apresentaram comportamento pseudoplástico.

**Palavras-chaves:** Concentração por congelamento, Subresfriamento, Soro de leite bovino, Aditivos, Reologia.

## ABSTRACT

This work aimed to concentrate by freezing-concentration bovine whey (SLB) from cheese enzymatic coagulation as a pre-processing stage to obtain the freeze-dried powdered product. In this process, the effects of ethanol ( $C_2H_5OH$ ), calcium chloride ( $CaCl_2$ ) and Carboxymethylcellulose (CMC) added with different concentrations on physical-chemical, rheological parameters and temperature profiles in the SLB freezing-concentration process by freezing were evaluated. The complete process was carried out in three stages and the fractions were evaluated at the end of each stage. A composite central rotational planning (CCRD) was used to evaluate the effects of additives on the response variables that were the percentage variations in density, lactose content, total soluble solids (TSS) content and protein content calculated in relation to a standard SLB sample. The Hue angle and pH values were also measured. Temperature records during the concentration process were obtained using a data acquisition system and rheological parameters, consistency index ( $k$ ) and flow behavior index ( $n$ ) were obtained by fitting the experimental data as to the power law model. The results of regression analysis by response surface methodology showed that the effects of ethanol,  $CaCl_2$  and CMC addition were significant ( $p < 0.05$ ) on percentage variations in density, lactose content, total soluble solids content and protein content, and were less significant for Hue angle and not significant for pH. The number of stages influenced the concentration process. In the "concentrate" fraction, the largest variations in density (3.35), lactose content (6.40), SST content (4.60) and protein content (3.15) were found in the treatment consisting of 10% ethanol, 0.5%  $CaCl_2$  and 0.05% CMC. The results were supported by the analysis of the subcooling levels and initial freezing temperatures obtained from the temperature profiles and by the increase in viscosities of the "concentrated" and "ice crystals" fractions analyzed using the rheological parameters  $k$  and  $n$ . All SLB samples showed pseudoplastic behavior.

**Keywords:** Freezing-concentration, Subcooling, Bovine Whey, Additives, Rheology.



## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da carboximetilcelulose sódica (CMC).....	26
Figura 2 - Diagrama do processo de concentração por congelamento do SLB.....	33
Figura 3 – (a) Montagem do concentrador. (b) Imagem real do concentrador. ....	34
Figura 4 - (a) Desenho da aquisição de dados (1) concentrador; (2) agitador; (3) termopares; (4) aquisição de dados; (5) computador. (b) Posição dos termopares instalados no concentrador. ....	35
Figura 5 - Imagem do Lactoscan©. ....	36
Figura 6 - Superfície de resposta para a variação da densidade do concentrado 1. (a) em função da concentração de etanol e CaCl <sub>2</sub> e, (b) em função da concentração de etanol, e CMC. ....	41
Figura 7 - Comportamento das variáveis respostas (a) densidade, (b) teor de lactose, (c) teor de sólidos solúveis e (d) teor de proteínas em função da concentração de etanol, 0,5 % de CaCl <sub>2</sub> e 0,05 % de CMC nos concentrados e cristais de gelo separados nos Estágios 1, 2 e 3 do processo de concentração por congelamento.....	46
Figura 8 - Comportamento das variáveis respostas (a) densidade, (b) teor de lactose, (c) teor de sólidos solúveis e (d) teor de proteínas em função da concentração de CaCl <sub>2</sub> , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC nos Concentrados e Cristais de Gelo separados nos Estágios 1, 2 e 3 do processo de concentração por congelamento.....	47
Figura 9 - Comportamento das variáveis respostas (a) densidade, (b) teor de lactose, (c) teor de sólidos solúveis e (d) teor de proteínas em função da concentração de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de CaCl <sub>2</sub> nos Concentrados e Cristais de Gelo separados nos Estágios 1, 2 e 3 do processo de concentração por congelamento.....	48
Figura 10 - Superfícies de resposta da variável ângulo Hue para o (a) concentrado 2 e (b) cristal de gelo 3.....	50
Figura 11 - Perfis de temperatura em função da concentração (a) de etanol, 0,5 % de CaCl <sub>2</sub> e 0,05 % de CMC; (b) em função da concentração de CaCl <sub>2</sub> , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC e; (c) em função da concentração de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de CaCl <sub>2</sub> nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados no estágio 1.....	52
Figura 12 - Perfis de temperatura em função da concentração de etanol e fixando 0,5 % de CaCl <sub>2</sub> e 0,05 % de CMC nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados nos estágios 1, 2 e 3. ....	53
Figura 13 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação de amostras de SLB adicionadas de diferentes concentrações de (a) etanol, 0,5 % de CaCl <sub>2</sub> e 0,05 % de CMC; (b) de CaCl <sub>2</sub> , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC e; (c) de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de CaCl <sub>2</sub> nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados no estágio 1. ....	56

Figura 14 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para amostras com diferentes concentrações de etanol e fixando 0,5 % de CaCl<sub>2</sub> e 0,05 % de CMC nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados nos estágios 1, 2 e 3.....57

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR): Variáveis discretas e Variáveis reais. ....	32
Tabela 2 - Resultados das análises de regressão obtidas do delineamento composto central (DCCR) do concentrado 1 obtido no 1° estágio do processo de concentração por congelamento do SLB. ....	40
Tabela 3 - Resultados de regressão do delineamento composto central (DCCR) do cristal de gelo 1 do 1° estágio do processo de cristalização à frio do SLB.....	42
Tabela 4 - Resultados da regressão do delineamento composto central rotacional (DCCR) para o concentrado 2 e para o cristal de gelo 2 do processo de concentração por congelamento do SLB.....	44
Tabela 5 - Resultados da regressão do delineamento composto central rotacional (DCCR) para o concentrado 3 e para o cristal de gelo 3 do processo de concentração por congelamento do SLB.....	45
Tabela 6 - Resultados da análise de regressão do delineamento composto central (DCCR) para a variação do ângulo Hue no processo de concentração por congelamento do SLB. ....	49
Tabela 7 - Parâmetros reológicos obtidos pelo ajuste ao modelo lei da potência dos concentrados e cristais de gelo separados no estágio 1 para amostras constituídas de diferentes concentrações de etanol, CaCl <sub>2</sub> e CMC e fixando as concentrações dos demais aditivos no ponto central do DCCR. ....	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1 Controle da cristalização (nucleação e crescimento de cristais)</b> .....	15
<b>2.1.1 Conceito</b> .....	15
<b>2.1.2 Técnicas da concentração por congelamento (crioconcentração)</b> .....	17
<b>2.1.2.1 Concentração por congelamento por suspensão</b> .....	17
<b>2.1.2.2 Concentração por congelamento progressiva</b> .....	18
<b>2.1.2.3 Concentração por congelamento eutética</b> .....	18
<b>2.1.2.4 Concentração por congelamento de bloco parcial</b> .....	19
<b>2.1.2.5 Concentração por congelamento de bloco completo</b> .....	19
<b>2.1.3 Cristalização da água</b> .....	19
<b>2.2 Leite Bovino</b> .....	22
<b>2.2.1 Lactose</b> .....	23
<b>2.2.2 Soro de Leite Bovino</b> .....	23
<b>2.2.5.1 Proteínas solúveis</b> .....	24
<b>2.2.5.1.1 <math>\beta</math>-lactoglobulina</b> .....	24
<b>2.2.5.1.2 <math>\alpha</math>-lactoalbumina</b> .....	24
<b>2.2.5.1.3 Imunoglobulinas</b> .....	25
<b>2.3 Aditivos Orgânicos e Inorgânicos</b> .....	25
<b>2.3.1 Carboximetilcelulose (CMC)</b> .....	26
<b>2.3.2 Etanol (<math>C_2H_5OH</math>)</b> .....	27
<b>2.3.3 Cloreto de Cálcio (<math>CaCl_2</math>)</b> .....	27
<b>2.4 Aplicações da concentração à frio na indústria de alimentos</b> .....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>3.1 Preparo das amostras</b> .....	31
<b>3.2 Aditivos Orgânicos e Inorgânicos</b> .....	31
<b>3.3 Processo de concentração por congelamento</b> .....	32
<b>3.4 Concentrador</b> .....	33
<b>3.5 Protocolo de Análises físico-químicas</b> .....	35
<b>3.5.1 Teor de sólidos solúveis totais, densidade, lactose e proteína</b> .....	35
<b>3.5.2 Viscosidade</b> .....	36
<b>3.5.3 Colorimetria</b> .....	37
<b>3.5.4 pH</b> .....	37
<b>3.6 Estatística</b> .....	37
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39

<b>4.1 Avaliação dos resultados das análises físico químicas por metodologia de superfícies de respostas .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.1 Estágio 1 .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.1.1 Concentrado 1.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.1.2 Cristal de gelo 1 .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.2 Efeitos dos demais estágios no processo de concentração.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Históricos de temperaturas nos processos de concentração.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Viscosidade.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4 Discussão .....</b>	<b>59</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há décadas a indústria de laticínios é um dos setores de maior importância para a economia dos países industrializados e em desenvolvimento. Porém, do volume total de leite utilizado para fabricação de queijo, 85% dele era considerado resíduo (soro de leite) que ao ser descartado diretamente na natureza poderia ocasionar grandes impactos ambientais. Atualmente o soro é considerado um subproduto e propõe-se a utilização do soro para outros fins, pois em média 55%/volume de soro contem constituintes do leite, como lactose, proteínas solúveis, lipídeos e sais minerais de alto valor agregado, tendo alta aplicação na indústria alimentícia como complemento nutricional e funcional (AIDER; et.al., 2009; HARAGUCHI, 2006; ORDÓÑEZ, 2005).

Métodos de obtenção do SLB por concentração vêm sendo estudados os quais não interferem nas propriedades nutricionais e funcionais do soro, um destes é baseado na cristalização da água (AIDER; et.al., 2007). Este foi definida por McCabe 1993, como o processo de formação de partículas sólidas de uma fase homogênea. A cristalização é a operação chave na concentração por congelamento, um processo que consiste em cristalizar parte da água contida no meio para separar os componentes solúveis encontrados no sistema. Esta operação unitária pode ser aplicada em vários tipos de processos, como, a concentração de alimentos aquosos na indústria alimentícia (COULSON; et.al., 2002). Como o princípio da concentração à frio é realizar a remoção da água a baixa temperatura, os componentes importantes como as proteínas, aromatizantes, vitaminas, polifenóis e entre outros continuam no alimento, não se degradam ou sofrem alterações de suas propriedades durante a cristalização e separação dos meios. Outra vantagem é por ser a baixa temperatura, a taxa de crescimento microbiano e a atividade enzimática diminuem. As principais desvantagens do processo são o alto custo e a limitação de cristalização de até 55% devido ao aumento da viscosidade (AIDER; DE HALLEUX, 2009; ZHANG; HARTEL, 1996).

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da adição de cloreto de cálcio, CMC e etanol na pré-concentração por congelamento como etapa do processo de liofilização para a obtenção de soro de leite bovino (SLB) em pó.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

Com foco na concentração por congelamento e no soro de leite bovino (SLB), proveniente do processo enzimático de fabricação de queijo, este referencial tem como objetivo abordar os temas de forma teórica e objetiva.

### **2.1 Controle da cristalização (nucleação e crescimento de cristais)**

#### **2.1.1 Conceito**

Uma das operações unitárias mais antigas, a cristalização é um processo de separação sólido-líquido que consiste na formação de partículas sólidas em um meio de fase homogênea, ou seja, transferência do soluto de uma solução líquida para a formação de sólidos puros de fase cristalina (COULSON et al., 2002; GEANKOPLIS, 1993; MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993). Esta tem grande importância na indústria química, farmacêutica e alimentícia por ser aplicada, em sua maioria, na etapa final de purificação de alguns processos, por se tratar de uma operação energeticamente viável, quando comparada com outras existentes (NÝVLT; ULRICH, 1995).

Este processo pode ocorrer em ambientes distintos, como por exemplo, na formação de cristais de gelo por meio do congelamento da água ou na formação de cristais sólidos de uma solução líquida, sendo esta mais importante na indústria. Na cristalização, a solução é concentrada e resfriada até que a concentração de soluto seja maior que sua solubilidade em uma determinada temperatura. Assim, obtém-se cristais de soluto de alta pureza (GEANKOPLIS, 1993). O processo de cristalização tem como pilar a nucleação e a taxa de crescimento de cristais o que definem o número, tamanho e a distribuição de cristais, além de, interferir em outros fatores, como a cinética do meio em questão (NÝVLT; ULRICH, 1995).

A cristalização inicia quando condições favoráveis são alcançadas para a agregação em um arranjo ordenado de um grupo de moléculas formado partículas chamadas núcleos de cristalização. Estas condições são determinadas pela correlação entre temperatura, velocidade de resfriamento, concentração de solutos e magnitude das forças orientando as moléculas no líquido (GUEGOV, 1981).

Dois tipos de cristalização inicial são possíveis: homogênea e heterogênea (catalítica). Os centros de cristalização homogênea são formados durante uma agregação aleatória de moléculas de água em estruturas de gelo acima de um tamanho crítico. A nucleação homogênea é aquele processo onde agregados de moléculas surgem espontaneamente por flutuações de densidades aleatórias. Em termos termodinâmicos, o ponto de equilíbrio do

congelamento ( $T_E = 273,16$  K) indica a temperatura na qual as energias livres de Gibbs (potenciais químicos) das fases líquida e gelo são as mesmas.

Com velocidades de congelamento rápidas, a velocidade de propagação de gelo inicial é insuficiente para manter o equilíbrio com a taxa de retirada de calor e um aumento no subresfriamento ( $\Delta T$ ) ocorre. Acompanhando este subresfriamento está um aumento na frequência de nucleação formando núcleos mais ativos. Durante o congelamento lento a propagação do gelo pode manter o equilíbrio com a retirada de calor e o resultado são poucos núcleos ativos, e, pequena quantidade de grandes cristais de gelo são formados (GUEGOV, 1981; REID, 1983; MUHR, BLANSHARD e SHEARD, 1986; BLANSHARD e FRANKS, 1987).

A nucleação heterogênea ocorre quando partículas sólidas atuam como sítios para a formação do cristal. A presença de uma superfície ativa de uma partícula dentro do sistema introduz uma região de energia livre superficial que aumenta a probabilidade de formação de um agregado de dimensões críticas. Normalmente, estas partículas são substâncias que são insolúveis em água e seu tamanho, localização e características moleculares determinam o caráter de formação do gelo visto que o número de moléculas de água que necessitam ordenação inicial é muito mais baixo, a temperatura de nucleação é mais alta que aquela da nucleação homogênea.

O crescimento do cristal de gelo é possível uma vez que ocorra nucleação. Em vista da importância da formação de cristais de gelo em alimentos congelados como fator na modificação da textura e do rompimento da estrutura celular consideráveis esforços para controlar o tamanho do cristal de gelo com a presença de aditivos tem sido motivo de extensos estudos.

Com base nos fatores responsáveis pela nucleação e crescimento de cristais de gelo, uma série de estratégias, dependentes dos objetivos finais e dos produtos ou sistemas biológicos congelados, são propostos por Blanshard e Franks (1987) para o controle da cristalização da água em sistemas alimentares. Estas propostas incluem:

- 1) A inibição da nucleação. Onde existe uma redução constante na temperatura de congelamento, existem os benefícios de uma minimização dos processos físicos e químicos sem os efeitos deletérios do congelamento e concentração por congelamento. O ponto de congelamento do produto é abaixado pela introdução de quantidades massivas de materiais osmoticamente ativos, como por exemplo, açúcares.

- 2) O controle da nucleação. Visto que a nucleação e crescimento são taxas de processos dependentes da temperatura com pontos de ótimos a diferentes temperaturas, então



as taxas relativas de nucleação e crescimento dos cristais de gelo podem ser manipuladas explorando apropriadamente as velocidades de transferência de calor e as condições dos parâmetros físico-químicos dos sistemas.

3) O controle do crescimento do cristal de gelo. A presença e acúmulo de aditivos micro- e macromoleculares podem modificar as propriedades de difusão/coligativas na interface água-cristal de gelo e por meio desta limitar o crescimento extensivo do cristal de gelo ou a recristalização. Indubitavelmente, em alguns sistemas alimentares as macromoléculas (proteínas e/ou polissacarídeos, formam uma rede de gel a baixas ou a temperatura ambiente que, como tem sido demonstrado, reduzem severamente o crescimento e modificam os hábitos do cristal.

### **2.1.2 Técnicas da concentração por congelamento (crioconcentração)**

As técnicas para concentração por congelamento mais aplicadas na indústria de alimentos são: por suspensão, progressiva, eutética e por bloco (AIDER; DE HALLEUX, 2009). Essas técnicas foram estudadas por vários autores para aplicação em alimentos como sucos de frutas, extratos de café, laticínios e dessalinização (AIDER; OUNIS, 2012; GUDE, 2016; SÁNCHEZ et al., 2010).

#### **2.1.2.1 Concentração por congelamento por suspensão**

Na concentração por congelamento por suspensão, o tamanho dos cristais de gelo ainda é limitado, de modo que a concentração com base neste método precisa de um sistema mais complexo composto de trocador de calor de superfície raspada para geração de gelo, vaso de recristalização para o crescimento do cristal de gelo e torre de lavagem para separação dos cristais de gelo. Foi relatado que este sistema complexo faz com que o processo de concentração por congelamento seja o mais caro entre todos os métodos de concentração de alimentos líquidos (HERNÁNDEZ et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2011). Portanto, a aplicação prática da concentração por congelamento ainda é limitada na indústria de alimentos. No método convencional de cristalização da suspensão para a concentração por congelamento, a separação dos cristais de gelo da solução concentrada da mãe é crucial no processo. Portanto, os cristais de gelo são cultivados através do mecanismo de amadurecimento de Ostwald. Segundo a literatura, este método de concentração pode ser aplicado para concentrar extrato de café e suco de frutas. Também foi relatada a aplicação da tecnologia de concentração por congelamento por suspensão no tratamento de águas residuais (AIDER; DE HALLEUX,

2009). A vantagem desta forma de concentração por congelamento é a facilidade de criação de gelo puro pela alta área de superfície dos cristais. A desvantagem da tecnologia é a necessidade de um filtro de lavagem contínua, que requer uma operação precisa para derreter o gelo e removê-lo da solução (ZAMBRANO et al., 2018).

### **2.1.2.2 Concentração por congelamento progressiva**

A tecnologia progressiva de concentração por congelamento baseia-se em um conceito completamente diferente no processo de cristalização em comparação com o método de cristalização por suspensão. A particularidade deste método é que um grande cristal de gelo único, em vez de muitos pequenos cristais de gelo como no método de cristalização por suspensão, é formado e crescido na superfície de arrefecimento num vaso de cristalização de modo que a separação entre o cristal de gelo e a solução mãe é muito fácil. Isso torna o sistema muito simples, de modo que o custo do processo diminui substancialmente. A concentração por congelamento progressiva é um método de cristalização por fusão, que tem sido aplicado principalmente à purificação de materiais orgânicos. No entanto, nenhuma investigação sistemática tem sido realizada até agora sobre o mecanismo de concentração e eficiência de separação na concentração por congelamento progressiva (AIDER; DE HALLEUX, 2009; MIYAWAKI et al., 2016).

### **2.1.2.3 Concentração por congelamento eutética**

A tecnologia de concentração por congelamento eutética é uma técnica para separação de sais inorgânicos de soluções aquosas caracterizadas por cristalização simultânea tanto do soluto quanto do gelo. Isto é conseguido através do resfriamento da solução abaixo da temperatura eutética. Em um sistema alimentar líquido heterogêneo congelado, o ponto de fusão depende das proporções relativas dos seus ingredientes. A mistura eutética é uma solução em proporções tais que o ponto de fusão é tão baixo quanto possível e que, além disso, todos os constituintes cristalizam simultaneamente a esta temperatura. Tal cristalização simultânea da mistura eutética é conhecida como uma reação eutética (HIMAWAN et al., 2002). A temperatura a que ocorre essa reação é a temperatura eutética, e a composição e temperatura em que ocorreu é chamado de ponto eutético. Por exemplo, na tecnologia de cristalização de congelamento eutético, as soluções de eletrólitos aquosos podem ser separadas em água pura sob a forma de gelo e sal. Esse processo é operado perto do ponto eutético da solução. Neste ponto, tanto o gelo quanto o sal cristalizam simultaneamente. A

etapa de separação entre o sal e os cristais de gelo é realizado sob o efeito da gravitação. A principal força motriz do fenômeno são as diferenças na densidade de ambos os sólidos. As suspensões de produtos de gelo e sal são obtidas a partir de uma corrente de alimentação aquosa (AIDER; DE HALLEUX, 2009)

#### **2.1.2.4 Concentração por congelamento de bloco parcial**

A tecnologia de concentração por congelamento em bloco parcial foi descrita por Burdo, Kovalenko e Kharenko, 2007. O princípio desta técnica consiste: uma solução de alimento líquido é introduzida em uma câmara de cristalização e parcialmente congelada do centro através da introdução de um tubo em que circula um agente refrigerante. À medida que o bloco de gelo aumenta, a concentração da solução restante aumenta (AIDER; DE HALLEUX, 2009; BURDO; KOVALENKO; KHARENKO, 2008a).

#### **2.1.2.5 Concentração por congelamento de bloco completo**

A tecnologia concentração por congelamento de bloco completo é uma tecnologia de concentração promissora e efetiva para produzir alimentos líquidos concentrados com alto valor nutritivo e propriedades organolépticas. A base desta técnica é: uma solução líquida de alimentos completamente congelada e sua temperatura no centro do produto estão em grande parte abaixo do ponto de congelamento. Depois disso, toda a solução congelada é descongelada e a fração concentrada é separada da fração de gelo por meio de descongelamento gravitacional assistido ou não por outras técnicas para aumentar a eficiência de separação. Nestas condições, o bloco de gelo atua como uma carcaça sólida através da qual passa a fração concentrada. Ao controlar a temperatura de descongelamento, é possível atingir a eficiência do processo superior a 90%, o que significa que a quantidade do soluto aprisionado no cristal de gelo é reduzida a um nível mínimo (AIDER; DE HALLEUX, 2009; BURDO; KOVALENKO; KHARENKO, 2008a).

#### **2.1.3 Cristalização da água**

A transformação da água em gelo é a transição de fase básica que ocorre durante o congelamento de alimentos. O estágio inicial da cristalização determina a temperatura mais baixa em que o armazenamento refrigerado de alimentos é possível. Um fenômeno complexo que antecede o congelamento é o subresfriamento. A retirada de calor da água líquida reduzirá permanentemente sua temperatura à abaixo de 0 °C, mas o gelo não se formará

necessariamente. O subresfriamento ocorrerá frequentemente e somente em circunstâncias particulares formarão cristais de gelo, e, quando se formam, o calor latente de cristalização causa a diminuição da velocidade de resfriamento do sistema ou a interrompe até a mudança de fase estar completa (REID, 1983). Com velocidades de congelamento rápidas, a velocidade de propagação de gelo inicial é insuficiente para manter o equilíbrio com a taxa de retirada de calor e um aumento no subresfriamento ocorre. Acompanhando este subresfriamento está um aumento na frequência de nucleação formando núcleos mais ativos. Durante o congelamento lento a propagação do gelo pode manter o equilíbrio com a retirada de calor e os resultados são poucos núcleos ativos, e, pequena quantidade de grandes cristais de gelo é formada (REID, 1983; MUHR, BLANSHARD e SHEARD, 1986; BLANSHARD e FRANKS, 1987). O subresfriamento da água, em sistemas alimentares, é dependente de vários fatores tais como a composição química e concentração de sólidos. O crescimento do cristal de gelo é possível uma vez que ocorra nucleação. Enquanto a nucleação exige vários graus de subresfriamento, o crescimento do cristal ocorre com o mínimo subresfriamento. O crescimento do gelo a partir da água pura é um processo complexo e a introdução de solutos aumenta ainda mais os níveis de complexidade. A viscosidade da solução desempenha uma importante função neste processo, mas outros fatores também estão envolvidos. Estes fatores incluem a rejeição do soluto a partir da interface de crescimento do gelo e também, possivelmente, a adsorção seletiva dos solutos na interface de crescimento. As três taxas potenciais importantes nas etapas determinantes para o crescimento do cristal são a transferência de calor, a transferência de massa e a cinética das reações na interface (REID, 1983; MUHR e BLANSHARD, 1986).

Na concentração por congelamento, com o resfriamento do produto o gelo começa a formar e virtualmente os constituintes não aquosos são rejeitados dos cristais de gelo e permanecem como parte da fase não congelada. Conseqüentemente, a concentração dos solutos na fase não congelada aumenta e seu ponto de congelamento diminui. Com o resfriamento contínuo a formação de gelo associada à concentração da fase não congelada, os solutos eventualmente atingem suas respectivas concentrações de saturação. A temperatura com que um soluto atinge a saturação é o ponto eutético e esta temperatura é específica para cada soluto. A formação de um eutético consiste da cristalização simultânea de gelo e solutos em proporção constante. A formação de um eutético marca o fim dos processos de concentração. Como o princípio da concentração por congelamento é realizar a remoção da água a baixas temperaturas, os componentes importantes como as proteínas, aromatizantes, vitaminas, polifenóis e entre outros continuam no alimento, não se degradam ou sofrem alterações de suas propriedades durante a cristalização e separação dos meios. Outra

vantagem é que por ser a baixa temperatura, a taxa de crescimento microbiano diminui, assim como a atividade enzimática, além de, também, diminuir perdas no processo (AIDER; et.al, 2009). As principais desvantagens do processo são o alto custo e a limitação de cristalização de até 55% devido ao aumento da viscosidade (ZHANG; et.al, 1996). De acordo com Aider et al. (2007), a estimativa de que a concentração por congelamento é um processo caro não é verdadeira. Comparando as ordens de magnitude da energia total necessária para cristalizar 1 kg de água (335 kJ/kg) por concentração por congelamento com a necessária pelo processo tradicional de evaporação (2260 kJ/kg). Além disso, na liofilização, a tecnologia de concentração por congelamento pode ser usada como uma operação de pré-concentração para reduzir os custos de energia e acelerar o processo de secagem.

Durante o congelamento, fatores que afetam o crescimento do cristal influenciarão a microestrutura dos produtos liofilizados. Desta forma, a adição anterior ao congelamento de aditivos micro- e macromoleculares podem modificar as propriedades de difusão/coligativas na interface água-cristal de gelo e por meio desta influenciar o crescimento extensivo do cristal de gelo no processo de concentração por congelamento e conseqüentemente as propriedades microestruturais do produto liofilizado.

Outro aspecto considerado no processo de congelamento é que uma alternativa para induzir a cristalização é a adição de solventes orgânicos, como álcoois antes do processo de congelamento, que pode reduzir a solubilidade de açúcares e promover sua cristalização através da supersaturação do sistema (GONÇALVES et al, 2018; OLIVEIRA et al. 2010; ALMEIDA & CAL-VIDAL, 1997; SINGH, SHAH, NIELSEN, e CHAMBERS, 1991).

Considerando os sistemas lácteos, Costa et al. 2008 investigou a influência da fortificação do cálcio pela adição de cloreto de cálcio e  $\kappa$ -carragena sobre os parâmetros de qualidade de sorvete. Os resultados demonstraram que a adição de cloreto de cálcio levou a um aumento substancial no tamanho dos cristais de gelo e coalescência parcial de gordura, que foram exacerbados pela adição de  $\kappa$ -carragena. Os efeitos da adição de cálcio em sistemas lácteos são bem conhecidos, resultando em aprimoramento das interações de caseína (FOX e MCSWEENEY, 1998).

A capacidade de vários hidrocoloides de influenciarem a cristalização da água em função da temperatura e da viscosidade foi estudada por Budiaman e Fennema (1987a) e (1987b). Carboximetilcelulose (CMC), gelatina, celulose microcristalina, alginato de sódio e algumas gomas foram testadas quanto a capacidade de reduzir a velocidade de cristalização da água em função da temperatura de subresfriamento inicial. Todas as amostras exibiram um aumento na taxa de cristalização com a redução da temperatura de subresfriamento e com a

diminuição da concentração dos hidrocoloides, mas os efeitos variaram com a natureza do hidrocoloide. A influência sobre a taxa de crescimento de cristais de gelo pela presença de uma rede gélica é discutida por vários autores (BLANSHARD e FRANKS, 1987; MUHR e BLANSHARD, 1986) em termos da interação da frente do cristal de gelo com a rede e demais componentes do sistema do gel, que reduzem o ponto de congelamento levando a ruptura da rede.

## **2.2 Leite Bovino**

O leite é um fluido secretado pelas fêmeas de todas as espécies de mamíferos. Na natureza, o leite, por conter propriedades nutricionais completas, é o alimento principal para recém-nascidos (MCSWEENEY; FOX, 2013). Atualmente, o leite bovino é o mais comercializado e consumido no mundo (SIQUEIRA, 2019). De acordo com a Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011, se define como leite bovino “o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”.

O leite, hoje, é utilizado na maior parte das indústrias alimentícias como produto primário ou como subproduto. Este é extremamente consumido pelos humanos por causa de suas características nutritivas e também por ser um ingrediente muito comum na culinária (HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006; SIQUEIRA, 2019).

Sobre suas características nutritivas, o leite é um alimento que contém aproximadamente 85% de água, 5% de lactose, um açúcar que tem como uma das funções auxiliar na absorção do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) contido no leite, sendo que o leite é caracterizado como um alimento rico em  $\text{Ca}^{2+}$ ; 3,5% de gordura e 0,7% de minerais. Também contém algumas vitaminas e proteínas que podem ser subdivididas como caseína e proteínas solúveis (SGARBIERI, 2004).

Outras características importantes dos constituintes do leite, que são importantes principalmente na dieta dos filhotes são a parte nutricional, por ser um alimento completo para o desenvolvimento do recém-nascido e não há toxinas e fatores antinutricionais (MCSWEENEY; FOX, 2013; SIQUEIRA, 2019).

Um fator importante sobre o leite é a facilidade em convertê-lo em outros produtos. Essa é uma característica muito importante para a indústria, por uma matéria prima base ser possível transformá-la em outros subprodutos com fatores nutricionais de alta importância para a alimentação humana (MCSWEENEY; FOX, 2009, 2013).

### 2.2.1 Lactose

A lactose, o principal carboidrato do leite de muitos mamíferos, é um dissacarídeo formado por dois monossacarídeos: D-glicose e D-galactose unidos por uma ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica (MCSWEENEY; FOX, 2009; ORDÓÑEZ et al., 2005). Esta pode ser encontrada em três diferentes tipos, sendo elas duas isoméricas,  $\alpha$  e  $\beta$ -lactose, e em estado amorfo que é encontrado no leite em pó e no soro leite. A lactose é caracterizada como um açúcar redutor por ter um grupo aldeído livre em sua estrutura podendo desencadear a reação de Maillard se reagir com substâncias nitrogenadas. Sua hidrólise acontece em meio ácido e em altas temperaturas, por ser um açúcar estável (JOHNSON; CONFORTI, 2003; ORDÓÑEZ et al., 2005).

A lactose desempenha um papel importante no leite e produtos lácteos por ser um constituinte essencial na produção de fermentados, agrega valor nutritivo ao leite e seus derivados, interfere na textura de certos produtos concentrados e congelados, está diretamente ligado nas mudanças induzidas pela adição de calor na cor e no sabor de produtos lácteos e a formação de estruturas cristalinas (FOX et al., 2015).

Além do mais, a lactose possui duas funções importantes no leite: é uma fonte pronta de energia para o recém-nascido (fornece 30% do valor calórico do leite bovino) e é responsável por cerca de 50% da pressão osmótica do leite, que é isotônica com o sangue que é essencialmente constante. A síntese de lactose atrai água osmoticamente para as vesículas de Golgi e, portanto, afeta o volume do leite e a concentração de caseína, que é embalada nas vesículas de Golgi, no leite. Existe uma correlação inversa entre as concentrações de lactose e caseína no leite (MCSWEENEY; FOX, 2009)

### 2.2.2 Soro de Leite Bovino

Por definição, o soro do leite é “o produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos, caseína e produtos similares” (BRASIL, 2012). Este pode ser realizado por meio da coagulação enzimática, onde é utilizado o coalho obtido a partir do quarto do estômago de animais ruminantes (pH de 5,8 a 6,5 e 0,5% de sais); por meio da coagulação ácida que é obtida pela produção de ácido lático por bactérias contidas nos fermentos ou pela adição de ácidos orgânicos (pH de 4,5 a 4,8 e 0,8% de sais); pela separação física, onde as micelas de caseínas são separadas por meio do processo de microfiltração e por outros métodos. A escolha do tipo de coagulação depende do que se deseja como subproduto de queijo e de soro (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012;

SGARBIERI, 2004)(DANISCO, 2011; OLIVEIRA et. al, 2012; SGARBIER, 2004).

O soro é composto de lactose, minerais, algumas vitaminas e em sua maioria contém proteínas solúveis. Pode-se dizer, que as proteínas solúveis são cerca de 20% do total de proteínas nitrogenadas encontradas no leite. Estas têm propriedades nutritivas e funcionais, assim, atualmente, a indústria vem tendo grande interesse em utilizar o soro como substância para enriquecimento proteico e desenvolvimento de novos produtos alimentícios (HARAGUCHI et. al, 2006; OLIVEIRA et. al, 2012; ORDÓÑEZ et. al, 2005).

### **2.2.5.1 Proteínas solúveis**

Apresentando uma grande parcela de estrutura globular tridimensional com algumas pontes de dissulfeto, as proteínas solúveis do soro são abundantes em frações de  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, imunoglobulinas, soroalbumina bovina e outras proteínas (cerca de cem) em quantidades muito pequenas (HARAGUCHI et. al, 2006; ORDÓÑEZ et. al, 2005).

#### **2.2.5.1.1 $\beta$ -lactoglobulina**

A  $\beta$ -lactoglobulina é o maior peptídeo do soro, representando cerca de 3,2 g/L (cerca de 50% das proteínas solúveis) no soro e cerca de 12% do total de proteínas presentes no leite (FOX et al., 2015). Este tem forma globular por ser formado por duas pontes de dissulfeto, além de ser um péptico com maior cadeia ramificada de aminoácidos, cerca de 25,1 %. É resistente a ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, assim, elas são absorvidas no intestino delgado, isto porque possível médio peso molecular (18 kDa). Algumas pesquisas citam que a  $\beta$ -lactoglobulina tem como função o transporte de vitamina A em filhotes (CARRILHO, 2007; HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006).

#### **2.2.5.1.2 $\alpha$ -lactoalbumina**

A  $\alpha$ -lactoalbumina (Figura 1b) representa cerca de 20% do peptídeo do soro e é caracterizada em ser de fácil e rápida digestão. Esta faz parte do sistema enzimático responsável pela síntese da lactose, podendo dizer que os leites ricos em  $\alpha$ -lactoalbumina contêm elevada quantidade de lactose. Possui maior teor de triptofano (cerca de 6%) quando comparada a outras fontes proteicas, além de, também ser rica em lisina, leucina, treonina e cistina. Também tem como característica importante a sua atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas. Além disso, a  $\alpha$ -lactoalbumina é metaloproteína, esta liga um átomo de



cálcio por molécula, com isso se tem certa estabilidade térmica (HARAGUCHI, 2006 et. al; ORDÓÑEZ et. al, 2005).

### **2.2.5.1.3 Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas são frações proteicas mais heterogêneas constituídas por 4 cadeias polipeptídicas e podem atingir uma concentração de 1,0 g/L no leite. Estas atuam como anticorpos (imunidade passiva aos bezerros) e tem atividade antioxidante. E as imunoglobulinas presentes no leite a IgG, IgA, IgM e IgE, sendo que 80% do total é constituído pela IgG (HARAGUCHI, 2006 et. al; ORDÓÑEZ et. al, 2005; SGARBIERI, 2004).

A soroalbumina bovina é oriunda do sangue bovino, corresponde a cerca de 5% das proteínas do soro de leite e sua concentração varia entre 0,1-0,4 g/L. Tem alto peso molecular (66 kDa)., alta concentração em cistina, apresenta 17 ligações dissulfídicas e um gripo sulfidrila livre. Esta tem afinidade para se unir a ácidos graxos livres e outros lipídeos, ajudando no transporte na corrente sanguínea, além de estimular as atividades lipásicas (HARAGUCHI et. al, 2006; ORDÓÑEZ et. al, 2005).

Estes peptídeos são termolábeis, uns mais que outros menos, o que torna pouco viável um processo que contém inserção de calor, onde pode ocorrer a degradação de algumas proteínas importantes. Atualmente, nas indústrias se utiliza processos como a evaporação, com isso, há uma perda significativa de proteínas solúveis. Porém, há outros processos que estão sendo estudados para viabilizar a concentração do soro do leite tendo um produto com menor perda em suas propriedades nutricionais e funcionais, como o processo de crioconcentração (HARAGUCHI et.al., 2006; SGARBIERI, 2004).

## **2.3 Aditivos Orgânicos e Inorgânicos**

Aditivos são adicionados com o propósito de afetar os parâmetros do processo de cristalização e qualidade do produto (NÝVLT; ULRICH, 1995). Com os aditivos empregados em uma solução aquosa pode ser dividida em alguns grupos:

- 1) Aditivos Inorgânicos influenciam no crescimento dos cristais e podem ser subdivididos em:
  - Altamente ativos: pouca concentração de cátions polivalentes (como  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ ) ou ânions (como  $\text{PO}_4^{3-}$ ) são os suficientes para influenciar na cristalização.

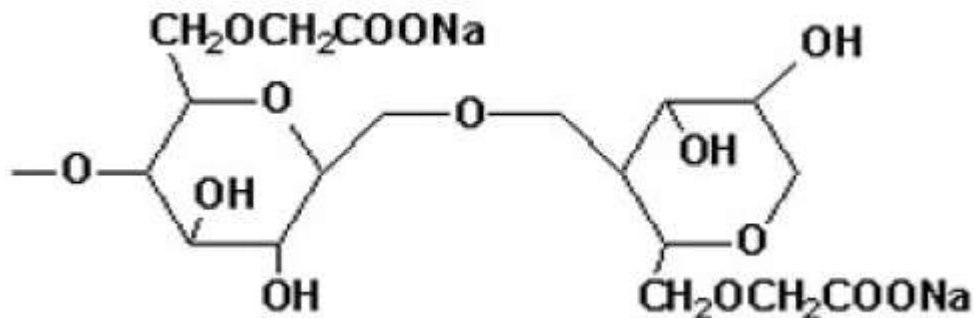
- Pouco ativos: esses precisam ser adicionados em maior concentração para ter efeito na cristalização.
- 2) Aditivos Orgânicos tem grande efeito na superfície ativa das substâncias. Essas influências dependem muito do meio, pois um mesmo aditivo pode influenciar no crescimento de cristal e no efeito de dissolução.
  - 3) pH influencia na forma e/ou tamanho do cristal.

Utilizando como base esses conceitos (NÝVLT; ULRICH, 1995), se fez o estudo da carboximetilcelulose, etanol e cloreto de cálcio, como aditivos do sistema proposto.

### 2.3.1 Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose sódica, conhecida como CMC, é um polissacarídeo de cadeia longa. Sua composição base é a celulose, uma molécula altamente polar e hidrofílica, porém insolúvel em água e formada por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Para que a molécula tenha como a propriedade hidrofílica, normalmente se introduz grupos de carboximetil sódico por meio da reação química com hidróxido de sódio aquoso, obtendo a estrutura demonstrada na Figura 2 (BOLDRINI; TOMAL; CUNHA, 2009; CAPITANI, 2004; CAPITANI et al., 2005).

Figura 1 - Estrutura da carboximetilcelulose sódica (CMC).



Fonte: CAPITANI, 2004.

Uma baixa concentração de CMC no meio proporciona um aumento de sua viscosidade, aumentando a taxa de deformação e diminuindo a tensão de cisalhamento do meio. Dependendo da quantidade de CMC adicionada na solução, pode ocasionar na formação de géis (BOLDRINI; TOMAL; CUNHA, 2009; CAPITANI, 2004).

A CMC é muito utilizada na indústria alimentícia (com alto grau de pureza). Quando adicionado em um meio proteico, se observa a interação por meio do aumento da viscosidade e outras medidas físicas. Este também auxilia na solubilidade das proteínas e em sua

estabilidade, dependentes da estequiometria das moléculas, da força iônica e do pH do meio (FEDDERSEN; THORP, 1993). A reatividade das proteínas com CMC pode ser utilizada para isolar, purificar e/ou recuperar caseínas e proteínas do soro de leite para fontes comerciais (CAPITANI, 2004; CAPITANI et al., 2005).

### **2.3.2 Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)**

O etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), conhecido também como álcool etílico, pertence ao grupo dos álcoois e se funde a -112 °C. Este é altamente solúvel em água, por causa da interação dipolo-dipolo entre as moléculas (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013).

Estudos anteriores indicam que a utilização de solventes orgânicos, como o etanol, para concentração de proteínas depende da temperatura. Foi concluído que em temperaturas negativas a interação de etanol com a água tem maior significância que a interação de ambos com a proteína, tendo então a desidratação nas superfícies de moléculas isoeletricas de proteína. E também foi concluído que, para que houvesse efetividade na concentração de proteínas, o meio deverá ter baixas concentrações de sais para não diminuir a atração eletrostáticas entre as proteínas (BOHÓRQUEZ, 2014).

### **2.3.3 Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>)**

O cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) é um cátion bivalente de ligação iônica. É utilizado, na indústria, na produção de queijos para aumentar o rendimento e na eficiência de coagulação das proteínas. Este aumenta o teor de Ca<sup>2+</sup> solúvel em água. Sem sua adição, a coagulação do leite é lenta e incompleta. Pela legislação (Instrução Normativa N° 30, de junho de 2001) é permitido a adição de 0,02-0,03 % de CaCl<sub>2</sub> no leite para a produção de queijo ((SILVA, 2003)).

Segundo alguns estudos, a solubilidade do grupo proteico de globulinas e algumas albuminas aumentam (salting-in) com a adição de sais neutros até um ponto crítico e depois decresce (salting-out), onde se inicia a competição entre as proteínas e os íons salinos para realizarem ligações de hidrogênio com a água (VOJDANI, 1996; MOTTA, 2002).

Em concentrações de sais abaixo de 1M, pode haver uma maior solubilidade das proteínas em água por diminuir as interações eletrostáticas entre as moléculas proteicas tendo como consequência a solvatação da proteína aumentando sua solubilidade. Por outro lado, em concentrações maiores que 1M, ocorre o decrescimento da solubilidade da proteína por induzir o aumento das interações hidrofóbicas, pois com a concentração maior de íons, as

moléculas de água tendem a se ligar fortemente com os íons, tendo como consequência a remoção de moléculas de água na superfície das proteínas e assim favorece a interação proteína-proteína, o que pode ocasionar a precipitação proteica. Entretanto, é importante salientar que com o aumento de concentração de sais, assim como de enzimas ou alterações de pH podem favorecer o processo de gelatinização da proteína, quando a solução é aquecida (BOHÓRQUEZ, 2014; MOTTA, 2002).

A agitação em rotações baixas é importante para a interação do sal ao sistema, o qual auxilia no processo de precipitação das proteínas, já que, com a agitação das moléculas em um meio com altas concentrações de íons favorece a quebra de ligações fracas das moléculas de água tendendo a se ligar fortemente com os íons. (BOHÓRQUEZ, 2014).

#### **2.4 Aplicações da concentração à frio na indústria de alimentos**

Masson et. al. (1985), com o intuito de obter um café solúvel de boa qualidade estudou o efeito da crioconcentração. O café torrado e moído foi dividido em três amostras, sendo que, a primeira amostra não foi submetida ao processo de crioconcentração. A amostra que foi crioconcentrada apenas uma vez apresentou teor de sólidos de 22 % no final, enquanto a amostra que foi crioconcentrada duas vezes apresentou teor de sólidos de 25 %, ou seja, um acréscimo de apenas 3 %. Sendo assim, a crioconcentração em uma única etapa é mais aconselhável técnica e economicamente. Além disso, a técnica de crioconcentração para o café auxilia a remoção do resíduo (borra) que porventura venham passar durante a extração do café.

Nunes & Amarante (2008), avaliaram o processo de crioconcentração para o suco de laranja. Para a obtenção do suco, foram utilizadas laranjas da variedade Pêra (*Citrus sinensis* L. Osbeck) as quais o suco foi extraído e posteriormente congelado e submetido ao processo de crioconcentração analisando o efeito de duas temperaturas: -80 °C (Tratamento I) e -30 °C (Tratamento II). As amostras do suco in natura e os extratos produzidos em cada ciclo dos dois tratamentos foram avaliados pela atividade de água ( $A_w$ ), teor de sólidos solúveis (°Brix), extrato seco total (EST), pH e acidez. O rendimento da extração foi de 48,54% e o teor de sólidos solúveis do suco in natura ficou próximo de 9,0 °Brix. Em relação ao °Brix e EST do suco concentrado existem diferença, a um nível de significância de 5 % de acordo com a análise de variância (ANOVA). Pela análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5 %, a variação de atividade de água, teor de ácido cítrico e pH não diferiram de um tratamento para o outro.

Aider & Halleux, 2008, realizaram um estudo, com intuito de analisar sucos de damasco e cereja crioconcentrados. Duas temperaturas de congelamento foram analisadas:  $-10 \pm 1$  °C,  $-20 \pm 1$  °C, e três estágios de crioconcentração foram estudados. A temperatura de congelamento não mostrou qualquer efeito sobre o teor de matéria seca total dos sucos concentrados, bem como sobre suas propriedades físico-químicas. Ao mesmo tempo, o número de estágio na crioconcentração foi altamente significativo para teor de matéria seca e qualidade do suco. A quantidade de matéria seca total do suco de damasco aumentou de 14,50 g/100 g para 35,50 g/100 g em três etapas de crioconcentração. Já para o teor de matéria seca total para o suco de cereja aumentou de 15,50 g/100 g para 45,50 g/100 g.

Hernández et. al. (2009), analisaram o processo de crioconcentração de sucos de maçã e pêra, bem como a concentração de soluções de açúcar através da modelagem de suco de pêra (fluido de simulação) utilizando um concentrador de película descendente de congelamento de multi-placas. Foi determinado com antecedência o ponto de congelamento dos fluidos na concentração de trabalho e os intervalos de temperatura. Diferentes parâmetros foram estudados para permitir o acompanhamento do processo de concentração de gelo, como a acumulação de gelo, a variação do teor de sólidos solúveis na solução e no gelo retirados, a produção de gelo e o consumo de energia. Os sucos de maçã e pêra testados apresentaram comportamento semelhante, enquanto a mistura de açúcares utilizados para a simulação apresentou melhor comportamento, devido talvez à ausência de espuma durante o processo. Foram obtidas concentrações de 30,2 °Brix e 30,8 °Brix com os sucos de maçã e pêra, respectivamente, e até 32,7 ° Brix com o fluido de simulação (HERNÁNDEZ et al, 2009).

Vários esforços e estudos têm sido feitos para aumentar a utilização de soro de leite, um valioso subproduto da produção de queijo, especialmente para a nutrição humana. Aider, Halleux & Melnikova (2009), utilizaram a tecnologia de crioconcentração para a recuperação e valorização do soro como ingrediente promissor na indústria de alimentos. O objetivo do trabalho foi otimizar o processo de crioconcentração para o soro, minimizando a quantidade de matéria seca retida na fração de gelo. Isso foi possível através da reciclagem da fração de gelo. Foi possível concentrar soro ácido de  $5,71 \pm 0,01$  % (p/p) para  $24,68 \pm 0,03$  % (p/p) de matéria seca total por meio de três ciclos de crioconcentração e um ciclo de reciclagem. O estudo também objetivou estudar as propriedades emulsificante e espumante do soro concentrado em função dos ciclos de crioconcentração. Os resultados mostraram que o índice de estabilidade da emulsão (ESI) do soro crioconcentrado aumentou, conforme o aumento do número de ciclos da crioconcentração, enquanto o índice de atividade emulsificante (EAI) diminuiu (AIDER, HALLEUX & MELNIKOVA, 2009).

Soro de queijo foi concentrado pelo método de criocongentração. Um processo de congelamento foi realizado em  $-10 \pm 1$  °C,  $-20 \pm 2$  °C e  $-40 \pm 2$  °C e o processo de degelo em  $18 \pm 2$  °C. O procedimento foi realizado em cinco níveis (estágio). Cada um concentrado de um nível anterior (estágio) foi usado como solução inicial para a fase de criocongentração seguinte. O concentrado e as frações de gelo foram analisados em cada estágio da criocongentração. Após quatro níveis de criocongentração foi possível concentrar o soro até 35 % da matéria seca. As proteínas totais foram concentradas até 20 % da matéria seca total. A lactose foi encontrada mais concentrada na fração de gelo, enquanto que as proteínas foram mais concentradas na fração não congelada (descongelado, criocongentrado). A eficiência do processo de concentração diminui quando aumenta o número de estágios da criocongentração. A otimização do processo por modelos matemáticos mostra que o número de Estágio ótimos é 3 (AIDER et al., 2007).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Preparo das amostras**

O soro de leite bovino (SLB) foi obtido nos Laticínios Vimilk Ltda. localizado na cidade de Perdões/MG. Ele foi recolhido do processo de fabricação de queijo, um processo de coagulação enzimática. Para isso, primeiramente o leite foi pasteurizado, acrescentados o fermento lácteo e o coalho obtendo, assim, a coalhada e o soro como subprodutos. O SLB foi encaminhado para o laboratório de Refrigeração de Alimentos (LARA) do departamento de Ciência dos Alimentos - UFLA, onde passou pela filtração usando um tecido de algodão como elemento filtrante e armazenado entre 0 e 4 °C no refrigerador, até sua aplicação no processo.

#### **3.2 Aditivos Orgânicos e Inorgânicos**

Como aditivos foram utilizados os reagentes: Carboximetilcelulose Sal Sódico USP (CMC) (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil); Cloreto de Cálcio P.A-ACS (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e Álcool Etilico 99,9% (Dinâmica, São Paulo, Brasil). Para os tratamentos que foram adicionadas concentrações de CMC, a solubilização do aditivo no SLB foi feita utilizando um agitador magnético, por 30 minutos. Após a dissolução a mistura (SLB com CMC) foi armazenada em freezer por 12 horas em temperaturas entre 0 e 4 °C para completar a hidratação do CMC.

Após o período de hidratação, foram adicionados ao SLB o  $\text{CaCl}_2$  e o etanol em concentrações definidas de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1. Foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 3 variáveis dependentes com 14 pontos axiais e 3 pontos centrais. Onde as variáveis foram as concentrações de CMC,  $\text{CaCl}_2$  e Etanol. Após o preparo os tratamentos foram fracionados em 3 porções para realizar o processo de concentração por congelamento.

Tabela 1 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR): Variáveis discretas e Variáveis reais.

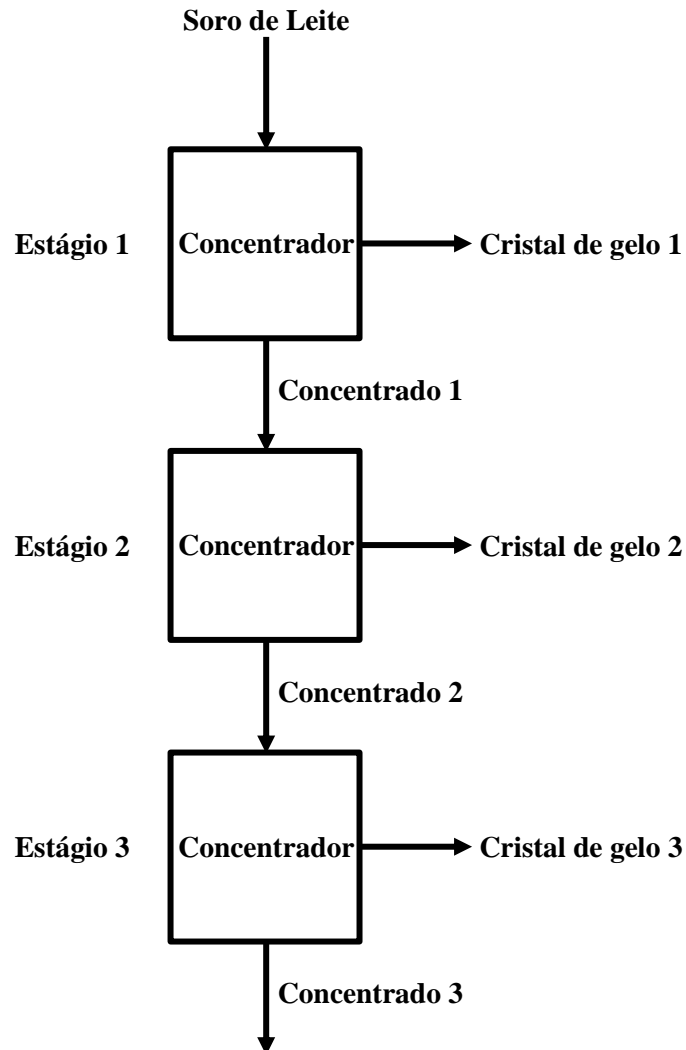
Tratamento	Variáveis Discretas			Variáveis Reais		
	Etanol (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	CMC (%)	Etanol (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	CMC (%)
1	-1	-1	-1	2,02	0,20	0,02
2	-1	-1	1	2,02	0,20	0,08
3	-1	1	-1	5	0,80	0,02
4	-1	1	1	2,02	0,80	0,08
5	1	-1	-1	7,98	0,20	0,02
6	1	-1	1	7,98	0,20	0,08
7	1	1	-1	7,98	0,80	0,02
8	1	1	1	7,98	0,80	0,08
9	-1,68	0	0	0	0,5	0,05
10	1,68	0	0	10	0,5	0,05
11	0	-1,68	0	5	0	0,05
12	0	1,68	0	5	1	0,05
13	0	0	-1,68	5	0,5	0
14	0	0	1,68	5	0,5	0,1
15	0	0	0	5	0,5	0,05
16	0	0	0	5	0,5	0,05
17	0	0	0	5	0,5	0,05
<b>Controle</b>	-	-	-	0	0	0

### 3.3 Processo de concentração por congelamento

O processo de concentração por congelamento para cada um dos tratamentos incluindo o controle foi feito em batelada em três estágios sendo processados 4 L de SLB em cada estágio. Um diagrama do processo está mostrado na Figura 2.



Figura 2 - Diagrama do processo de concentração por congelamento do SLB.

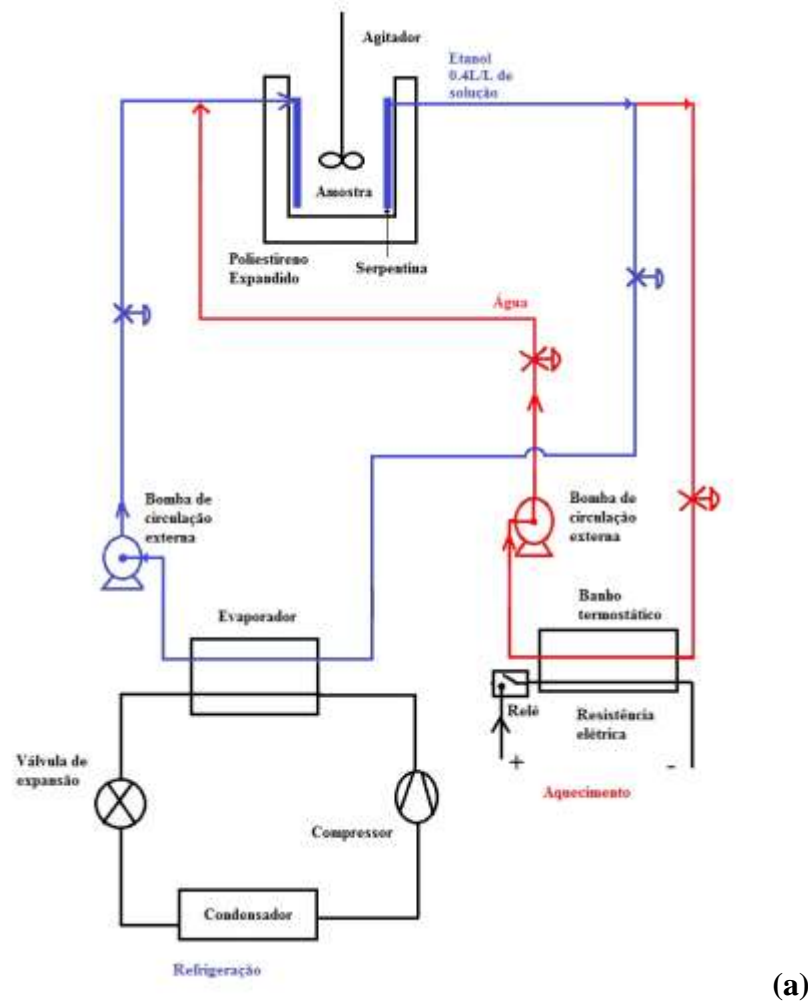


### 3.4 Concentrador

A concentração por congelamento das amostras foi feita em um concentrador construído no Laboratório conforme ilustrado na Figura 3. A formação do gelo ocorre sobre a superfície externa de uma serpentina de aço inox de 3/8'' (9,53 mm) de diâmetro por onde circula o refrigerante secundário. O refrigerante secundário utilizado para resfriamento/congelamento foi uma solução alcoólica (0,8 L de etanol/ litro de solução) à -12 °C recirculada de um banho ultratermostático (Nova Ética, Modelo: 521/3DF, Vargem Grande Paulista, Brasil). O tempo de permanência das amostras no concentrador foi fixado em 40 minutos, com agitação mecânica (marca IKA Labortechnik, modelo RW.20). Para acelerar o processo de remoção do gelo formado, água a 30 °C proveniente de um banho

termostático (Brookfield, Modelo: EX200, Stoughton, USA) foi recirculada através do circuito.

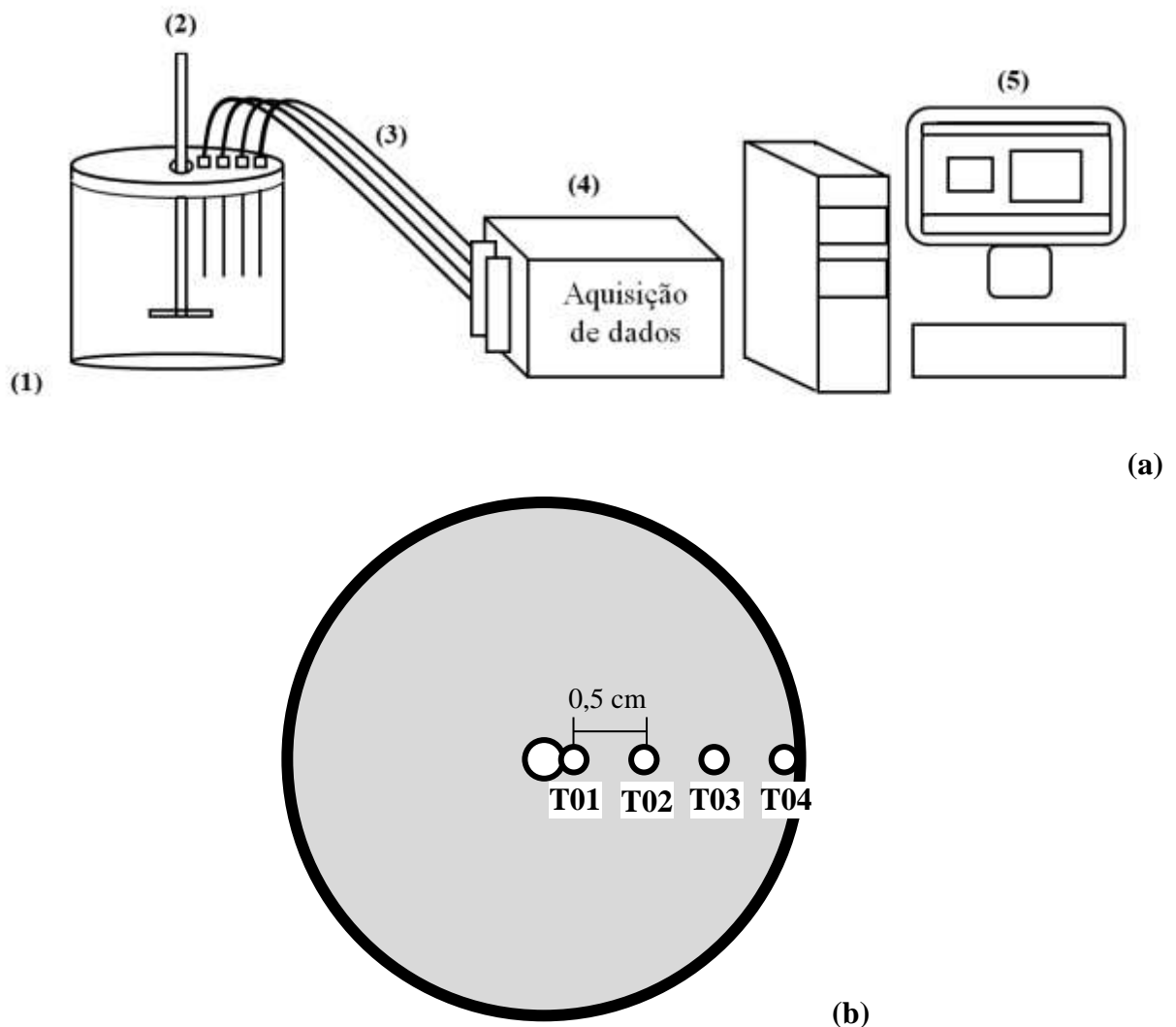
Figura 3 – (a) Montagem do concentrador. (b) Imagem real do concentrador.



Para a obtenção dos perfis de temperatura foram instalados na direção radial com 0,5 cm de distância e próximo a serpentina, 4 termopares tipo T de cobre-constantan (Omega

Engineering Inc. USA – AWG 30) conforme mostrado na Figura 3. A obtenção dos dados de temperatura em função do tempo foi feita por um sistema de condicionamento de sinais de dados (National Instruments Mod. SCXI – Hungry) e o software Lab View 8,5© foi usado para a aquisição dos dados. O intervalo entre medições foi de 10 segundos. A Figura 4 mostra uma representação do sistema de aquisição de dados e a distribuição radial dos termopares no interior do concentrador.

Figura 4 - (a) Desenho da aquisição de dados (1) concentrador; (2) agitador; (3) termopares; (4) aquisição de dados; (5) computador. (b) Posição dos termopares instalados no concentrador.



### 3.5 Protocolo de Análises físico-químicas

#### 3.5.1 Teor de sólidos solúveis totais, densidade, lactose e proteína

O teor de sólidos solúveis totais (SST), densidade, lactose e proteína foram determinadas usando o equipamento Lactoscan© (Ultrasonic milk analyzer; n° de serie: G0041P; Fabricante: Milk Otronic) (Figura 5), o qual utiliza como técnica de análise o ultrassom. Para a realização das análises, primeiramente, o equipamento foi calibrado usando uma amostra padrão de SLB. Após a calibração, a leitura das amostras foi feita em quadruplicata.

Figura 5 - Imagem do Lactoscan©.



As análises destes parâmetros foram feitas em termos dos resultados obtidos para as amostras concentradas comparadas aos resultados obtidos para a amostra padrão conforme a Equação 1:

$$\text{Variação (\%)} = \left( \frac{\text{Concentrado} - \text{Padrão}}{\text{Padrão}} \right) \times 100 (\%) \quad (1)$$

### 3.5.2 Viscosidade

As medidas reológicas foram realizadas usando um viscosímetro rotacional de cilindros concêntricos da marca BROOKFIELD DVIII Ultra (Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, USA), usando o adaptador para pequenas amostras 13R/RP (19,05 mm de diâmetro e 64,77 mm de profundidade) e o sensor de cisalhamento coaxial SC4. As amostras foram submetidas a uma rampa crescente de taxa de deformação que variou linearmente de  $0 \text{ s}^{-1}$  a  $240 \text{ s}^{-1}$  sendo tomados 13 pontos em cada ensaio. As medidas foram feitas em triplicata.

Com os valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e taxa de deformação ( $\gamma$ ) foram calculados os parâmetros reológicos índice de consistência ( $k$ ) e índice de comportamento do

fluido ( $n$ ) para o modelo lei da potência (Equação 2). Todos os parâmetros reológicos foram obtidos usando o software Reocalc (Versão V.3.1, Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, USA) para captura dos dados.

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (2)$$

onde:  $\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa);

$k$  = índice de consistência (Pa.s);

$\gamma$  = Taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ );

$n$  = índice de comportamento do fluido.

### 3.5.3 Colorimetria

A cor das amostras de SLB foi medida no colorímetro Konica Minolta Spectrophotometer CM-5 no sistema de cores de coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . Neste sistema de representação de cor, os valores  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  descrevem a uniformidade da cor no espaço tridimensional, em que o valor  $L^*$  corresponde o quão claro e quão escuro é o produto analisado (0 = preto; 100 = branco). Os valores de  $a^*$  correspondem à escala do verde ao vermelho ( $a^*$  negativo, verde;  $a^*$  positivo, vermelho) e os valores de  $b^*$  correspondem à escala do azul ao amarelo ( $b^*$  negativo, azul;  $b^*$  positivo, amarelo).

A partir dos valores de  $a^*$  e  $b^*$ , foram mensurados o ângulo Hue ( $h^*$ ) de cada ensaio, que indica a tonalidade cromática (atributo em que a cor é percebida), por meio da Equação 3 (MCGUIRE, 1992).

$$h^* = \arctg \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (3)$$

### 3.5.4 pH

A determinação do pH foi realizada usando pHmetro de bancada (MPA-210).

### 3.6 Estatística

Foi realizado um DCCR com pontos centrais (nível 0) e pontos axiais (níveis  $\pm \alpha$ ), totalizando 17 ensaios, associado ao método de superfície de resposta (MSR), conforme descrevem Rodrigues e Iemma (2009). A configuração experimental completa é apresentada na Tabela 1.

O modelo polinomial de segunda ordem foi ajustado para os dados experimentais, que podem ser ajustados na Equação 4.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_3 x_3 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + e \quad (4)$$

Onde  $Y_i$  é a variável resposta;  $\beta_0$  é um termo constante;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  são os coeficientes lineares (etanol,  $\text{CaCl}_2$  e CMC, respectivamente);  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  representam as variáveis codificadas (etanol,  $\text{CaCl}_2$  e CMC, respectivamente);  $e$  é a associação residual dos experimentos. Os modelos estatísticos foram avaliados para cada resposta por meio da análise estatística.

Para a elaboração dos modelos, foi utilizado o *software* Statistica 8.0, com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes dentro de um nível de confiança de 95 %, através de análises estatísticas apropriadas. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação dos resultados das análises físico químicas por metodologia de superfícies de respostas

#### 4.1.1 Estágio 1

##### 4.1.1.1 Concentrado 1

Na Tabela 2 estão os resultados das análises de regressão dos parâmetros físico-químicos das amostras obtidas no concentrado 1 do estágio 1 adicionadas de etanol,  $\text{CaCl}_2$  e CMC após concentração por congelamento. A Tabela 2 apresenta os coeficientes de correlação, o valor de  $F$  calculado e os coeficientes de regressão para cada ordem com seus respectivos  $p$  – *valor* para determinar as variáveis significativas envolvidas nas diferentes etapas do processo aplicados no modelo codificado completo mostrado na Equação 4.

O teste usual de significância da equação de regressão ajustada é o teste de hipótese nula ( $H_0$ ), que envolve o cálculo do valor  $F$  e compara esse valor calculado com o valor tabelado, utilizando a relação  $F_{\alpha,p-1,N-p}$ , onde  $N$  é o número de observações,  $p$  é o número de parâmetros ajustados e  $\alpha$  é o nível de significância. Se o valor  $F$  calculado exceder o valor de  $F_{\alpha,p-1,N-p}$  tabelado, então é inferido com um  $\alpha$  nível de significância que a variação contabilizada pelo modelo é significativamente maior do que a variação inexplicável. Em outras palavras, o valor mais alto de  $F$  calculado mais alto indica um melhor ajuste. Observou-se que praticamente todos os valores  $F$  calculados para os ajustes de curva apresentados na Tabela 2 estão acima do valor  $F$  tabelado ( $F_{tab} = 3,73$ ), indicando que os parâmetros são significativos (KHURI & CORNELL, 1996).

Outro parâmetro apresentado na Tabela 2 é o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O valor  $R^2$  é uma medida da proporção da variação dos valores observados em torno da média explicada pelo modelo ajustado. Na análise de variância apresentada na Tabela 2, o percentual de variação explicado pela regressão é superior a 97%. (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 1996).

Tabela 2 - Resultados das análises de regressão obtidas do delineamento composto central (DCCR) do concentrado 1 obtido no 1º estágio do processo de concentração por congelamento do SLB.

CONCENTRADO 1								
	Var. Densidade (%)		Var. Lactose (%)		Var. SST (°Brix)(%)		Var. Proteína (%)	
	Coef. Regressão	<i>p</i>	Coef. Regressão	<i>p</i>	Coef. Regressão	<i>P</i>	Coef. Regressão	<i>p</i>
$\beta_0$	206,227	0,000*	302,441	0,000*	238,976	0,000*	201,374	0,000*
$\beta_1$	77,250	0,000*	163,231	0,000*	107,829	0,000*	61,097	0,000*
$\beta_{11}$	2,955	0,562	19,693	0,112	8,160	0,332	1,003	0,808
$\beta_2$	15,598	0,010*	17,587	0,117	16,043	0,059	15,954	0,003*
$\beta_{22}$	10,074	0,077	16,760	0,165	8,219	0,329	3,972	0,350
$\beta_3$	-13,394	0,019*	-17,290	0,122	-25,197	0,009*	-12,722	0,010*
$\beta_{33}$	5,637	0,284	12,228	0,296	18,569	0,050*	-0,687	0,867
$\beta_{12}$	-8,248	0,195	-15,102	0,278	-10,124	0,313	-6,977	0,182
$\beta_{13}$	10,614	0,108	21,738	0,134	14,646	0,159	7,429	0,159
$\beta_{23}$	-17,830	0,017*	-29,657	0,054	-21,346	0,055	-15,633	0,013*
$R^2$	0,980		0,977		0,974		0,980	
$F$	38,694		32,889		29,071		37,359	

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ).

Legenda:  $\beta_0$  = coeficiente de interação;  $\beta_1$  = Etanol (%);  $\beta_{11}$  = (Etanol (%))<sup>2</sup>;  $\beta_2$  = CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{22}$  = (CaCl<sub>2</sub> (%))<sup>2</sup>;  $\beta_3$  = CMC (%);  $\beta_{33}$  = (CMC (%))<sup>2</sup>;  $\beta_{12}$  = Etanol (%) × CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{13}$  = Etanol (%) × CMC (%);  $\beta_{23}$  CaCl<sub>2</sub> (%) × CMC (%).

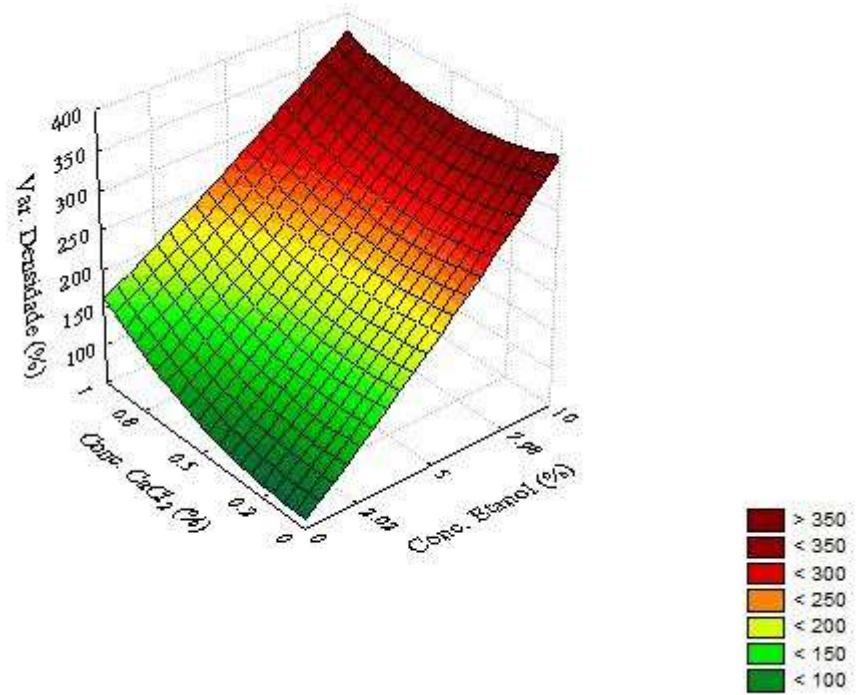
Observa-se na Tabela 2 que os aditivos (etanol, CaCl<sub>2</sub> e CMC) influenciaram de forma significativa e linear a densidade do concentrado de SLB após o estágio 1 do processo de concentração. Estes resultados permitiram a construção das superfícies de respostas mostradas na Figura 7. Estes três aditivos também influenciaram significativamente a variação da concentração de proteínas no concentrado 1. Houve um aumento linear positivo do teor de proteínas no concentrado 1 com o aumento das concentrações de etanol e CaCl<sub>2</sub> e linear negativo (redução) com o aumento da concentração de CMC.

Apenas a adição de etanol influenciou de forma linear e positiva a variação da concentração de lactose no concentrado 1 e os demais aditivos, CaCl<sub>2</sub> e CMC não produziram efeito significativo sobre este parâmetro. A adição de etanol também aumentou a variação do teor de sólidos solúveis totais e a adição de CMC influenciou de forma negativa na variação deste parâmetro. As análises dos coeficientes na Tabela 2 indicam que quanto maior a concentração de etanol (%), maiores são os valores da variação da densidade, teor de lactose, sólidos solúveis totais e proteínas. Também na Tabela 2 observa-se que a maior concentração de CaCl<sub>2</sub> (%) melhora a efetividade do processo aumentando de forma linear a variação da densidade e do teor de proteínas. A quantidade de CMC influencia de forma linear e negativa

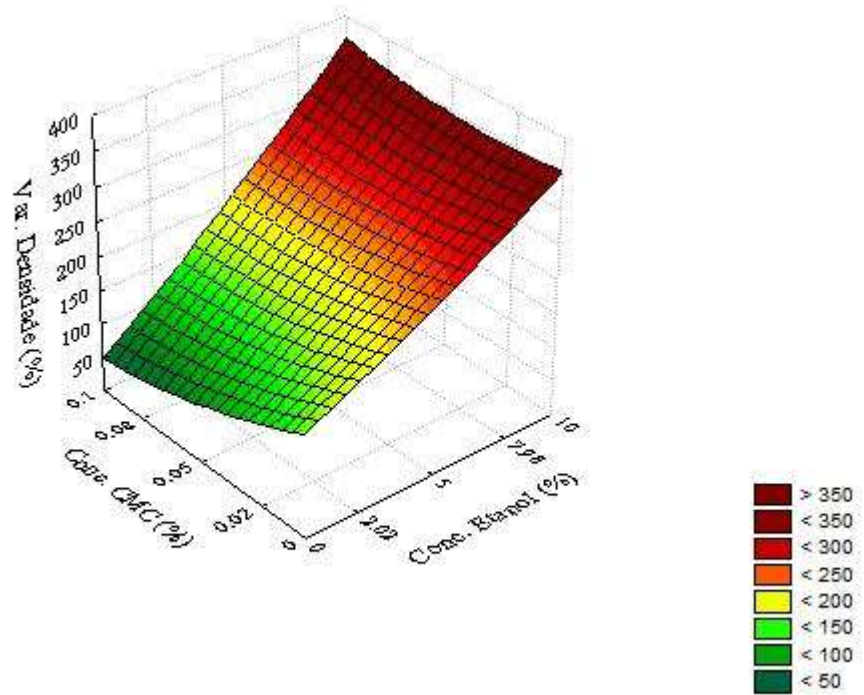


a variação da densidade, do teor de sólidos solúveis totais e do teor de proteínas, isto é, quanto maior a quantidade de CMC, menor a variação de todos destes componentes avaliados.

Figura 6 - Superfície de resposta para a variação da densidade do concentrado 1. (a) em função da concentração de etanol e  $\text{CaCl}_2$  e, (b) em função da concentração de etanol, e CMC.



(a)



(b)

A concentração de componentes no concentrado 1 foi mais efetiva para os tratamentos constituídos de maiores concentrações de etanol e  $\text{CaCl}_2$  e essa característica pode ser explicada por competições destes aditivos através de ligações covalentes e iônicas com a água no SLB liberando mais água livre nos sistemas e favorecendo a formação de gelo. Efeitos de interações moleculares entre estes aditivos e proteínas do SLB induzindo a formação de grandes cristais de gelo também tem sido discutida na literatura (COSTA et al. 2008).

#### 4.1.1.2 Cristal de gelo 1

Cristal de gelo 1 são os cristais formados e aderidos à serpentina do concentrador que são retirados após o estágio 1 de concentração. Os resultados estão mostrados na Tabela 3. As superfícies de respostas para o cristal de gelo 1 mostraram comportamento no gráfico que segue a mesma tendência que foi observada para o concentrado 1 (Figura 6).

Tabela 3 - Resultados de regressão do delineamento composto central (DCCR) do cristal de gelo 1 do 1º estágio do processo de cristalização à frio do SLB.

CRISTAL DE GELO 1								
	Var. Densidade (%)		Var. Lactose (%)		Var. SST (%)		Var. Proteína (%)	
	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P
$\beta_0$	158,870	0,000*	239,958	0,000*	185,444	0,000*	147,025	0,000*
$\beta_1$	84,998	0,000*	155,126	0,000*	108,485	0,000*	68,591	0,000*
$\beta_{11}$	6,638	0,258	18,609	0,1106	10,726	0,173	3,483	0,458
$\beta_2$	18,716	0,007*	21,415	0,0540	19,172	0,020	18,650	0,002*
$\beta_{22}$	5,119	0,374	11,010	0,316	7,172	0,345	3,712	0,430
$\beta_3$	-12,762	0,035*	-19,107	0,078	-15,309	0,049*	-11,639	0,024*
$\beta_{33}$	5,394	0,351	10,077	0,356	7,083	0,350*	4,351	0,359
$\beta_{12}$	-5,486	0,420	-9,314	0,467	-7,464	0,404	-4,910	0,382
$\beta_{13}$	11,133	0,126	20,136	0,140	13,369	0,156	8,786	0,139
$\beta_{23}$	-16,857	0,034*	-27,187	0,060	-19,567	0,053	-14,406	0,029*
$R^2$	0,980		0,977		0,978		0,979	
$F$	37,211		33,605		34,526		36,886	

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ).

Legenda:  $\beta_0$  = coeficiente de interação;  $\beta_1$  = Etanol (%);  $\beta_{11}$  = (Etanol (%))<sup>2</sup>;  $\beta_2$  =  $\text{CaCl}_2$  (%);  $\beta_{22}$  = ( $\text{CaCl}_2$  (%))<sup>2</sup>;  $\beta_3$  = CMC (%);  $\beta_{33}$  = (CMC (%))<sup>2</sup>;  $\beta_{12}$  = Etanol (%)  $\times$   $\text{CaCl}_2$  (%);  $\beta_{13}$  = Etanol (%)  $\times$  CMC (%);  $\beta_{23}$   $\text{CaCl}_2$  (%)  $\times$  CMC (%).

#### 4.1.2 Efeitos dos demais estágios no processo de concentração.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados das análises de regressão dos parâmetros físico-químicos das amostras adicionadas de etanol,  $\text{CaCl}_2$  e CMC após concentração por congelamento obtidas no concentrado e cristal de gelo dos estágios 2 e 3, respectivamente. Estas tabelas contêm os coeficientes de correlação, o valor de  $F$  calculado e os coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para cada ordem com seus respectivos  $p$  – valores para as variáveis significativas envolvidas nas diferentes etapas do processo aplicados no modelo codificado completo mostrado na Equação 4.

Os coeficientes das Tabelas 5 e 6 quando aplicados no modelo descrito pela equação (4) permitem a comparação do comportamento das variáveis respostas nos diferentes estágios. A Figura 8 mostra as variações da densidade, do teor de lactose, do teor de sólidos solúveis totais e do teor de proteínas em relação a uma amostra padrão como função da variação da concentração de etanol e fixando a concentração de  $\text{CaCl}_2$  em 0,5 % e de CMC em 0,05 %.

A Figura 7 mostra que estas variáveis respostas aumentam notavelmente com o aumento da concentração de etanol. Um fato que deve ser destacado é a redução da variação percentual das variáveis na fração de concentrado na sequência dos estágios 1, 2 e 3 testados nestes experimentos. Por outro lado, estas variações aumentam na fração de cristal de gelo sendo as maiores variações observadas no estágio 3 do processo de concentração por congelamento.

A Figura 8 mostra as variações da densidade, do teor de lactose, do teor de sólidos solúveis totais e do teor de proteínas em relação a uma amostra padrão como função da variação da concentração de  $\text{CaCl}_2$  e fixando a concentração de etanol em 5 % e de CMC em 0,05 %. Observa-se que nestes sistemas as magnitudes das variações foram inferiores. A Figura 10 mostra as variações da densidade, do teor de lactose, do teor de sólidos solúveis totais e do teor de proteínas em relação a uma amostra padrão como função da variação da concentração de CMC e fixando a concentração de etanol em 5 % e de  $\text{CaCl}_2$  em 0,5 %. De uma maneira geral e comparando com os aditivos  $\text{CaCl}_2$  e etanol observa-se na Figura 9 e Tabelas 4 e 5 que a concentração de CMC teve efeito pouco significativo sobre as variáveis respostas tanto para os concentrados como para os cristais de gelo.

Tabela 4 - Resultados da regressão do delineamento composto central rotacional (DCCR) para o concentrado 2 e para o cristal de gelo 2 do processo de concentração por congelamento do SLB.

CONCENTRADO 2								
	Var. Densidade (%)		Var. Lactose (%)		Var. SST (%)		Var. Proteína (%)	
	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P
$\beta_0$	228,151	0,000*	329,522	0,000*	261,677	0,000*	214,328	0,000*
$\beta_1$	76,004	0,000*	164,975	0,000*	109,687	0,0000*	61,184	0,000*
$\beta_{11}$	-3,598	0,397	15,220	0,155	6,908	0,263	-1,063	0,677
$\beta_2$	16,146	0,003*	17,607	0,082	16,283	0,016*	17,009	0,000*
$\beta_{22}$	6,639	0,140	13,940	0,188	8,211	0,192	2,728	0,302
$\beta_3$	-15,297	0,004*	-20,930	0,047*	-18,033	0,010*	-14,903	0,000*
$\beta_{33}$	3,454	0,416	8,927	0,381	4,436	0,461	-0,0124	0,996
$\beta_{12}$	-9,698	0,080	-16,384	0,192	-12,458	0,107	-7,429	0,038*
$\beta_{13}$	15,480	0,014*	29,242	0,037*	18,467	0,029*	11,240	0,006*
$\beta_{23}$	-13,694	0,023*	-26,301	0,054	-17,253	0,038*	-11,628	0,005*
$R^2$	0,980		0,982		0,982		0,992	
$F$	56,143		43,200		54,863		99,811	
CRISTAL DE GELO 2								
	Var. Densidade (%)		Var. Lactose (%)		Var. SST (%)		Var. Proteína (%)	
	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P
$\beta_0$	161,665	0,000*	238,339	0,000*	189,063	0,000*	145,693	0,000*
$\beta_1$	86,746	0,000*	165,508	0,000*	114,191	0,000*	70,683	0,000*
$\beta_{11}$	5,055	0,407	18,191	0,107	8,487	0,2980	2,381	0,556
$\beta_2$	19,470	0,007*	29,605	0,013*	21,217	0,018*	20,150	0,001*
$\beta_{22}$	11,350	0,088	18,004	0,110	9,331	0,256	10,877	0,026*
$\beta_3$	-9,905	0,099	-22,108	0,043*	-15,133	0,063	-9,632	0,028*
$\beta_{33}$	6,777	0,275	12,085	0,259	8,250	0,310	6,492	0,136
$\beta_{12}$	-7,618	0,300	-23,538	0,084	-14,816	0,142	-7,979	0,124
$\beta_{13}$	10,587	0,163	33,228	0,025*	20,071	0,060	9,271	0,082
$\beta_{23}$	-16,453	0,046*	-12,888	0,306	-13,304	0,181	-13,662	0,020*
$R^2$	0,978		0,982		0,977		0,985	
$F$	34,357		42,142		33,766		52,645	

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ).

Legenda:  $\beta_0$  = coeficiente de interação;  $\beta_1$  = Etanol (%);  $\beta_{11}$  = (Etanol (%))<sup>2</sup>;  $\beta_2$  = CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{22}$  = (CaCl<sub>2</sub> (%))<sup>2</sup>;  $\beta_3$  = CMC (%);  $\beta_{33}$  = (CMC (%))<sup>2</sup>;  $\beta_{12}$  = Etanol (%) × CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{13}$  = Etanol (%) × CMC (%);  $\beta_{23}$  = CaCl<sub>2</sub> (%) × CMC (%).

Tabela 5 - Resultados da regressão do delineamento composto central rotacional (DCCR) para o concentrado 3 e para o cristal de gelo 3 do processo de concentração por congelamento do SLB.

CONCENTRADO 3								
	Var. Densidade (%)		Var. Lactose (%)		Var. SST (%)		Var. Proteína (%)	
	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P
$\beta_0$	233,972	0,000*	352,844	0,000*	271,034	0,000*	215,389	0,000*
$\beta_1$	73,366	0,000*	163,789	0,000*	88,357	0,002*	60,077	0,000*
$\beta_{11}$	-5,867	0,082	9,321	0,267	12,262	0,572	0,745	0,848
$\beta_2$	7,710	0,022*	5,910	0,428	27,850	0,182	8,976	0,034*
$\beta_{22}$	6,796	0,051	6,254	0,445	13,017	0,549	5,222	0,206
$\beta_3$	-14,945	0,001*	-24,463	0,010*	-38,817	0,078	-15,218	0,003*
$\beta_{33}$	4,024	0,207	4,415	0,586	10,574	0,625	1,933	0,622
$\beta_{12}$	-6,430	0,103	-13,820	0,176	-41,928	0,132	-0,614	0,894
$\beta_{13}$	11,496	0,012*	17,817	0,094	46,660	0,099	9,528	0,070
$\beta_{23}$	-15,663	0,003*	-33,692	0,008*	-56,983	0,053*	-11,789	0,033*
$R^2$	0,992		0,988		0,854		0,980	
$F$	96,785		64,093		4,566		39,072	
CRISTAL DE GELO 3								
	Var. Densidade (%)		Var. Lactose (%)		Var. SST (%)		Var. Proteína (%)	
	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P	Coef. Regressão	P
$\beta_0$	178,203	0,000*	264,713	0,000*	206,713	0,000*	166,032	0,000*
$\beta_1$	82,348	0,000*	157,689	0,000*	107,969	0,000*	65,970	0,000*
$\beta_{11}$	7,997	0,233	25,569	0,064	14,669	0,104	5,020	0,327
$\beta_2$	15,625	0,026*	15,623	0,183	15,652	0,065	16,318	0,007*
$\beta_{22}$	7,402	0,266	13,251	0,293	8,925	0,294	5,1567	0,315
$\beta_3$	-11,664	0,074	-17,010	0,152	-13,034	0,111	-9,826	0,058
$\beta_{33}$	3,352	0,601	7,358	0,548	4,765	0,564	2,553	0,609
$\beta_{12}$	-10,767	0,182	-16,629	0,2684	-12,720	0,215	-9,464	0,138
$\beta_{13}$	11,086	0,171	22,738	0,144	14,939	0,154	8,043	0,198
$\beta_{23}$	-16,476	0,058	-26,621	0,096	-19,797	0,072	-14,244	0,040*
$R^2$	0,985		0,972		0,973		0,974	
$F$	27,051		26,647		27,705		29,382	

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ).

Legenda:  $\beta_0$  = coeficiente de interação;  $\beta_1$  = Etanol (%);  $\beta_{11}$  = (Etanol (%))<sup>2</sup>;  $\beta_2$  = CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{22}$  = (CaCl<sub>2</sub> (%))<sup>2</sup>;  $\beta_3$  = CMC (%);  $\beta_{33}$  = (CMC (%))<sup>2</sup>;  $\beta_{12}$  = Etanol (%) × CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{13}$  = Etanol (%) × CMC (%);  $\beta_{23}$  = CaCl<sub>2</sub> (%) × CMC (%).

Figura 7 - Comportamento das variáveis respostas (a) densidade, (b) teor de lactose, (c) teor de sólidos solúveis e (d) teor de proteínas em função da concentração de etanol, 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % de CMC nos concentrados e cristais de gelo separados nos Estágios 1, 2 e 3 do processo de concentração por congelamento.

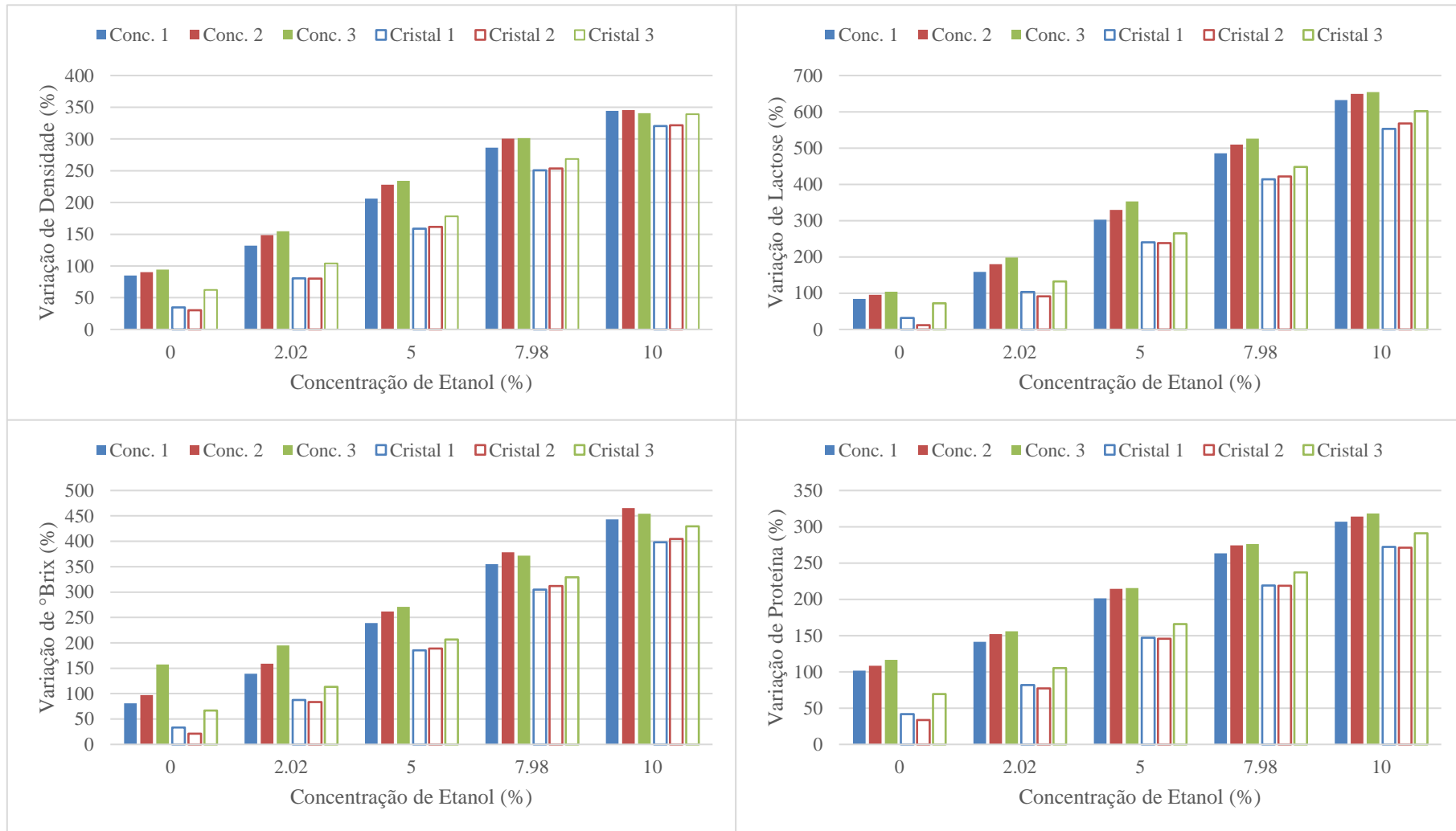


Figura 8 - Comportamento das variáveis respostas (a) densidade, (b) teor de lactose, (c) teor de sólidos solúveis e (d) teor de proteínas em função da concentração de  $\text{CaCl}_2$ , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC nos Concentrados e Cristais de Gelo separados nos Estágios 1, 2 e 3 do processo de concentração por congelamento.

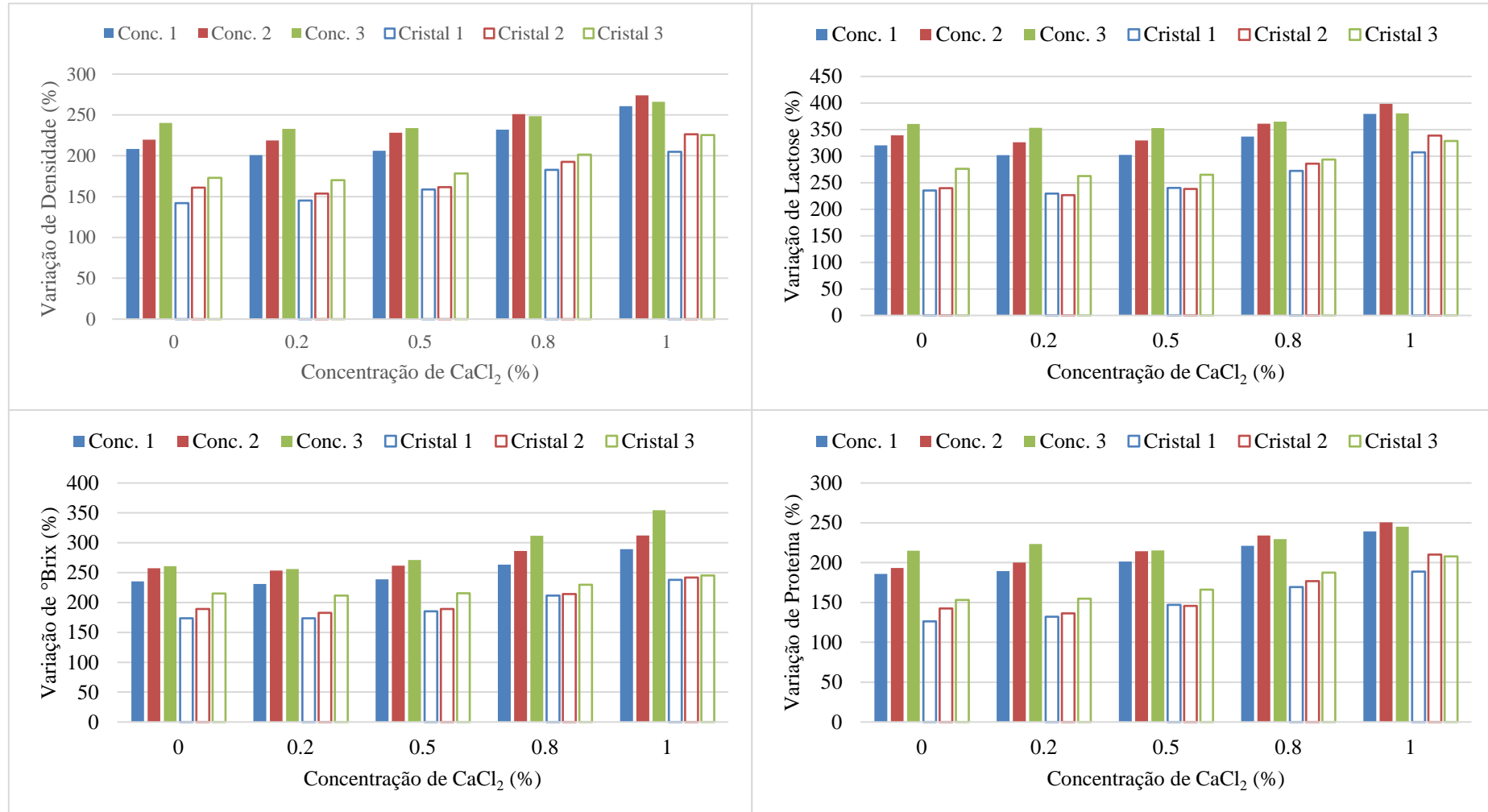
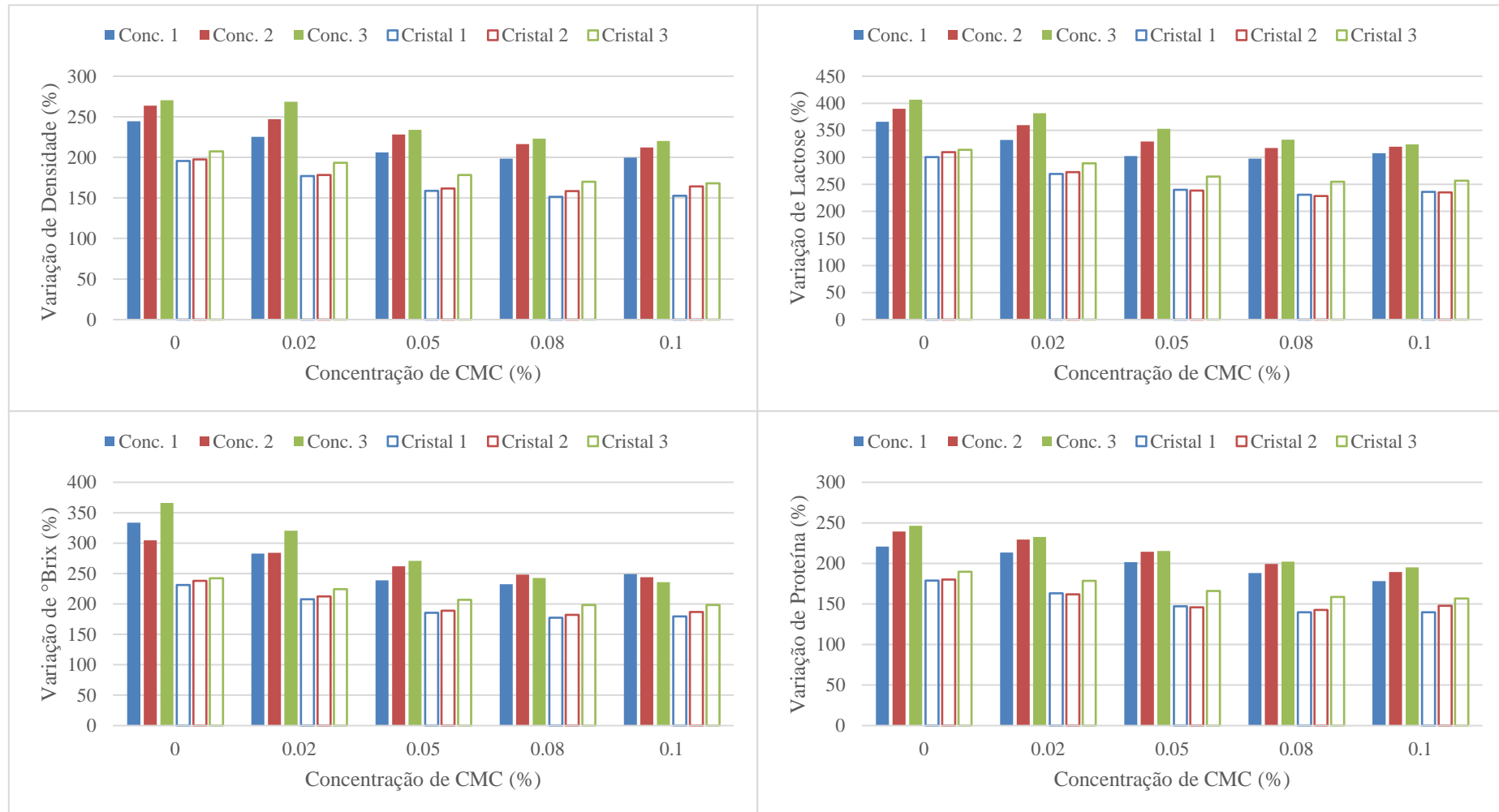


Figura 9 - Comportamento das variáveis respostas (a) densidade, (b) teor de lactose, (c) teor de sólidos solúveis e (d) teor de proteínas em função da concentração de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de CaCl<sub>2</sub> nos Concentrados e Cristais de Gelo separados nos Estágios 1, 2 e 3 do processo de concentração por congelamento.





Foram feitas análises estatísticas dos resultados dos parâmetros de cor nas amostras de SLB em todos os estágios. Os resultados mostraram que no primeiro estágio os dados obtidos na tabela ANOVA não foram significativos ao nível de 95%, e não foi possível ajustar ao modelo da equação (4). No segundo estágio, os resultados obtidos para ângulo Hue do concentrado 2 foram significativos sendo possível realizar a regressão dos dados e para o cristal de gelo 2 este parâmetro não foi significativo. No terceiro estágio a variação do ângulo de Hue foi significativa nas amostras de cristal de gelo 3. Os resultados das análises de regressão estão apresentados na Tabela 6 e as superfícies de respostas para o concentrado 2 e cristal de gelo 3 em função das concentrações de etanol e CaCl<sub>2</sub> estão mostradas nas Figuras 10a e 10b, respectivamente.

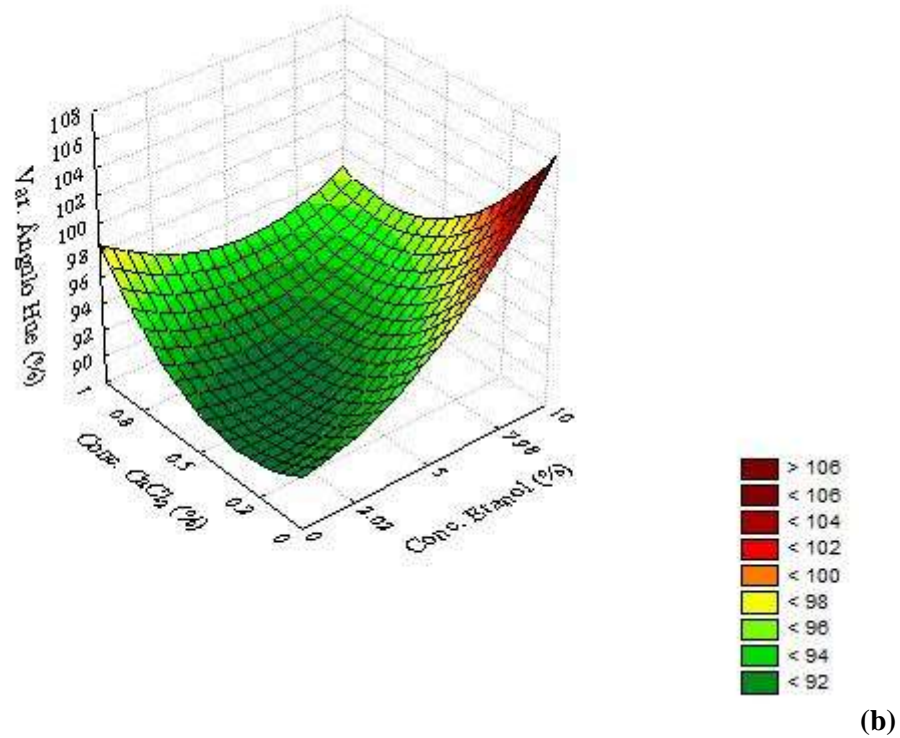
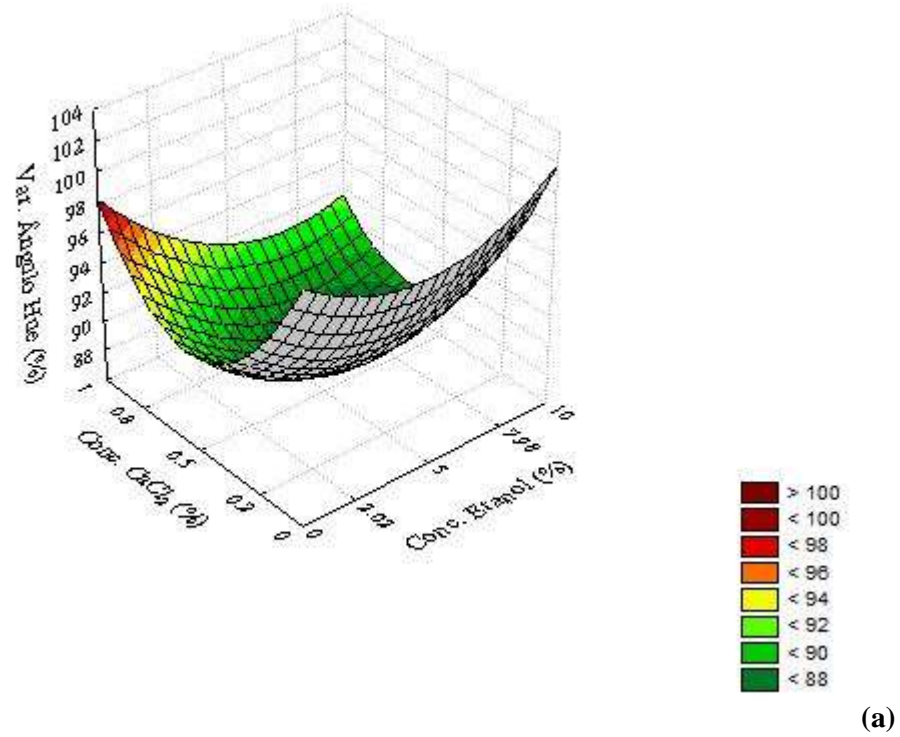
Tabela 6 - Resultados da análise de regressão do delineamento composto central (DCCR) para a variação do ângulo Hue no processo de concentração por congelamento do SLB.

	CONCENTRADO 2		CRISTAL DE GELO 3	
	Coef. Regressão	p	Coef. Regressão	p
$\beta_0$	87,384	0,000*	90,932	0,000*
$\beta_1$	-0,904	0,415	1,864	0,062
$\beta_{11}$	1,150	0,350	1,103	0,272
$\beta_2$	-1,986	0,098	-0,505	0,567
$\beta_{22}$	2,689	0,051	1,525	0,144
$\beta_3$	0,556	0,610	-1,411	0,137
$\beta_{33}$	6,370	0,001*	0,351	0,716
$\beta_{12}$	-0,628	0,658	-1,477	0,221
$\beta_{13}$	4,517	0,013*	4,512	0,005*
$\beta_{23}$	-5,191	0,007*	-2,906	0,033*
$R^2$	0,899		0,841	
$F$	6,950		4,119	

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ).

Legenda:  $\beta_0$  = coeficiente de interação;  $\beta_1$  = Etanol (%);  $\beta_{11}$  = (Etanol (%))<sup>2</sup>;  $\beta_2$  = CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{22}$  = (CaCl<sub>2</sub> (%))<sup>2</sup>;  $\beta_3$  = CMC (%);  $\beta_{33}$  = (CMC (%))<sup>2</sup>;  $\beta_{12}$  = Etanol (%) × CaCl<sub>2</sub> (%);  $\beta_{13}$  = Etanol (%) × CMC (%);  $\beta_{23}$  = CaCl<sub>2</sub> (%) × CMC (%).

Figura 10 - Superfícies de resposta da variável ângulo Hue para o (a) concentrado 2 e (b) cristal de gelo 3.



A variação de pH não influenciou significativamente no processo de concentração por congelamento e não interfere nas interações dos aditivos no SLB.

#### **4.2 Históricos de temperaturas nos processos de concentração por congelamento**

Os gráficos da Figura 11 foram obtidos das leituras de termopares instalados próximo à região central do concentrador (T02) para obtenção da variação da temperatura em função do tempo para as amostras de concentrados e, próximo à superfície (T04) para obtenção da variação da temperatura em função do tempo para as amostras de cristais de gelo dos tratamentos constituídos de diferentes concentrações de etanol, 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % de CMC (Figura 12a); diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC (Figura 12b) e; diferentes concentrações de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$ . Estes tratamentos foram selecionados para as análises com o objetivo de avaliar os efeitos individuais de cada aditivo sobre os históricos de temperatura das amostras.

Observa-se nas Figuras 11a<sub>1</sub>, 11b<sub>1</sub> e 11c<sub>1</sub> (região T02) que durante todo o tempo de processamento as temperaturas dos concentrados permaneceram em patamares constantes após atingirem a temperatura de início de congelamento caracterizando um estado de equilíbrio solução-cristal de gelo, ou seja, as amostras de concentrado não congelaram. As Figuras 12a<sub>2</sub>, 12b<sub>2</sub> e 12c<sub>2</sub> (região T04, próxima à serpentina do concentrador) mostram a rápida formação dos cristais de gelo aderidos à serpentina. Em todos os gráficos da Figura 12, comparando com o histórico de resfriamento da amostra controle é possível observar os efeitos individuais dos aditivos na redução da temperatura de início de congelamento e velocidade de formação dos cristais de gelo aderidos à serpentina. Neste contexto, o efeito é notável e proporcional ao aumento da concentração de etanol e também, com pouca intensidade, no aumento da concentração de  $\text{CaCl}_2$ . O aumento da concentração de etanol proporcionou um retardo na formação de cristais de gelo que ocorreu às temperaturas extremamente baixas. Para a adição de  $\text{CaCl}_2$  e CMC não se observa grandes alterações nos perfis de temperatura, pontos de início de congelamento ou velocidade de formação de cristais de gelo.

Os efeitos dos estágios estão mostrados na Figura 12 para os tratamentos com 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$ , 0,05 % de CMC e diferentes concentrações de etanol para os concentrados e cristais de gelo separados nos estágios 1, 2 e 3.

Figura 11 - Perfis de temperatura em função da concentração (a) de etanol, 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % de CMC; (b) em função da concentração de  $\text{CaCl}_2$ , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC e; (c) em função da concentração de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados no estágio 1.

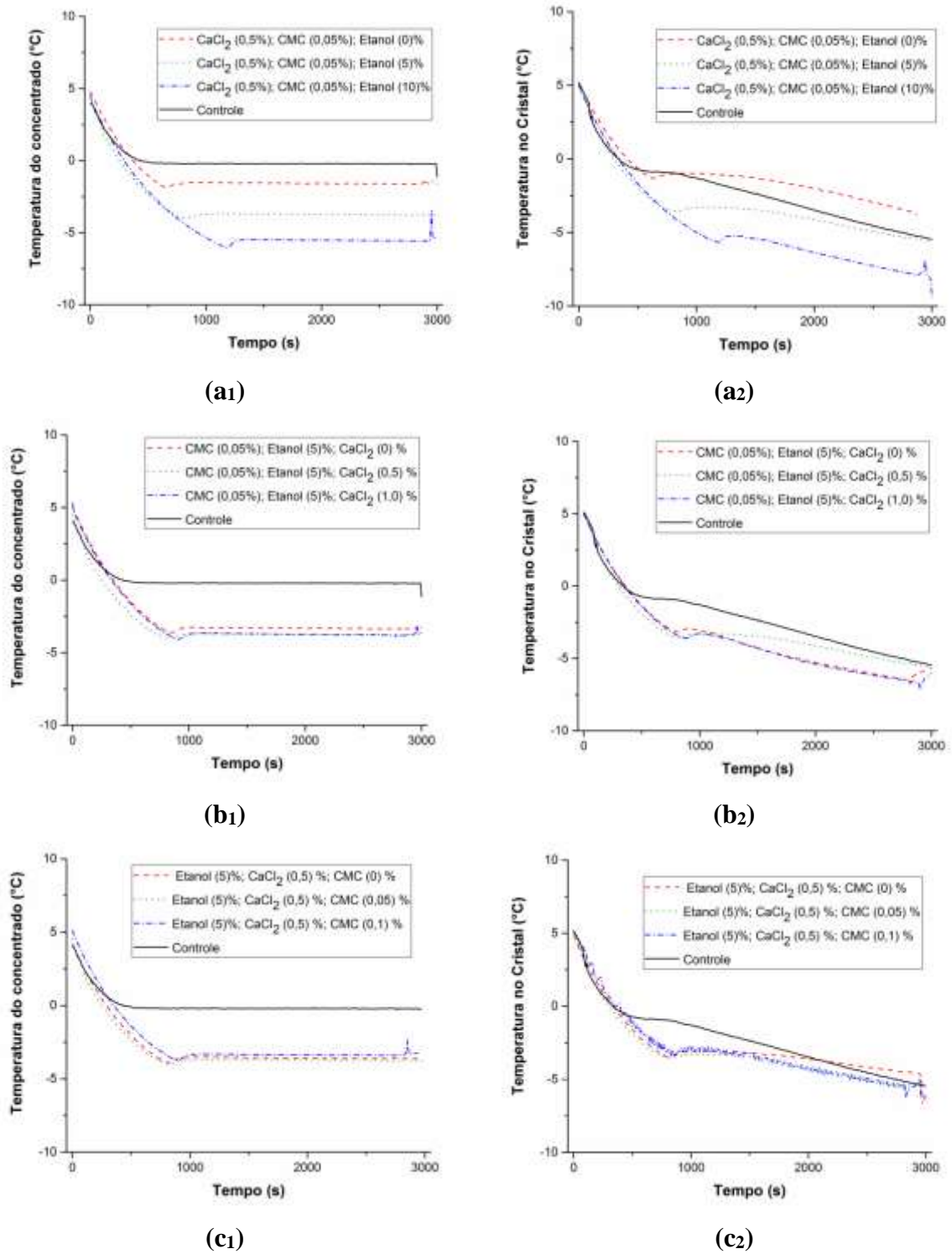
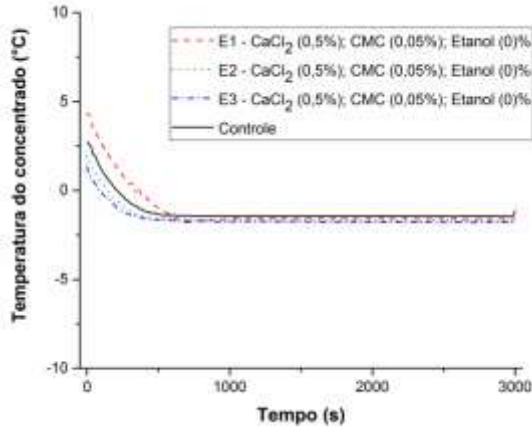
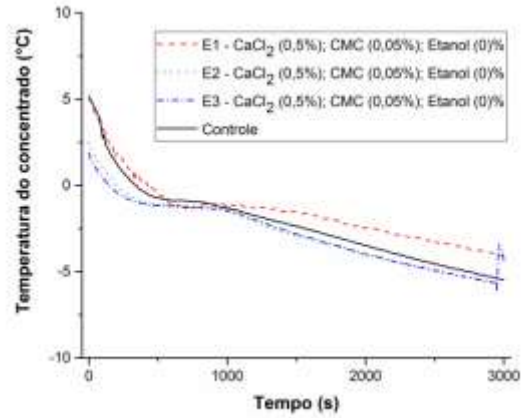


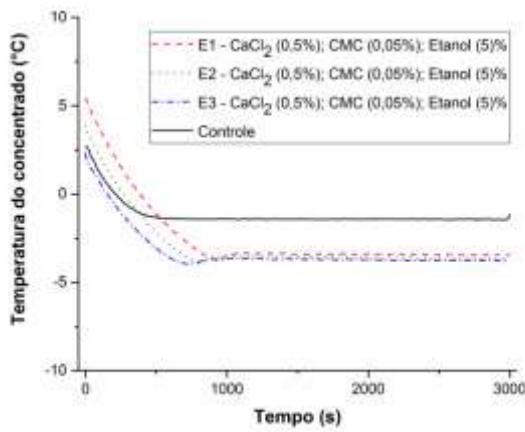
Figura 12 - Perfis de temperatura em função da concentração de etanol e fixando 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % de CMC nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados nos estágios 1, 2 e 3.



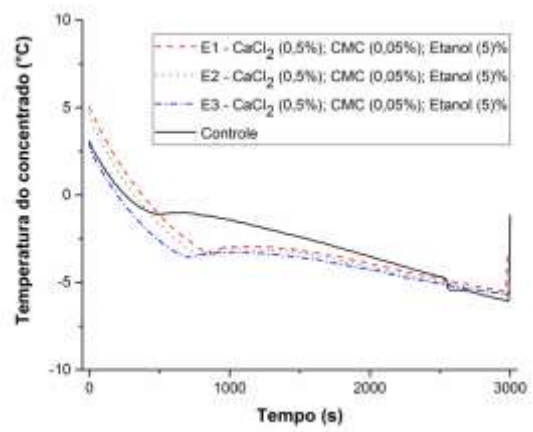
(a1)



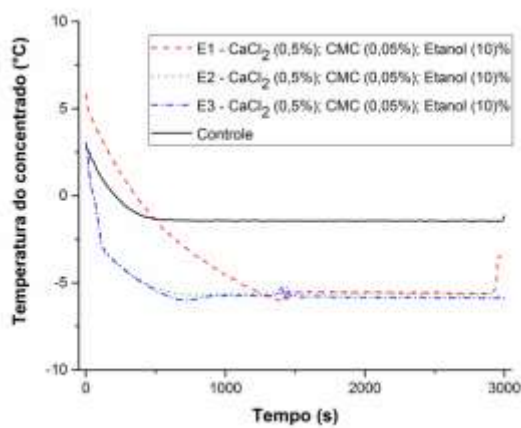
(a2)



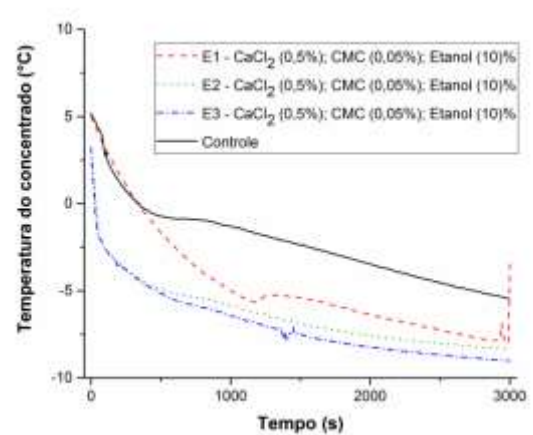
(b1)



(b2)



(c1)



(c2)

A Figura 12 mostra que para a fração de concentrado de SLB sem adição de etanol, a temperatura inicial de congelamento praticamente não foi alterada com o aumento do número de estágios. Isto é uma indicação de não haver alterações na composição dos concentrados com o aumento do número de estágios. Nos sistemas constituídos de etanol 5% ocorrem alterações notáveis nas temperaturas de subresfriamento das amostras de SLB nos três estágios. No estágio 1 (E1) a taxa de resfriamento é mais lenta e se torna mais rápida nos estágios 2 (E2) e 3 (E3), respectivamente. Os subresfriamentos e temperaturas iniciais de congelamento são dependentes dos teores de sólidos solúveis. Quanto maior o teor de sólidos solúveis totais mais baixos são os níveis de subresfriamento e a presença de etanol diminui a temperatura de início de congelamento e a formação de cristais de gelo. Nas amostras de SLB com etanol e aditivos, o aumento do número de estágios melhorou a eficiência do processo de concentração por congelamento. Estas observações também são válidas quando a concentração de etanol adicionada ao SLB é aumentada para 10%. No entanto, neste caso o efeito é observado apenas comparando os estágios E1 e E2. Os estágios E2 e E3 mostraram resultados similares quanto aos perfis de temperatura.

O que se destaca é que estes efeitos foram mais notáveis nas frações de cristais de gelo e podem ser comprovadas e associadas ao aumento da densidade, teor de lactose, teor de sólidos solúveis e teor de proteínas nas frações de cristal de gelo mostradas na Figura 8. Este comportamento no processo de concentração por congelamento do SLB está parcialmente de acordo com o trabalho de AIDER et al., 2007 onde lactose foi encontrada mais concentrada na fração de gelo, enquanto que as proteínas foram mais concentradas na fração não congelada (descongelado, crioconcentrado). Neste trabalho a maior fração de proteína também foi encontrada na fração Cristal de Gelo e é atribuída à presença de etanol. AIDER et al., 2007 observaram que a eficiência do processo de concentração diminui quando aumenta o número de estágios da concentração por congelamento e que o número de estágio ótimos é 3. Neste trabalho a presença de aditivos principalmente  $\text{CaCl}_2$  e etanol influenciaram na eficiência dos Estágios 2 e 3 e mostraram que o aumento do número de estágios aumentou a concentração de lactose, sólidos solúveis totais e proteínas na fração cristal de gelo.

### **4.3 Viscosidade**

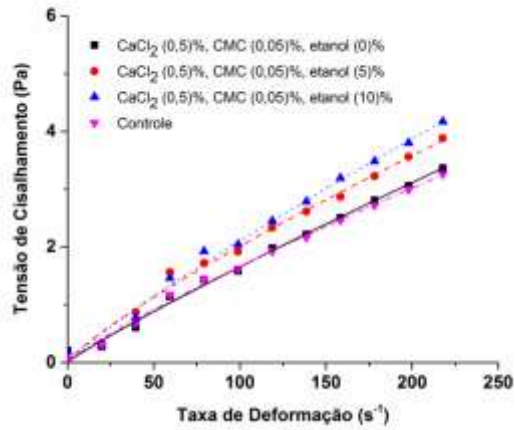
A Figura 13 mostra as curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para amostras de SLB adicionadas de diferentes concentrações de etanol e fixando em 0,5 % a concentração de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % a concentração de CMC (Figura 13a); adicionadas de diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC (Figura

13b) e; adicionadas de diferentes concentrações de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 13c) nos concentrados e cristais de gelo separados no estágio 1. Os efeitos do número de estágios do processo de concentração por congelamento sobre a tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação estão mostrados na Figura 14. Os resultados dos parâmetros reológicos, índice de consistência ( $k$ ) e índice de comportamento de fluxo ( $n$ ), obtidos pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo lei da potência estão mostrados na Tabela 7.

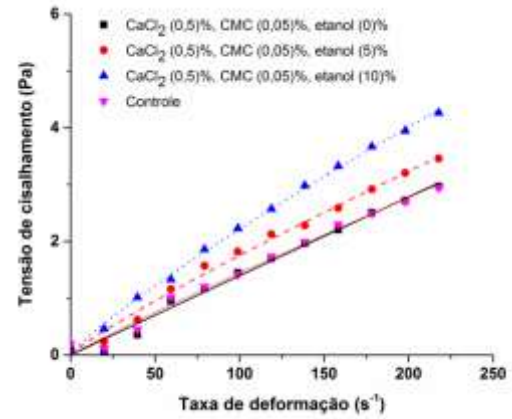
Comparando com a amostra controle e o efeito individual de cada aditivo, a Figura 13a mostra que a tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação aumenta com a adição de etanol o que indica o aumento da viscosidade aparente das amostras de SLB após o estágio (E1) do processo de concentração por congelamento. Este aumento é mais evidente nas amostras das frações de cristal de gelo como demonstrado na Figura 14a<sub>2</sub>. Este comportamento de aumento da viscosidade após o processo de concentração também foi observado nas amostras de SLB contendo  $\text{CaCl}_2$  e CMC e são causados pelo aumento da quantidade de solutos após o estágio (E1). Porém, nestes sistemas, as diferenças entre as tensões de cisalhamento dos concentrados e dos cristais de gelo são mais difíceis de serem identificadas e os comportamentos parecem similares.

Os efeitos dos estágios E1, E2 e E3 no aumento das tensões de cisalhamento são mostradas na Figura 14. Os efeitos são notáveis com o aumento da concentração de etanol comparado com o sistema controle e menos evidentes quando se compara os efeitos entre os estágios E1, E2 e E3.

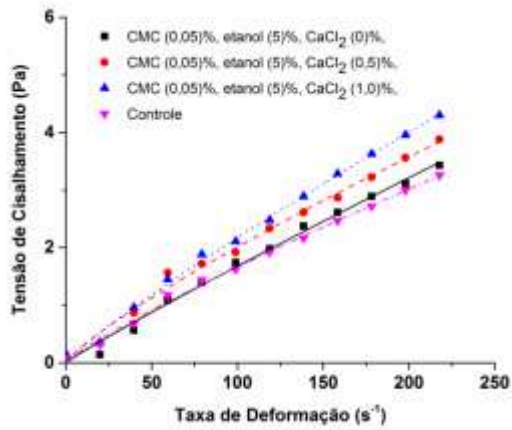
Figura 13 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação de amostras de SLB adicionadas de diferentes concentrações de (a) etanol, 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % de CMC; (b) de  $\text{CaCl}_2$ , 5 % de etanol e 0,05 % de CMC e; (c) de CMC, 5 % de etanol e 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados no estágio 1.



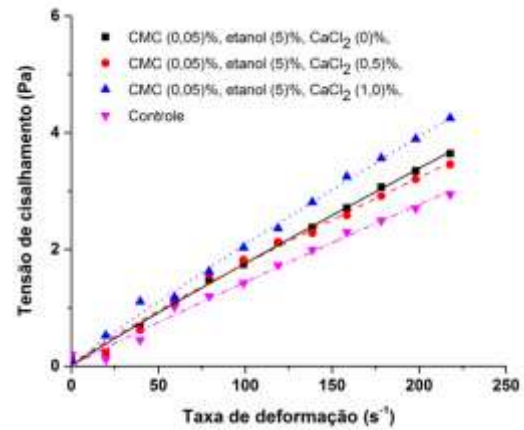
(a1)



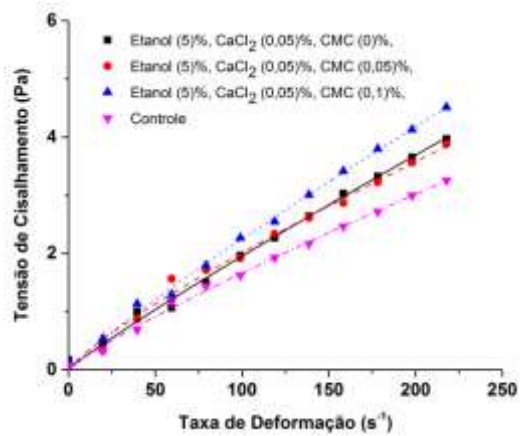
(a2)



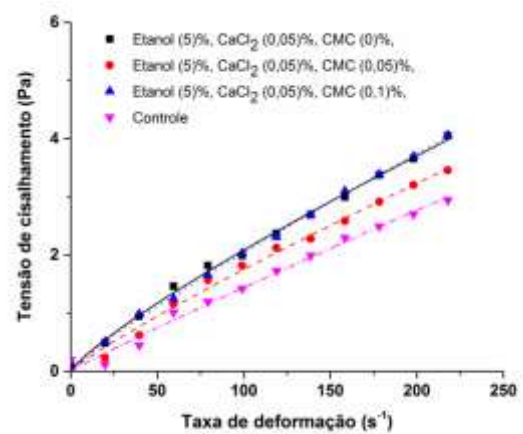
(b1)



(b2)



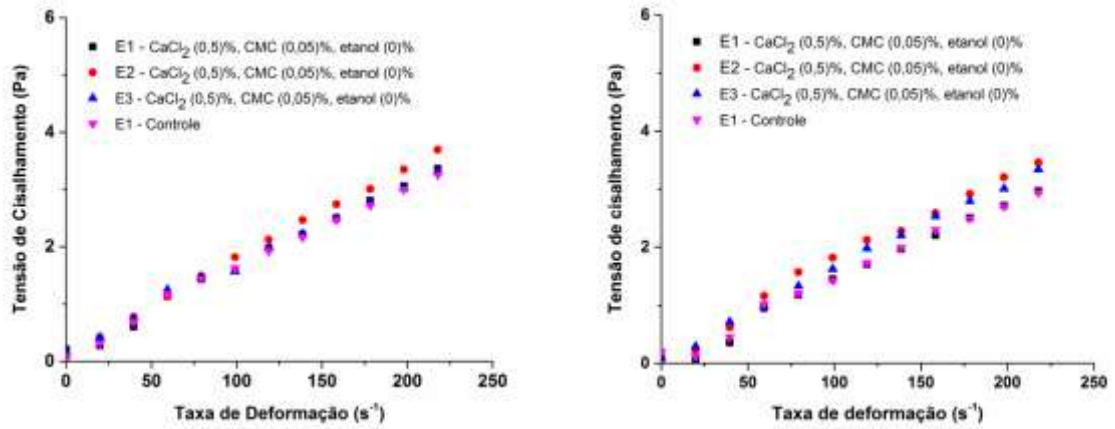
(c1)



(c2)

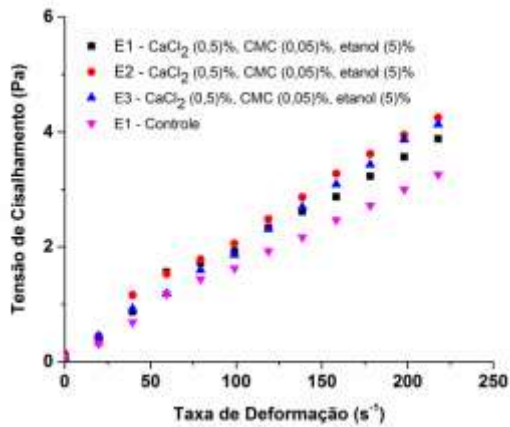


Figura 14 - Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para amostras com diferentes concentrações de etanol e fixando 0,5 % de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % de CMC nos (1) concentrados e (2) cristais de gelo separados nos estágios 1, 2 e 3.

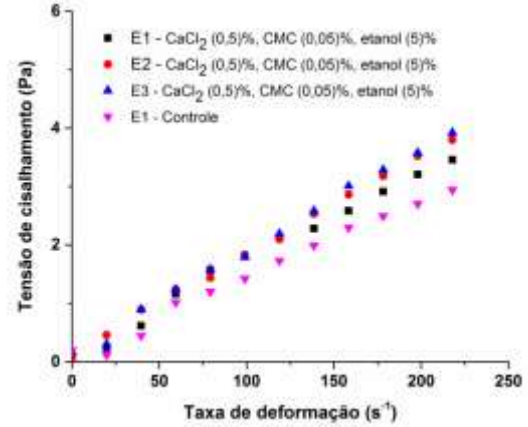


(a1)

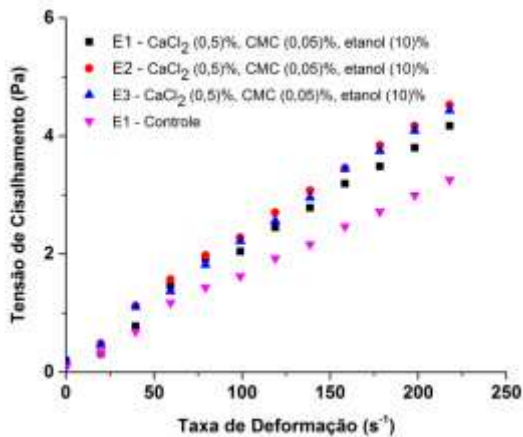
(a2)



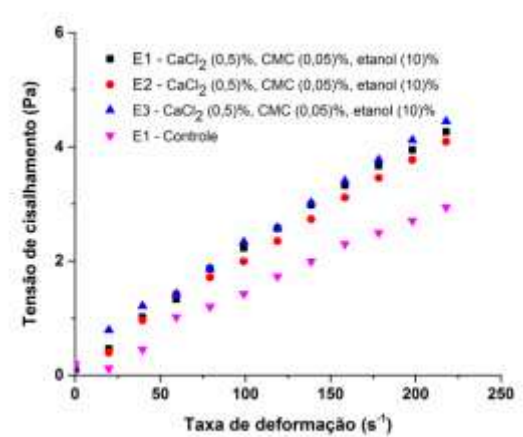
(b1)



(b2)



(c1)



(c2)

Tabela 7 - Parâmetros reológicos obtidos pelo ajuste ao modelo lei da potência dos concentrados e cristais de gelo separados no estágio 1 para amostras constituídas de diferentes concentrações de etanol, CaCl<sub>2</sub> e CMC e fixando as concentrações dos demais aditivos no ponto central do DCCR.

<b>Parâmetros reológicos (lei da potência)</b>						
	<b>Concentrado</b>			<b>Cristal de Gelo</b>		
	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
Etanol 0%	0,025	0,910	0,992	0,015	0,992	0,987
Etanol 5%	0,044	0,831	0,992	0,030	0,882	0,991
Etanol 10%	0,047	0,876	0,991	0,042	0,857	0,998
CaCl <sub>2</sub> 0%	0,022	0,936	0,992	0,023	0,944	0,995
CaCl <sub>2</sub> 0,5%	0,044	0,831	0,992	0,030	0,882	0,991
CaCl <sub>2</sub> 1,0%	0,038	0,880	0,996	0,031	0,915	0,995
CMC 0%	0,029	0,917	0,994	0,046	0,830	0,996
CMC 0,05%	0,044	0,831	0,992	0,030	0,882	0,991
CMC 0,1%	0,036	0,894	0,996	0,036	0,875	0,998
Controle	0,032	0,860	0,997	0,018	0,943	0,986

O nível de adição de etanol, CaCl<sub>2</sub> e CMC nas amostras de SLB influenciou o índice de consistência. Valores mais elevados foram observados com o aumento no nível de incorporação de aditivos das formulações (Tabela 7). O índice de consistência (*k*) é um parâmetro informativo das propriedades viscosas das amostras de SLB após o Estágio (E1) do processo de concentração por congelamento; valores de *k* mais elevados indicam que o SLB concentrado é mais viscoso. A presença de aditivos levou a um aumento na viscosidade das frações do concentrado e cristal de gelo. As propriedades reológicas das dispersões de SLB com aditivos estão associadas à capacidade de absorção com maior ou menor capacidade de retenção de água que são favoráveis ou desfavoráveis à formação de gelo como indicado nas curvas que descrevem os históricos de congelamento.

Os índices de comportamento de fluxo (*n*) em todos os tratamentos foram inferiores a 1 (entre 0,831 e 0,936 para a fração de concentrado, e 0,830 e 0,992 para a fração de cristal de gelo), indicando um comportamento pseudoplástico com amostra de SLB com aditivos apresentando comportamento bem próximo ao de fluido Newtoniano (*n* = 0,992) (Tabela 7). O aumento das concentrações de etanol, CaCl<sub>2</sub> e CMC no SLB faz com que este se desvie do comportamento newtoniano e, portanto, tenha uma pseudoplasticidade maior após o processo de concentração por congelamento.

O índice de consistência e o índice de comportamento de fluxo apresentaram variações opostas em relação ao nível de concentração de aditivos. Observa-se aumento dos valores de *k* à medida que o aumento da concentração de aditivos no SLB aumenta. Em contrapartida, os

valores de  $n$  diminuíram à medida que essas concentrações aumentavam (Tabela 7). Altos valores  $k$  e baixos valores  $n$  preveem que o SLB é mais viscoso.

#### 4.4 Discussão

Após as análises estatísticas do processo de concentração por congelamento do soro, pode-se concluir que, na maior parte dos casos, quanto maior a concentração de etanol (%) e  $\text{CaCl}_2$  (%) mais efetivo e linear o comportamento das variáveis respostas, ou seja, os tratamentos que tem como característica as maiores concentrações desses aditivos tiveram resultados melhores. Essa característica pode ser explicada pelas interações entre os dois aditivos e o SLB. O etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) é um composto orgânico polar, solúvel em água e assim, ele realiza ligações de hidrogênio com as moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , auxiliando na separação da água dos demais componentes do soro durante o processo de concentração (MARTINS; LOPES; DE ANDRADE, 2013).

Por outro lado, com a adição do  $\text{CaCl}_2$  nos sistemas, parte das moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  se ligam fortemente com o sal, contribuindo para o aumento de interações hidrofóbicas, auxiliando nas interações proteína-proteína (BOHÓRQUEZ, 2014; MOTTA, 2002).

A CMC teve pouca interferência no processo de concentração e esse fato pode ser justificado pela agitação no processo de concentração por congelamento. Nos testes realizados, foi observado quando a agitação foi utilizada também foram obtidas melhores concentrações do soro puro, ou seja, ocorreu uma menor concentração de soluto na fração cristal de gelo. No entanto, a CMC quando adicionado ao soro, o mesmo interage com a proteína do soro e acontece a precipitação (BOLDRINI; TOMAL; CUNHA, 2009; CAPITANI, 2004). Contudo, quando o sistema era submetido à agitação, as moléculas de proteína tenderam a incorporar ao cristal.

Analisando por Estágio, foi observado que no Estágio 1 tanto o cristal quanto o concentrado tiveram os valores de  $F$  e  $p$ -valor próximos. No Estágio 2 houve um comportamento diferente do Estágio 1. Observou que nas variações (%) de densidade e teor de sólidos solúveis totais, o valor de  $F_{\text{conc.}} > F_{\text{cristal}}$ , essa característica foi mais evidente na variável resposta teor de proteína, onde,  $F_{\text{conc.}} \approx 99,811$  e  $F_{\text{cristal}} \approx 52,645$ . Neste caso, o concentrado teve uma dispersão menor dos dados, podendo afirmar que a adição do etanol e  $\text{CaCl}_2$  favoreceram o concentrado. O Estágio 3 foi o mais efetivo de todos os estágios, as variações de densidade e de lactose foram maiores no concentrado, enquanto o teor de sólidos solúveis totais apresentou menor variação percentual e a variação de proteína no concentrado

teve um percentual maior no concentrado do que no cristal de gelo. Os resultados indicaram que o número de estágios e a concentração de etanol influenciaram a efetividade dos processos e o maior número de estágios e maiores as concentrações de etanol resultaram maior efetividade do processo de concentração por congelamento. Para o  $\text{CaCl}_2$  ser significativo no processo, ele deve ter uma concentração acima de 0,1M. Assim, analisando cada tratamento realizado, como demonstrado na Tabela 1, e as curvas de ponto ótimo apresentadas, foi possível concluir que o melhor resultado foi obtido com o Tratamento 10 constituído de 10% de Etanol; 0,5% de  $\text{CaCl}_2$  e 0,05 % de CMC.

## 5 CONCLUSÕES

Os aditivos (etanol,  $\text{CaCl}_2$  e CMC) influenciaram de forma significativa e linear a densidade do concentrado de SLB após o estágio 1 do processo de concentração. Apenas a adição de etanol influenciou de forma linear e positiva a variação da concentração de lactose no concentrado 1 e os demais aditivos,  $\text{CaCl}_2$  e CMC não produziram efeito significativo sobre este parâmetro. A adição de etanol também aumentou a variação do teor de sólidos solúveis totais e a adição de CMC influenciou de forma negativa na variação deste parâmetro.

Os aumentos das concentrações de etanol e  $\text{CaCl}_2$  são favoráveis à maior formação de gelo e soluções mais concentradas no concentrado 1. Considerando a adição de etanol e os três estágios, um fato destacado foi a redução da variação percentual das variáveis densidade, teor de lactose, teor de SST e teor de proteínas na fração de concentrado na sequência dos estágios 1, 2 e 3 testados nestes experimentos. Por outro lado, estas variações aumentaram na fração de cristal de gelo sendo as maiores variações observadas no estágio 3 do processo de concentração por congelamento.

Com os históricos de resfriamento das amostras de SLB foi possível observar os efeitos individuais dos aditivos na redução da temperatura de início de congelamento e velocidade de formação dos cristais de gelo aderidos à serpentina. Neste contexto, o efeito é notável e proporcional ao aumento da concentração de etanol e também, com pouca intensidade, no aumento da concentração de  $\text{CaCl}_2$ .

A tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação aumenta com a adição de etanol o que indica o aumento da viscosidade aparente das amostras de SLB após o estágio (E1) do processo de concentração por congelamento. Este aumento é mais evidente nas amostras das frações de cristal de gelo. O nível de adição de etanol,  $\text{CaCl}_2$  e CMC nas amostras de SLB influenciou o índice de consistência ( $k$ ).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 679–685, 2009.

AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 92–102, 2007.

AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 3, p. 334–341, 2009.

AIDER, M.; OUNIS, W. BEN. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: Gravitational vs. microwave-assisted. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 195–202, 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2a Edição, Editora da UNICAMP, 1996

BOLDRINI, F. M.; TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. T. Extração de Proteínas do Soro de Leite por Coacervação com Polissacarídeo e Sua Utilização em Formulação Cosmética. v. 10, n. 1, p. 43–48, 2009.

BOZA, Y.; GOMES, R. A. R.; BLUMER, P. Lactose: alternativa para o uso do soro e para diversificação do setor de lácteos. **Caderno de tecnologia de laticínios**, p. 62–66, [s.d.].

BURDO, O. G.; KOVALENKO, E. A.; KHARENKO, D. A. Intensification of the processes of low-temperature separation of food solutions. **Applied Thermal Engineering**, v. 28, n. 4, p. 311–316, 2008a.

BURDO, O. G.; KOVALENKO, E. A.; KHARENKO, D. A. Intensification of the processes of low-temperature separation of food solutions. **Applied Thermal Engineering**, v. 28, n. 4, p. 311–316, 2008b.

CAPITANI, C. D. **Interação de proteínas do soro de leite com polissacarídeo: fracionamento e estudo das propriedades funcionais dos complexos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CAPITANI, C. D. et al. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1123–1128, 2005.

CARRILHO, L. H. Benefícios da utilização da proteína do soro de leite whey protein. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 7, n. 40, p. 195–203, 2007.

COSTA, F. F.; RESENDE, J. V.; ABREU, L. R.; GOFF, H. D. (2008). Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science**, 91(6):2165-2174.

COULSON, J. M. et al. **Chemical Engineering Vol.2: Particle Technology and Separation Processes**. Fifty Edt ed. [s.l.] Elsevier Butterworth-Heinemann, 2002. v. 2

FOX, P. F. et al. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Second Edi ed. Cham: Springer International Publishing, 2015.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport Processes and Unit Operations** Prentice-Hall International, 1993. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=i9-TQgAACAAJ&pgis=1>>

GUDE, V. G. Desalination and sustainability - An appraisal and current perspective. **Water Research**, v. 89, p. 87–106, 2016.

HARAGUCHI, F. K.; DE ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: Composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

HERNÁNDEZ, E. et al. Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 130–136, 2010.

HIMAWAN, C. et al. Dynamic modeling and simulation of eutectic freeze crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v. 237–239, n. 1- 4 III, p. 2257–2263, 2002.

JOHNSON, J. M.; CONFORTI, F. D. LACTOSE. In: CABALLERO, B. B. T.-E. OF F. S. AND N. (SECOND E. (Ed.). . Oxford: Academic Press, 2003. p. 3472–3476.

KHURI, A. I. e CORNELL, J. A. Response Surfaces - Designs and Analyses. 2nd Edition,

Marcel Dekker, Inc., 1996.

MASSON, M. L.; FONTOURA, P. S. G.; SOCCOL, C. R., VASSAO, E. C.; VENTURA, I.; PINHEIRO, L. I.; MATOS, M. E.; Tecnologia do Café. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Vol 3, nº1, 1985.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit Operations of Chemical Engineering**, 1993. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=sacQgAACAAJ&pgis=1>>

MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 3

MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (EDS.). **Advanced dairy chemistry - Volume 1A - Proteins: Basic aspects**. 4th. ed. Boston, MA: Springer US, 2013.

MIYAWAKI, O. et al. Progressive freeze-concentration of apple juice and its application to produce a new type apple wine. **Journal of Food Engineering**, v. 171, p. 153–158, fev. 2016.

NÝVLT, J.; ULRICH, J. **Admixtures in Crystallization**. First ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1995.

NUNES, T. K. ; AMARANTE, A. C. C., Estudo da crioc concentração de suco de laranja. 61º Reunião Anual da SBPC, Curitiba, Paraná, 2008.

OLIVEIRA, D. F. DE; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: um subproduto valioso. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 385, p. 64–71, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. P. et al. **Tecnologia dos Alimentos - Alimentos de origem animal**. [s.l: s.n.].

SÁNCHEZ, J. et al. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 644–651, out. 2010.

SÁNCHEZ, J. et al. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant : Process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 147–155, 2011.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004.



SILVA, J. M. F. **Aperfeiçoamento tecnológico do processo de crioconcentração: modelagem e simulação.** [s.l.] Unicamp, 2003.

SIQUEIRA, K. B. O mercado consumidor de leite e derivados. **Embrapa**, v. 120, p. 17, 2019.

ZAMBRANO, A. et al. Freeze desalination by the integration of falling film and block freeze-concentration techniques. **Desalination**, v. 436, n. February, p. 56–62, jun. 2018.

ZHANG, Z.; HARTEL, R. W. A multilayer freezer for freeze concentration of liquid milk. **Journal of Food Engineering**, v. 29, n. 1, p. 23–38, 1996.

SILVA, F. T. Queijo Minas Frescal. **Embrapa Informação Tecnológica.** Brasília – DF, 2005.