

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

VANESSA LEIFELD

TRATAMENTOS CLÁSSICOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS APLICADOS A  
SORO DE LEITE VISANDO DECRÉSCIMO DO POTENCIAL CONTAMINANTE DO  
EFLUENTE

PONTA GROSSA  
2014

VANESSA LEIFELD

TRATAMENTOS CLÁSSICOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS APLICADOS A  
SORO DE LEITE VISANDO DECRÉSCIMO DO POTENCIAL CONTAMINANTE DO  
EFLUENTE

Dissertação apresentada para a obtenção do título  
de Mestre em Química Aplicada no Programa de  
Pós-Graduação em Química Aplicada da  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Mariza Boscacci Marques

PONTA GROSSA  
2014

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Leifeld, Vanessa

L527      Tratamentos clássicos de precipitação de proteínas aplicados a soro de leite visando decréscimo do potencial contaminante do efluente/ Vanessa Leifeld. Ponta Grossa, 2014.  
90f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profª Drª Mariza Boscacci Marques.

1.Soro de leite. 2.Proteínas. 3.DQO. 4.Poluento. I.Marques, Mariza Boscacci. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Química Aplicada. III. T.

CDD: 628.16

*Aos meus pais, Rui e Nadir  
Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado em todos os dias da minha vida.

À Profª Dra. Mariza Boscacci Marques, por passar muito mais que conhecimentos científicos, ter sido companheira, amiga, preocupada com meu bem-estar acima de tudo e pelo carinho nestes dois anos de mestrado.

Aos meus pais, Rui e Nadir, que me apoiaram nesta jornada e me estimularam nos momentos de fraqueza.

Às minhas irmãs, Fabiana e Michelle, e sobrinhos, André Marcos e Mariely, que sempre me incentivaram e entenderam minhas ausências.

Aos meus amigos de longa data que, apesar da distância, transmitiam palavras de conforto e otimismo.

Aos amigos do mestrado, Sheila e Robson, pelos momentos de estudo, ajuda em análises e também de descontração. Sem vocês, meu mestrado não seria o mesmo!

Ao Jorge, pela paciência, incentivo, cuidado e amor dedicados a mim nestes dois anos.

Aos técnicos de laboratório do DEQUIM e C-LABMU, pela prontidão em me auxiliar com reagentes, equipamentos e experimentos.

À Profª Dra. Christiane Philippini Ferreira Borges e ao Prof. Dr. Jorge Iulek, por disponibilizarem seus laboratórios para execução de análises.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada pelos ensinamentos e pela oportunidade.

Ao Prof. MSc. Guilherme de Almeida Souza Tedrus, do Departamento de Engenharia de Alimentos, que desde a graduação me ajudou muito, e no mestrado possibilitou o andamento do projeto.

Ao Sr. Herberto Schuck, pelo fornecimento de parte da matéria-prima do estudo.

A CAPES pela bolsa concedida.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

(Theodore Roosevelt)

## RESUMO

Soro de leite é o líquido remanescente da precipitação (ácida ou enzimática), remoção da caseína e gordura do leite durante a fabricação de queijos, considerado um subproduto dos laticínios, devido sua composição em lactose, proteínas e gordura. Estima-se que de 100 kg de leite originais utilizados como matéria-prima para os queijos, são gerados 80-90 kg de soro. Tratamentos convencionais de efluentes não são suficientes para diminuir seu potencial poluidor, sendo pertinente a investigação de métodos alternativos para redução da carga orgânica do rejeito. Portanto, este trabalho consistiu da aplicação de técnicas de precipitação de proteínas visando a diminuição do potencial contaminante do soro de leite. Inicialmente, diferentes tipos de soro de queijo foram caracterizados quanto a pH, acidez titulável, sólidos totais, umidade, cinzas, densidade, viscosidade relativa, gordura e lactose. Soros de queijo Colonial Fresco, Reblochon, Prato e Minas Frescal foram avaliados e, comparando-se com dados da literatura, observou-se que as amostras não diferiram dos valores relatados para estes parâmetros. Avaliações ambientais também foram realizadas nas amostras, em termos de DQO, DBO, nitrogênio total, fósforo total e espécies metálicas tóxicas (Pb e Cd). DQO, DBO, nitrogênio e Pb foram muito superiores quando comparados com outros soros de leite, corroborando que a variação da qualidade da matéria prima (o leite) e o tipo de queijo produzido interferem no potencial poluente do rejeito. O soro de leite demonstrou ser uma amostra complexa pois, ao avaliar-se seu teor de proteínas, vários dos seus componentes levaram a interferência em métodos tradicionais de dosagem, como Biureto, Lowry e Bradford. Conhecendo-se a concentração média de proteínas das amostras, optou-se pela amostra de soro de queijo Reblochon pasteurizado (maior teor proteico, cerca de  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) para realização de ensaios de separação de proteínas por coacervação com CMC, sistema ATPS (PEG +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), precipitação com acetona (9:1), TCA 10% e sulfato de amônio (saturações de 10, 15, 20 e 30%). Acompanhou-se a eficiência das precipitações em termos de concentração e/ou separação das proteínas, diminuição do potencial poluente (estimada pela DQO) e seu efeito sobre a lactose. Houve relação de proporcionalidade de DQO e lactose apenas para os tratamentos com CMC e PEG. Precipitações com acetona e TCA não foram bons tratamentos, pois apresentaram efeito desnaturante sobre as proteínas do soro, não oferecendo vantagens operacionais ou econômicas quando se supõe aplicação em larga escala. Os tratamentos com CMC e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  atingiram os melhores resultados, tanto na capacidade de seletivamente precipitar as diferentes frações proteicas do soro, como diminuíram a DQO do efluente. Portanto, a coacervação e a precipitação por saturação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  são aplicáveis ao tratamento do soro de leite quando há interesse em valorizar o resíduo (pela reutilização das frações proteicas obtidas), com a redução concomitante do potencial contaminante.

Palavras-chave: Soro de leite, proteínas, DQO, poluente.

## ABSTRACT

Whey is the precipitation (acid or enzymatic) remaining liquid by removal of casein and milk fat during cheese making, considered a byproduct of dairy products, due to its composition of lactose, protein and fat. From 100 kg of milk used as original material for cheeses, are generated 80-90 kg of whey. Conventional wastewater treatments are not sufficient to reduce their pollution potential, and is relevant research of alternative methods to reduce the organic load of waste. Therefore, this study consisted by application of techniques of protein precipitation aiming to reduce the contaminating potential of whey. At first, different types of cheese whey were analyzed for pH, titratable acidity, total solids, moisture, ash, density, relative viscosity, fat and lactose. Colonial Fresh, Reblochon, Plate and Minas Frescal cheese whey were evaluated, compared with literature data and it was observed that samples did not differ from reported values for these parameters. Environmental assessments were also performed on samples in terms of COD, BOD, total nitrogen, total phosphorus and toxic metal species (Cd and Pb). COD, BOD, nitrogen and Pb were much higher when compared with other milk serum, confirming that variation in the quality of the raw material (milk) and type of cheese produced interfere with the pollution potential of waste. Whey showed to be a complex sample; when assessing their protein content, several of its components have led to interference in traditional dosing methods such as Biuret, Bradford and Lowry. Knowing the average protein concentration of samples, we opted for whey sample from Reblochon cheese pasteurized (higher protein, about  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for test protein separation by coacervation with CMC, ATPS system (PEG +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), acetone precipitation (9:1), 10% TCA and ammonium sulphate (saturation 10, 15, 20 and 30%). The efficiency of precipitation was monitored in terms of concentration and/or separation of proteins, decreased pollution potential (estimated by COD) and its effect on lactose. There was a proportional relationship of COD and lactose only for treatments with CMC and PEG. Precipitation with acetone and TCA were not good treatments because they showed denaturing effect on whey proteins, providing no operational or economic advantages when it assumes large-scale application. Treatment with CMC and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  achieved better results, both in the ability to selectively precipitate whey protein fractions such as the COD decreased of effluent. Therefore, coacervation and precipitation by saturation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  applies to processing of whey when there is an interest in enhancing the residue (by reusing obtained protein fractions), with concomitant reduction potential contaminant.

Keywords: Whey, protein, COD, pollutant.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Processo de coagulação enzimática. (A) Micelas com revestimento de $\kappa$ -caseína intacta; (B) remoção parcial da $\kappa$ -caseína pela renina; (C) remoção final da $\kappa$ -caseína e início da reação de agregação micelar. ....	17
FIGURA 2 - Fluxograma básico da fabricação de queijos.....	18
FIGURA 3 – Representação da estrutura tridimensional dimérica da $\beta$ -lactoglobulina (nativa), gerada pelo programa PyMol com o arquivo 2Q2M.pdb do banco de dados do PDB. A cadeia está colorida com gradiente espectral de cor da porção N-terminal a C-terminal .....	23
FIGURA 4 - Representação da estrutura tridimensional da $\alpha$ -lactoalbumina, gerada pelo programa PyMol com o arquivo 1HFZ.pdb do banco de dados do PDB. A cadeia está colorida com gradiente espectral de cor da porção N-terminal a C-terminal. A esfera cinza corresponde a um ligante $\text{Ca}^{2+}$ .....	24
FIGURA 5 - Representação da estrutura tridimensional da BSA, gerada pelo programa PyMol com o arquivo 4F5S.pdb do banco de dados do PDB. A cadeia está colorida com gradiente espectral de cor da porção N-terminal a C-terminal.....	25
FIGURA 6 - Molécula de lactose.....	26
FIGURA 7 - Composição média dos macromelementos Ca, Mg, K e Na ( $\text{mg L}^{-1}$ ) nos diferentes tipos de soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. ....	60
FIGURA 8 - Composição média das espécies metálicas tóxicas (Cd e Pb, em $\text{mg L}^{-1}$ ) nos diferentes tipos de soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. Gráfico em zoom, desconsiderando as barras de desvio padrão. ....	62
FIGURA 9 - Composição média de micrelementos (Fe, Zn e Cu, em $\text{mg L}^{-1}$ ) nos diferentes tipos de soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. Gráfico em zoom, desconsiderando as barras de desvio padrão.....	63
FIGURA 10- Comparação entre DBO, DQO ( $\text{gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ), nitrogênio e fósforo ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) totais em soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. Gráfico em zoom, desconsiderando as barras de desvio padrão. ....	66
FIGURA 11 - Concentração média de proteína total ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) em soro de queijo obtida pelo método de Biureto, Kjeldahl, Lowry e Bradford. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru);	

RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. .....	68
FIGURA 12 - Eletroforese SDS-PAGE em gel 12% de poliacrilamida, amostra de soro de queijo Reblochon pasteurizado, obtida por centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos. Diluições (da esquerda para a direita): 0, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45x. Marcador de massa molecular aplicado na primeira raia, porém não identificado. ....	70
FIGURA 13 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das três frações obtidas na precipitação com CMC 0,3% (p/p).....	71
FIGURA 14 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das duas frações obtidas na separação com 14% PEG 3350/14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (p/p).....	73
FIGURA 15 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das duas frações obtidas na separação com TCA 10%. ....	74
FIGURA 16 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das duas frações obtidas na separação com acetona 9:1. ....	74
FIGURA 17 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das frações obtidas pela precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de 100 mL de amostra. A: Soro total; B: 10% de saturação de sal; C: 15%; D: 20%; E: 30%; F: sobrenadante. ....	75
FIGURA 18 - DQO ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ ) de soro total, das frações de proteína e sobrenadante dos métodos de separação das proteínas do soro de leite. st: soro total; Beta: $\beta$ -CMC; Alfa: $\alpha$ -CMC; R: remanescente CMC; PEG: $\beta$ -PEG; Sal: $\alpha$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; Ac: precipitado acetona; SBa: sobrenadante acetona; TCA: precipitado TCA; SBt: sobrenadante TCA; 10 a 30%: precipitado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturação 10 a 30%; SBs: sobrenadante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . ....	76
FIGURA 19 - Eletroforese em gel Tris-tricina 16% das diversas frações obtidas nos tratamentos de precipitação de proteínas. Dois géis obtidos foram unidos para melhor visualização e comparação dos métodos. Gel A - 1: marcador de massa molecular; 2: fração $\alpha$ -CMC; 3: fração $\beta$ -CMC; 4: remanescente CMC; 5: $\beta$ -PEG; 6: $\alpha$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 7: precipitado acetona; 8: precipitado TCA; 9: soro integral. Gel B - 10: Marcador de massa molecular; 11: precipitado 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 12: precipitado 15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 13: precipitado 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 14: precipitado 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	78

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição do leite e dos soros doce e ácido. ....	20
TABELA 2 - Reagentes, fórmulas moleculares, pureza e fornecedores. ....	33
TABELA 3 - Equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais. ....	39
TABELA 4 - Composição físico-química de diferentes tipos de soro de leite. ....	57
TABELA 5 - Teores de DQO, DBO, Nitrogênio total e Fósforo total em diferentes tipos de soro de leite.....	64

## LISTA DE SIGLAS

$\alpha$ -La	$\alpha$ -Lactoalbumina
$\beta$ -Lg	$\beta$ -Lactoglobulina
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATPS	Aqueous Two-Phase System
BSA	Albumina do Soro Bovino
CMC	Carboximetilcelulose
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPS	Concentrado Proteico de Soro de leite
Cys	Cisteína
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de esgoto
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IPS	Isolado Proteico de Soro de leite
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Met	Metionina
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
pI	Ponto Isoelétrico
PP	Polipropileno
Res	Resíduos de aminoácido
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
WPC	Whey Protein Concentrate
WPI	Whey Protein Isolate

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	14
1.1	JUSTIFICATIVA.....	14
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.2.1	Fabricação de queijos e geração de soro de leite.....	15
1.2.2	Composição do soro de leite .....	19
1.2.3	Soro de leite e meio ambiente .....	20
1.2.4	Propriedades do soro de leite.....	22
1.2.5	Fatores antinutricionais .....	27
1.2.6	Processos de fracionamento de nutrientes do soro.....	27
1.2.7	Produtos obtidos a partir do fracionamento dos nutrientes do soro de leite.....	30
1.3	DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA.....	31
2.	OBJETIVOS .....	32
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1	SORO DE LEITE.....	33
3.2	REAGENTES ANALÍTICOS.....	33
3.2.1	Reagentes utilizados para análises de proteína.....	37
3.2.2	Reagentes utilizados para análise de lactose .....	37
3.2.3	Reagentes utilizados para análise de DQO.....	37
3.2.4	Reagentes utilizados para análise de DBO .....	37
3.2.5	Reagentes utilizados para determinação de fósforo .....	38
3.2.6	Reagentes utilizados para eletroforese .....	38
3.3	EQUIPAMENTOS.....	39
3.4	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	40
3.4.1	Determinação de pH.....	40
3.4.2	Determinação de Acidez Titulável .....	40
3.4.3	Determinação de Densidade.....	41
3.4.4	Determinação de Viscosidade Relativa.....	42
3.4.5	Determinação de Umidade, Sólidos Totais e Cinzas.....	42
3.4.6	Determinação de Proteínas Totais.....	43
3.4.7	Determinação de Lactose .....	46
3.4.8	Determinação de Gordura Total.....	47

3.4.9	Determinação de Metais.....	47
3.4.9.1	Determinação de metais por absorção atômica com chama (Ca, Mg, Pb, Cd, Co, Mn, Zn, Cu, Fe e Cr) .....	47
3.4.9.2	Determinação de metais por fotometria de chama (Na e K) .....	49
3.4.10	Determinação de Demanda Química de Oxigênio .....	49
3.4.11	Determinação de Demanda Bioquímica de Oxigênio .....	50
3.4.12	Determinação de Fósforo Total.....	52
3.4.13	Precipitação de proteínas com Ácido Tricloroacético (TCA) .....	53
3.4.14	Concentração de proteínas com Acetona .....	53
3.4.15	Fracionamento de proteínas por Coacervação.....	53
3.4.16	Fracionamento de proteínas em Sistema Aquoso Bifásico .....	54
3.4.17	Precipitação fracionada com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	54
3.4.18	Eletroforese .....	55
3.4.19	Análise dos dados.....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SORO DE LEITE.....	57
4.2	MACRO, MICROELEMENTOS E ESPÉCIES METÁLICAS TÓXICAS .....	59
4.3	AVALIAÇÕES AMBIENTAIS DOS DIFERENTES TIPOS DE SORO DE LEITE .....	64
4.4	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	67
4.5	SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE .....	70
5.	CONCLUSÃO .....	79
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 JUSTIFICATIVA

O Brasil, apesar de não possuir forte cultura no consumo de queijos, tem apresentado um aumento significativo na demanda deste produto, levando à intensificação na sua produção tanto por parte de grandes indústrias como, principalmente, de pequenos produtores, na produção artesanal (SEBRAE, 2008). Na fabricação de queijos ocorre a formação de um coproduto de grande relevância para os laticínios, o soro de leite.

O soro de leite é a porção aquosa que se separa do leite após a coagulação das caseínas em processos de produção de queijos (SMITHERS, 2008). Este subproduto contém a maior parte dos compostos hidrossolúveis, como proteínas, lactose, sais, vitaminas, e água contida na matéria-prima, além de representar 80 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos (MARSHALL, 2004).

Estima-se que metade da produção mundial de soro de leite não é tratada e é descartada como efluente. Historicamente, o descarte de soro em cursos d'água, rios, oceanos ou mesmo em sistemas de esgotos, tem contribuído para a contaminação de água devido aos elevados valores de Demandas Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO e DBO), e altas concentrações de lactose e proteínas (SISO, 1996; SMITHERS, 2008).

Se por um lado o tratamento de efluentes é dispendioso porém indispensável, por outro o soro de leite é rico em diversos nutrientes, tornando plausível e objetiva sua utilização direta, ou de seus componentes fracionados, em dietas enterais, suco, sorvetes, suplementos esportivos, alimentação para crianças, entre outros produtos (LIRA *et al.*, 2009). Há um grande interesse acadêmico no fracionamento e recuperação dos nutrientes do soro, principalmente em relação às proteínas, com o emprego de diferentes tecnologias de separação como cromatografia de troca iônica, membranas, produção de hidrolisados, etc; porém estas representam custo elevado e baixa eficiência, dado o grande volume de soro produzido pelas indústrias queijeiras e a pequena capacidade de processamento de tais processos (LUCENA *et al.*, 2007).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar diferentes tipos de soro de leite, visando a aplicação de métodos clássicos de separação de proteínas para estudo da influência deste processo na redução do potencial contaminante do soro de leite.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Fabricação de queijos e geração de soro de leite

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), nos dois primeiros trimestres do ano de 2013, indústrias de laticínios e cooperativas brasileiras comercializaram cerca de 11 bilhões de litros de leite, sendo que grande parte desta alíquota foi industrializada para fabricação, dentre outros produtos, de queijo. No ano de 2011, estima-se que a produção de queijos sob inspeção federal atingiu a marca de 812 mil toneladas, que foi praticamente toda consumida pelo mercado nacional (ABIQ, 2012).

Apesar de não ser observada forte cultura no consumo de queijos, houve no Brasil um aumento gradual na sua demanda. Ao nível nacional, o mercado de queijos apresentou um crescimento expressivo a partir de 1994, ano do Plano Real, quando ocorreu o aumento do poder de compra do consumidor de classes mais baixas (LAVINAS, 1998; SEBRAE, 2008). Dados mostram que o consumo *per capita* entre os anos 2000 e 2008 passou de 2,6 kg/habitante/ano para 3,4 kg/habitante/ano, e esta quantidade tende a aumentar a cada ano (LIMA FILHO; POMBO, 2010).

Os queijos, de acordo com a Portaria n° 146 de 7 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são definidos como produtos frescos (prontos para o consumo logo após a fabricação) ou maturados (que necessitam de trocas bioquímicas e físicas para adquirir determinadas características da variedade de queijo) obtidos por drenagem total ou parcial do soro do leite, leite reconstituído ou de soros lácteos após a coagulação do leite e de seus componentes, podendo ser adicionadas substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes durante sua elaboração. De um modo geral, para a fabricação de queijos são indispensáveis ingredientes como o leite, cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), fermento láctico, corante e coalho.

O leite é uma mistura química complexa que apresenta em sua composição glóbulos de gordura emulsificados e micelas de caseína dispersas em formas coloidais, além de proteínas, lactose, vitaminas, sais orgânicos e inorgânicos dissolvidos em solução, contendo em média 4,0% de gordura, 3,5% de proteínas, 4,8% de lactose e 0,7% de sais. Essa composição é variável em função da espécie, da raça, da nutrição, da saúde do animal produtor, do clima e das variações sazonais. Como consequência, os queijos também podem ter sua composição alterada pela interferência direta da qualidade do leite utilizado como matéria-prima na sua fabricação (ANTUNES, 2003; SCOTT, 1991). Para a seleção do leite a ser empregado na manufatura de queijos, deve ser levado em consideração seu estado de



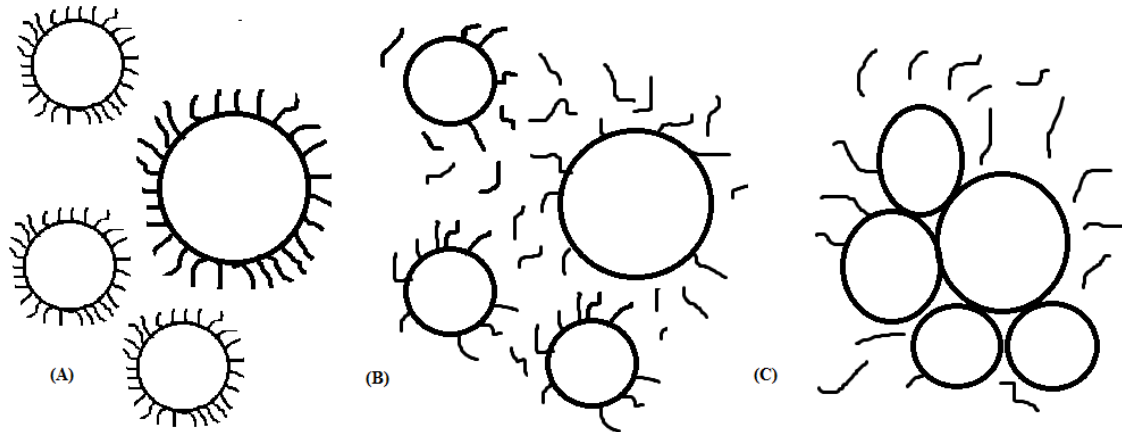
conservação, sua integridade e seu estado de higiene; processos de filtração e pasteurização no leite cru (que não passou por qualquer operação pós ordenha) são obrigatórios para a produção de queijos a fim de remover impurezas e destruir microrganismos patogênicos, sem que ocorram alterações significativas na estrutura física das proteínas e vitaminas, no equilíbrio químico e nas propriedades gerais do leite (BEHMER, 1977).

O fermento láctico é um cultivo puro de bactérias lácticas destinadas à utilização industrial na fabricação de produtos lácteos fermentados. A adição de fermento ao leite para a produção de queijos se faz necessária, uma vez que a pasteurização, utilizada para destruir os patógenos, acaba por destruir também as bactérias lácticas que constituem a flora natural do leite “*in natura*” (BEHMER, 1977). Este inóculo tem a capacidade de fermentar a lactose do leite, que é transformada em ácido láctico e, em alguns casos, fermenta também o citrato, via fermentação secundária, produzindo compostos aromáticos diversos como acetaldeído, diacetil e acetoína, conferindo características sensoriais de sabor, aroma e textura próprias dos queijos. Para cada tipo de queijo que se deseja fabricar, existe um tipo de fermento específico, proveniente da associação de duas ou mais culturas lácticas (OLISZEWSKI *et al.*, 2006; SCOTT, 1991).

Para se obter a massa do queijo, as proteínas do leite são coaguladas por ação enzimática (utilizando coalho rico em enzimas proteolíticas de origem animal, entre elas a “renina”) para a maioria dos queijos, ou por adição de ácido a quente para queijos como ricota e requeijão cremoso. Em linhas gerais, a coagulação das proteínas de leite é obtida pela neutralização de cargas das proteínas até alcançar seu ponto isoelétrico.

A principal constituição proteica do leite é de fosfoproteínas denominadas caseínas, sendo suas micelas constituídas de quatro frações proteicas, a caseína  $\alpha_s$  1, caseína  $\alpha_s$  2,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína. A coagulação das micelas pela adição de coalho é dividida em uma fase enzimática e outra não enzimática. A primeira fase ocorre pela ação enzimática da renina sobre a ligação peptídica dos resíduos de Phe 105 e Met 106 da fração de  $\kappa$ -caseína, com a liberação de um composto solúvel denominado glicopeptídeo (porção hidrofílica, sequência peptídica 106 a 169). A segunda fase é caracterizada pela agregação da porção hidrofóbica (sequência peptídica 1 a 105) denominada paracaseína que, em presença de cálcio solúvel, dá origem a um coágulo brilhante, elástico e hidratado, formado pela união das frações internas da micela de caseína (caseína  $\alpha_s$  1, caseína  $\alpha_s$  2,  $\beta$ -caseína) com o cálcio, que é bivalente (SCOTT, 1991). A Figura 1 mostra como ocorre a coagulação enzimática ao nível microscópico.

FIGURA 1 - Processo de coagulação enzimática. (A) Micelas com revestimento de  $\kappa$ -caseína intacta; (B) remoção parcial da  $\kappa$ -caseína pela renina; (C) remoção final da  $\kappa$ -caseína e início da reação de agregação micelar.

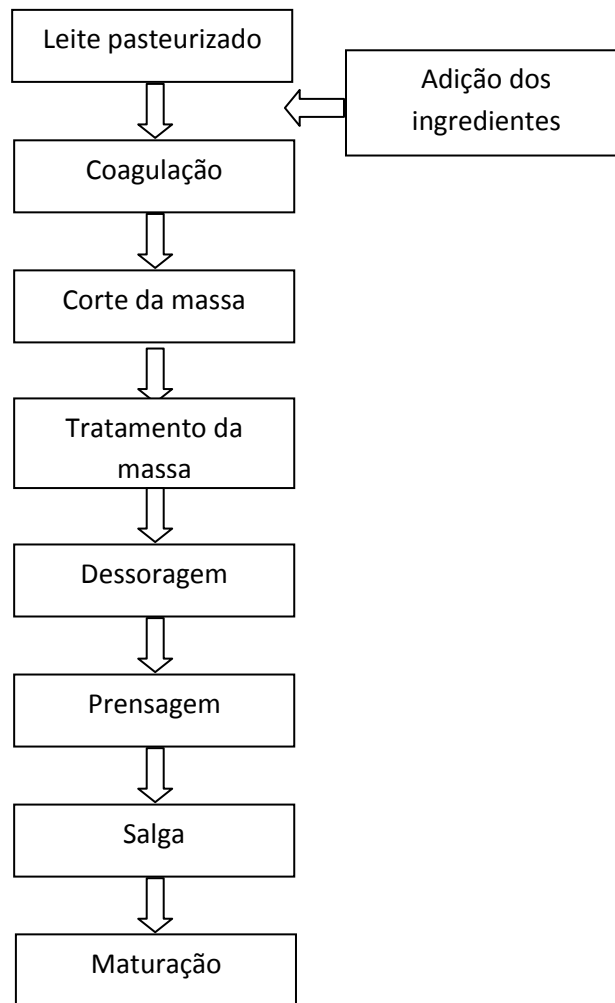


Já na coagulação do leite por adição de ácido, os mecanismos bioquímicos que ocorrem são diferentes dos observados na via enzimática. As proteínas, por possuírem múltiplas cargas ao longo de sua cadeia, tendem, em presença de um único tipo de carga, a apresentar uma estrutura aberta, devido à repulsão existente entre os sítios de mesma carga. Se o pH do leite se aproxima do ponto isoelétrico da caseína ( $pI = 4,6$ ) por adição de ácido, as cargas elétricas da caseína são neutralizadas e igualadas, e a força de repulsão, proveniente do excesso de cargas negativas existentes na caseína a um pH próximo da neutralidade, deixa de ser exercida, permitindo que as partículas coloidais unam-se, formando o coágulo (SCOTT, 1991).

O  $\text{CaCl}_2$  é utilizado na fabricação de queijos para suprir uma possível deficiência de cálcio solúvel no leite causada pelo processo de pasteurização, uma vez que é essencial à formação do coágulo. Outro ingrediente que algumas vezes é adicionado à massa de queijo é o corante, que fornece a coloração desejada para determinadas variedades de queijo (BEHMER, 1977).

Avaliando as questões físico-químicas, microbiológicas e bioquímicas da manufatura de queijos, percebe-se que a diferenciação entre eles será resultante da combinação de fatores como tipo e composição do leite utilizado na produção, tipo de coagulação, tipo de culturas lácteas, condições do tratamento da massa e tempo de maturação (BEHMER, 1977). No entanto, a fabricação de queijos envolve uma sequência de operações que são comuns às variedades e está representada pela Figura 2.

FIGURA 2 - Fluxograma básico da fabricação de queijos.



A partir do leite pasteurizado adicionado dos ingredientes já descritos, o primeiro processo que irá ocorrer é a coagulação, devido à adição do coalho. A seguir, é realizado o corte da massa, que provoca a liberação da porção aquosa, de forma que o teor de umidade da massa seja padronizado e uniforme. A fim de intensificar a redução de umidade bem como a acidificação e elasticidade da massa, esta é submetida à agitação lenta sob aquecimento, pois a maior temperatura favorece a desidratação dos grãos formados. Em seguida, é realizada a dessoragem, que consiste na retirada da porção aquosa desprendida da massa nas etapas anteriores, por método gravimétrico (BEHMER, 1977; SCOTT, 1991). O fluido retirado é mais conhecido como soro de leite, ou soro de queijo, pois contém proteínas específicas do leite - as proteínas do soro (ANTUNES, 2003).

As etapas finais do fluxograma da produção do queijo são a prensagem, a salga e a maturação. A prensagem tem a função de retirar a umidade remanescente das outras etapas,

através da compactação dos grãos da massa com a aplicação de força. A salga, além de contribuir para o sabor salgado dos queijos, diminui a atividade de água e auxilia na formação da casca (para alguns tipos de queijo). Por fim, determinados queijos necessitam de maturação, na qual são mantidas temperatura e umidade relativa em câmaras controladas por um tempo mínimo necessário para a obtenção das características desejadas, contribuindo no desenvolvimento de sabor, aroma, textura e formação de olhaduras (SCOTT, 1991).

O rendimento da fabricação de queijos é cerca de 10-15% do volume de leite total utilizado, isto significa que a maior parte do volume de leite empregado para se produzir queijos é convertido ao produto secundário do processo, o soro de leite (MIZUBUTI, 1994; SPACHOS; STAMATIS, 2011), que é considerado um dos resíduos mais poluentes (RAJESHWARI *et al.*, 2000). Este subproduto nem sempre é reutilizado ou passa por algum tipo de tratamento nas queijarias, e quando é reutilizado, nem todo o volume produzido é consumido. No passado, este volume era destinado à aplicação direta no solo (para fertilização), liberado diretamente em corpos receptores sem qualquer tratamento prévio, liberado no sistema de esgoto ou destinado para alimentação animal (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; SISO, 1996). Atualmente, grandes indústrias produtoras já investem em sistemas de secagem do soro para obtenção de matéria-prima para alimentação animal ou também para os ramos alimentício e farmacêutico. Entretanto, esta prática não é comum, principalmente entre pequenos produtores (que representam a maior parcela), visto o elevado investimento necessário para implantação dos sistemas de secagem (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; FRIGON *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Composição do soro de leite

O soro de leite, subproduto da produção de queijo, apresenta relativa importância nos laticínios, devido aos grandes volumes produzidos e sua composição nutricional (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Possui como características principais a coloração amarela esverdeada, a capacidade de conter a maior parte da água e reter cerca de 55% dos sólidos encontrados no leite, entre eles proteínas, lactose, minerais (como cálcio, magnésio e fósforo) e vitaminas hidrossolúveis (principalmente vitaminas do complexo B) (MAWSON, 1994; SISO, 1996; YORGUN; BALCIOGLU; SAYGIN, 2008). As proteínas predominantemente encontradas no soro são as  $\beta$ -lactoglobulinas,  $\alpha$ -lactoalbuminas, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e lactoferrina (GAD *et al.*, 2011; MARSHALL, 2004; SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012), que correspondem a 20% do total de proteínas do leite (SMITHERS, 2008).

Na fabricação de queijos, existem duas variedades de soro de leite que podem ser produzidas de acordo com o método de coagulação do leite: os soros doce e ácido. O soro doce é derivado da precipitação da caseína pela renina (o coalho) e apresenta um pH entre 6,0-7,0. Já os soros ácidos são resultantes da fermentação parcial da lactose a ácido lático e como o próprio nome remete, apresentam pH inferior a 5,0, além de conterem teores de cinza e ácido lático maiores que os soros doces e menor concentração de proteínas (MAWSON, 1994; SISO, 1996).

A Tabela 1 indica a composição média de soros de leite comparando-se com a composição do leite.

TABELA 1 - Composição do leite e dos soros doce e ácido.

	Leite	Soro Doce	Soro Ácido
Sólidos Totais (%)	13,0	6,4	6,2
Proteína (%)	3,6	0,8	0,75
Gordura (%)	3,9	0,5	0,04
Lactose (%)	4,6	4,6	4,2
Cinza (%)	0,8	0,5	0,8
Ácido Lático (%)	-	0,05	0,4

Fonte: ANTUNES, 2003.

Por conter quantidades significativas de compostos orgânicos, como lactose e proteínas solúveis, o soro de leite constitui um subproduto altamente poluente quando liberado no ambiente sem algum tipo de tratamento (FRIGON *et al.*, 2009; YORGUN; BALCIOGLU; SAYGIN, 2008). Têm sido estudados vários meios de disposição ou utilização do soro, a fim de empregá-lo em usos diretos (sem processamento), na separação de seus componentes e na conversão dos mesmos a outros produtos (MAWSON, 1994).

### 1.2.3 Soro de leite e meio ambiente

O soro de leite se caracteriza por apresentar uma alta carga poluente; dados da literatura apontam valores de DQO que variam de 30-102 g L<sup>-1</sup> e DBO entre 27-60 g L<sup>-1</sup> (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; SISO, 1996; YORGUN; BALCIOGLU; SAYGIN, 2008). A maior fração desta carga orgânica é atribuída à lactose, e em menores proporções, às proteínas e gorduras presentes no rejeito (FRIGON *et al.*, 2009; GÜVEN; PERENDECI; TANYOLAÇ, 2008; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). O soro como efluente representa um poder poluente até 100 vezes maior que o esgoto doméstico que possui

DQO e DBO em torno de 0,6 e 0,3 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (VON SPERLING, 2005); a produção de 10.000 L de soro seria equivalente à poluição do esgoto de uma população de 5.000 habitantes (LIRA *et al.*, 2009).

Além da contribuição orgânica, o soro de leite apresenta altas concentrações de sais minerais, principalmente cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e sais de cálcio provenientes do processamento do queijo, conferindo uma contaminação inorgânica. Por essas características, o soro, se lançado em corpos d'água, pode causar um excesso de consumo de oxigênio das águas, levando à impermeabilização, eutrofização e à toxicidade dos corpos receptores (PAN *et al.*, 2011; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

A razão DBO/DQO pode ser considerada como indicativo da biodegradabilidade dos despejos; valores altos indicam que a fração biodegradável é elevada e valores baixos indicam que a fração inerte é elevada. Rejeitos biodegradáveis apresentam DBO<sub>5</sub>/DQO > 0,25 (BRAILE; CAVALCANTI, 1993). No caso do soro de leite, esta razão é maior que 0,5, ou seja, o substrato é passível de tratamento biológico (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). No entanto, o seu tratamento representa um sério problema, pois sistemas biológicos não apresentam capacidade suficiente para remoção da carga orgânica do soro (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; MADAENI; MANSOURPANAH, 2004).

Métodos físico-químicos e processos biológicos aeróbios podem ser utilizados para o tratamento deste tipo de efluente, mas requerem alto investimento por parte das queijarias, além de elevado gasto energético pelas instalações de tratamento aeróbio (SPACHOS; STAMATIS, 2011). Neste contexto, a biodigestão anaeróbia seria umas das opções viáveis na estabilização do efluente, além de gerar metano (CH<sub>4</sub>) que pode ser utilizado na própria indústria para produção de energia (RUIZ *et al.*, 1997). Nesse sistema, existe um delicado equilíbrio entre os processos primários (hidrólise e acidogênese) e a conversão dos produtos ácidos pelos microrganismos acetogênicos e a formação de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> pelos metanogênicos (LEITÃO *et al.*, 2006).

No entanto, a operação de processos anaeróbios pode ser prejudicada pela composição do soro de leite. Devido às altas concentrações de lactose, o rejeito tende a acidificar rapidamente, resultando em um pH baixo. Como o soro tem baixa capacidade de tamponamento, o baixo pH inibe a atividade dos microrganismos metanogênicos, comprometendo o sistema de tratamento (FRIGON *et al.*, 2009; PERNA *et al.*, 2013).

O destino final do soro de leite é, portanto, um grande desafio, pois é impossível lançá-lo ao meio ambiente sem causar sérios danos e, por outro lado, quando destinado a sistema de tratamento de efluentes, ocasiona vários problemas à operação dos processos. Com

as leis ambientais mais rigorosas e buscando-se uma solução econômica para o rejeito, maior atenção foi dada aos benefícios do soro como uma nova fonte de ingredientes alimentícios e produtos farmacêuticos (OSTOJIC *et al.*, 2005; SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012). Pesquisas vêm investigando a exploração em larga escala das proteínas do soro de leite individuais e seus derivados como produtos para aumento do teor nutricional, valor funcional e/ou biológico e, assim, aproveitar seu conteúdo em nutrientes, reduzindo o potencial impacto ambiental (CHATTERTON *et al.*, 2006).

#### 1.2.4 Propriedades do soro de leite

##### 1.2.4.1 Proteínas

As principais proteínas do soro de leite,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina do soro bovino e imunoglobulinas, pertencem à classe das proteínas alimentícias mais valiosas por suas propriedades nutricionais e funcionais únicas (BUND *et al.*, 2012; CARULLI *et al.*, 2011). A alta qualidade nutricional das proteínas é atribuída à presença de todos os aminoácidos essenciais (não sintetizados pelo organismo humano) e em alta quantidade comparado a fontes de proteína vegetal, como soja, milho e trigo (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; MARSHALL, 2004; RADE-KUKIC; SCHMITT; RAWEL, 2011). A funcionalidade das proteínas do soro é resultado da soma da funcionalidade das proteínas individuais (JARA; PILOSOFF, 2011); ou seja, as propriedades das proteínas do soro como um todo são resultantes da soma dos componentes individuais na forma de seus peptídeos (ELGAR *et al.*, 2000).

As proteínas do soro, quando utilizadas como ingredientes em alimentos, apresentam propriedades que contribuem para a estrutura dos mesmos, tais como a solubilidade em uma larga faixa de pH, capacidade de emulsificação, formação de espuma, gelatinização, desenvolvimento de viscosidade e retenção de água (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; OSTOJIC *et al.*, 2005; RADE-KUKIC; SCHMITT; RAWEL, 2011).

Uma característica importante das proteínas do soro para a nutrição humana é o fato de não sofrerem alterações conformacionais em presença dos ácidos estomacais; ao atingirem o intestino delgado, são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (PACHECO *et al.*, 2005). Diversos experimentos realizados em animais, humanos e células *in vitro*, utilizando proteína do soro de leite bovino, comprovaram que o nutriente deste produto é capaz de estimular a síntese de glutatona, que promove aumento na atividade imunomodulatória e no combate a infecções. A glutatona é um tripeptídeo composto de

glutamato, glicina e cisteína (MARQUES *et al.*, 2009), ubíqua no organismo humano e gera vários efeitos biológicos, como: estímulo à síntese de IGF-1 (*Insulin Growth Factor 1*), ativação do sistema imunológico, ação hipocolesterolêmica e antitumoral e retardo do envelhecimento em animais de laboratório (OSTOJIC *et al.*, 2005).

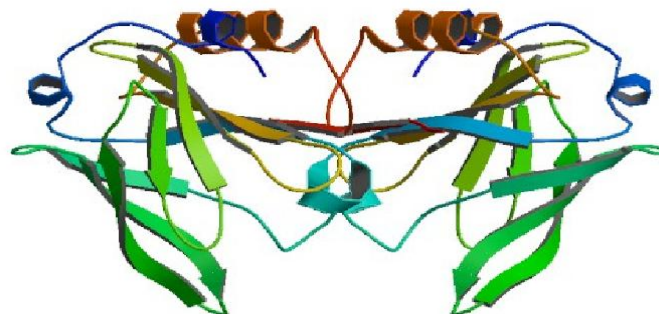
Para que as proteínas do soro de leite estimulem a síntese de glutatona e atuem como imunomoduladoras, elas devem permanecer com suas estruturas nativas intactas, preservando a atividade biológica original, que deve ser transferida aos peptídeos. O estímulo só acontece quando da liberação de peptídeos; portanto, para que as proteínas desempenhem funções biológicas no organismo, torna-se necessária a aplicação de processos de fracionamento das mesmas e biodisponibilização dos peptídeos ou de seus aminoácidos (MARQUES *et al.*, 2009; PACHECO *et al.*, 2005; SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012).

Algumas particularidades das proteínas predominantes no soro de leite são apresentadas a seguir:

-  $\beta$ -lactoglobulina

É a principal proteína do soro de leite, correspondendo a aproximadamente 50-60% da massa de proteínas totais. É tipicamente globular e sua molécula contém 162 resíduos de aminoácidos, totalizando um peso molecular de cerca de 18 kDa (RADE-KUKIC; SCHMITT; RAWEL, 2011). Sua estrutura apresenta 15% de  $\alpha$ -hélices, 43% de estrutura  $\beta$ -pregueada e o restante não contém uma organização específica, sendo sensíveis a pH e temperatura (ANTUNES, 2003).

FIGURA 3 – Representação da estrutura tridimensional dimérica da  $\beta$ -lactoglobulina (nativa), gerada pelo programa PyMol com o arquivo 2Q2M.pdb do banco de dados do PDB. A cadeia está colorida com gradiente espectral de cor da porção N-terminal a C-terminal .





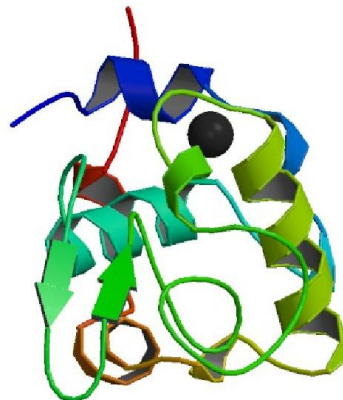
Fonte: [www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2Q2M](http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2Q2M). Acesso em: 18 fev. 2013.

Sua desnaturação depende do tempo de exposição à temperatura, e acima de 70°C ocorrem alterações significativas de conformação estrutural. Por ser uma proteína termolábil, o processamento térmico aumenta sua digestibilidade, tornando-a biologicamente disponível. Quando no estado nativo, é solúvel no pI, sendo capaz de ligar compostos hidrofóbicos e formar gel, espuma e emulsões (CHATTERTON *et al.*, 2006). Apresenta dois variantes, A e B; no variante B uma glicina é substituída e no variante A, um resíduo de ácido aspártico. A molécula de  $\beta$ -lactoglobulina possui duas pontes dissulfeto (res 66 e 160, res 106 e 119 ou 106 e 121) e uma sulfidril livre (SGARBIERI, 2005). É uma proteína que está presente somente no leite de ruminantes. (ANTUNES, 2003).

#### - $\alpha$ -lactoalbumina

Constitui de 13-20% das proteínas do soro de leite, é globular e sua molécula é formada por 123 resíduos de aminoácidos, com peso molecular próximo a 14 kDa. Sua estrutura apresenta 26% de  $\alpha$ -hélices, 14% de estrutura  $\beta$ -pregueada e 60% não contém uma organização específica (SGARBIERI, 2005). Contém quatro ligações dissulfeto (Cys 6-120, 28-111, 61-77, 73-91), não apresenta grupos fosfato, desnatura-se a 65,2°C, com alta capacidade de renaturação. Liga-se a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e outros íons metálicos. O leite de todos os mamíferos que contém lactose apresenta em sua composição a  $\alpha$ -lactoalbumina (ANTUNES, 2003; CHATTERTON *et al.*, 2006).

FIGURA 4 - Representação da estrutura tridimensional da  $\alpha$ -lactoalbumina, gerada pelo programa PyMol com o arquivo 1HFZ.pdb do banco de dados do PDB. A cadeia está colorida com gradiente espectral de cor da porção N-terminal a C-terminal. A esfera cinza corresponde a um ligante  $\text{Ca}^{2+}$ .

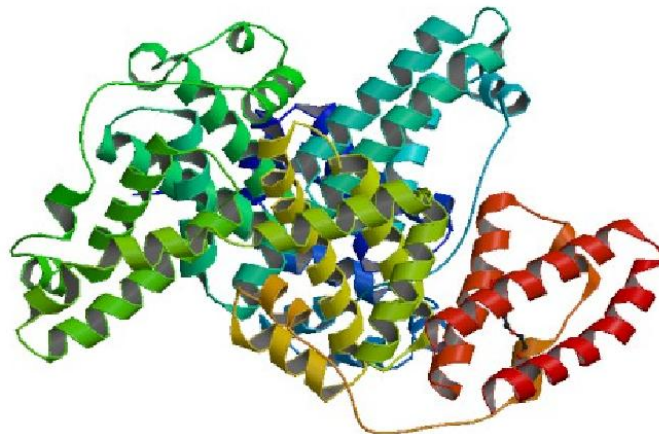


Fonte: [www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1HFZ](http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1HFZ). Acesso em: 18 fev. 2013.

#### - Soro albumina bovina (BSA)

Está presente no soro em menores proporções. É uma proteína globular com aproximadamente 582 resíduos de aminoácidos e peso molecular de cerca de 69 kDa. Sua estrutura apresenta 54% de  $\alpha$ -hélices e 40% de estrutura  $\beta$ -pregueada (SGARBIERI, 2005). Seu pI é da faixa de 4,7-4,8. Apresenta 17 ligações dissulfeto intramoleculares e um grupo tiol livre no resíduo 34. A BSA é uma proteína transportadora de ácidos graxos, sendo que esta ligação estabiliza a molécula contra a desnaturação. É uma proteína muito importante, já que é idêntica àquela isolada do soro sanguíneo (ANTUNES, 2003).

FIGURA 5 - Representação da estrutura tridimensional da BSA, gerada pelo programa PyMol com o arquivo 4F5S.pdb do banco de dados do PDB. A cadeia está colorida com gradiente espectral de cor da porção N-terminal a C-terminal.



Fonte: [www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F5S](http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F5S). Acesso em: 18 fev. 2013.

#### - Imunoglobulinas

No leite bovino, ocorrem, em pequenas quantidades, quatro das cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM e IgE. Todas as classes existem ou como polímeros ou monômeros de uma unidade básica composta de quatro cadeias polipeptídicas ligadas covalentemente por pontes dissulfeto. A forma monomérica é formada de duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (cerca de 20 kDa) e duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (entre 50 e 70 kDa), sendo proteínas muito termolábeis. Cada uma dessas cadeias

contém regiões constantes e variáveis de aminoácidos, responsáveis por funções como transporte em membranas e ligação de antígenos (ANTUNES, 2003).

#### 1.2.4.2 Sais minerais e vitaminas

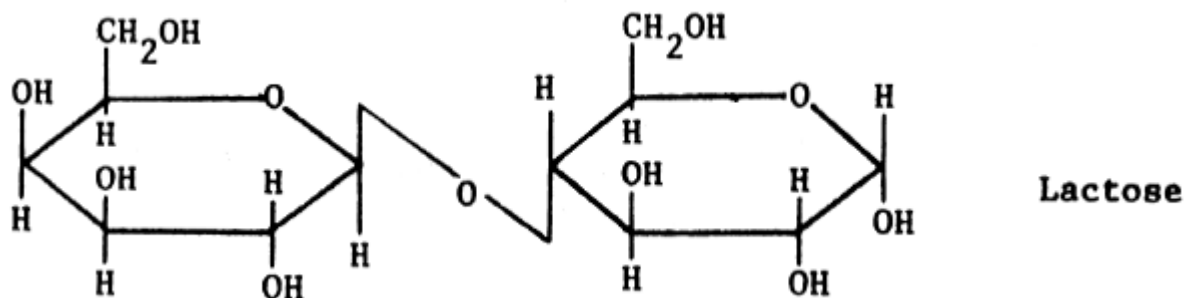
O soro contém a maioria das vitaminas hidrossolúveis contidas no leite, com predominância das vitaminas do complexo B - tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), cobalamina (B12), ácido ascórbico (vitamina C), niacina (vitamina PP), além de retinol (vitamina A) e tocoferol (vitamina E) (SCOTT, 1991). As vitaminas são substâncias orgânicas que apresentam diversas funções no organismo; agem em pequenas doses e devem ser fornecidas ao corpo via alimentação, uma vez que não são sintetizadas e são essenciais para o funcionamento do metabolismo (ARANHA *et al.*, 2000).

Dentre os minerais encontrados no leite e, por consequência, no soro de leite, pode-se listar os macroelementos (Ca, Mg, P, Na, K) e os microelementos essenciais (Zn, Se, Fe e Cu) que, mesmo em pequenas quantidades, apresentam funções biológicas e/ou atuam como cofatores enzimáticos (FRANCO, 2005; SCOTT, 1991). Podem ser encontrados ainda metais em quantidades muito pequenas, mas com efeitos tóxicos, tais como Pb e Cd (REYKDAL *et al.*, 2011).

#### 1.2.4.3 Lactose

É o carboidrato característico do leite e representa cerca de 5% da sua composição. Na fabricação de queijos, grande parte da lactose original passa para o soro de leite (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). A lactose é um dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma unidade de galactose, ligadas entre si por ligação glicosídica do tipo  $\beta$ -1,4 (Figura 6).

FIGURA 6 - Molécula de lactose.



Fonte: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab470e/ab470e04.htm>. Acesso em: 28 jan. 2014.

É pouco solúvel e por isso, quando presente nos alimentos, provoca a sensação bucal de areosidade. É pouco doce e altamente higroscópica, podendo causar empedramento em produtos lácteos em pó. Por essas características, altas concentrações de lactose podem gerar defeitos em produtos concentrados à base de leite (KOBLOITZ, 2008).

#### 1.2.5 Fatores antinutricionais

Apesar do seu rico conteúdo nutricional e dos inúmeros benefícios propiciados à saúde humana, o soro de leite possui alguns limitantes para sua utilização direta na alimentação, atribuídos ao sabor ácido, odor pronunciado, baixa estabilidade e elevada concentração salina (SISO, 1996), e a inatividade das proteínas quando ingeridas integralmente, sem que seus peptídeos ou aminoácidos sejam disponibilizados ao organismo (MARQUES *et al.*, 2009; PACHECO *et al.*, 2005; SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012). Além disso, a proteína  $\beta$ -lactoglobulina, que não está presente no leite humano, tem demonstrado ser um importante alérgeno alimentar que limita o uso dos derivados do leite bovino (LUCENA *et al.*, 2006, 2007).

Outra restrição ao uso de soro de leite integral na alimentação humana é a alta concentração de lactose. A intolerância à lactose é a incapacidade de digerir completamente o dissacarídeo e aproximadamente 75% da população mundial perde a capacidade de digerir uma dose fisiológica deste carboidrato após a infância. Sua digestão intestinal envolve a quebra em galactose e glicose. Em indivíduos que sofrem de má digestão de lactose, uma porção não digerida no intestino delgado passa para o intestino grosso, onde é fermentada pela microflora do cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta e gases, como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub> (CARULLI *et al.*, 2011).

Técnicas têm sido desenvolvidas para seletivamente concentrar, separar e remover os nutrientes do soro, pois este não é uma fonte balanceada de componentes, a fim de torná-lo benéfico ao organismo quando consumido, descartando os riscos de alergia alimentar pelos seus componentes (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

#### 1.2.6 Processos de fracionamento de nutrientes do soro

Pesquisas têm buscado métodos viáveis de fracionamento dos nutrientes do soro de leite para a obtenção de fórmulas ou concentrados hipoalergênicos, a fim de remover epítomos alergênicos das proteínas, remover ou converter a lactose a monossacarídeos digeríveis pelo organismo humano e remoção de sais minerais para melhorar a qualidade do sabor dos produtos à base de soro (CHICÓN *et al.*, 2009; LUCENA *et al.*, 2006). Técnicas encontradas

na literatura incluem hidrólises, cromatografias (troca iônica e por afinidade), filtração em membranas (ultrafiltração e nanofiltração), precipitação seletiva, secagem, evaporação, desnaturação térmica, osmose reversa, cristalização da lactose e bioconversão dos nutrientes do soro.

Segundo Chicón e colaboradores (2009), a modificação de proteínas do soro de leite através de hidrólise enzimática aumenta a estabilidade térmica, melhora a bioatividade e reduz o potencial alergênico, produzindo peptídeos para dietas especiais, nutrição clínica ou fórmulas hipoalergênicas. Os autores compararam o emprego de enzimas em diferentes pressões. A utilização de enzimas proteolíticas sob altas pressões leva à rápida liberação de peptídeos intermediários; à pressão atmosférica, as proteínas permanecem intactas por um longo período e a formação dos peptídeos é mais custosa e, quando ocorrem, há formação de fragmentos menores. Altas pressões promovem a ruptura das pontes dissulfeto e liberação de peptídeos hidrofóbicos de tamanho médio, que apresentam melhor funcionalidade quando comparados a peptídeos menores. Lucena e colaboradores (2006) também reforçam a importância da hidrólise para se evitar reações alérgicas aos produtos derivados do soro de leite.

As técnicas consideradas mais avançadas para separação das proteínas do soro são as cromatografias de troca iônica e de afinidade. O fundamento da cromatografia de troca iônica está nas diferenças de sinal e na magnitude das cargas elétricas líquidas das proteínas em um determinado pH. A matriz da coluna é um polímero sintético que possui grupos carregados; colunas ligadas a grupos aniônicos são trocadoras catiônicas e ligadas a grupos catiônicos são trocadoras aniônicas. A afinidade de cada proteína pelos grupos carregados do leito estacionário é afetada pelo pH, que determina o estado de ionização da molécula, e pela concentração dos íons salinos livres da solução eluente que com ela competem. A separação acontece, então, pelo gradiente de pH e/ou gradiente salino (BURGESS; DEUTSCHER, 2009; JANSON, 2011; NELSON; COX, 2002; ROSENBERG, 2005).

Já a separação por cromatografia de afinidade baseia-se na especificidade das ligações. As proteínas a serem retidas na coluna são aquelas que se ligam especificamente a um ligante, que por sua vez estará ligado às esferas do polímero que compõe a matriz da coluna. Após a eliminação, por lavagem das proteínas que não se ligaram à matriz, a proteína ligada de interesse é eluída por uma solução que contém o ligante livre (BURGESS; DEUTSCHER, 2009; JANSON, 2011; NELSON; COX, 2002; ROSENBERG, 2005). Através destes métodos, é possível obter proteínas de elevado grau de pureza. Porém, as desvantagens no emprego das técnicas estão associadas à regeneração da resina e grande consumo de água e

produtos químicos, além de operação eficiente somente em escalas piloto e laboratorial (LUCENA *et al.*, 2006).

Têm sido realizados estudos envolvendo a utilização de membranas para separação de lactose, proteínas e sais do soro de leite por ultrafiltração e nanofiltração. O conteúdo proteico pode ser aumentado pela remoção dos outros nutrientes do soro através da filtração. No entanto, o emprego deste tipo de tecnologia em um único estágio tem mostrado que a eficiência de remoção/separação de proteínas, lactose e sais é muito baixa, sendo necessário o emprego de membranas em vários estágios para melhoria do desempenho, encarecendo o processo (YORGUN; BALCIOGLU; SAYGIN, 2008). Além disso, devido ao peso molecular e ao pI das proteínas predominantes do soro ( $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) serem muito próximos, a separação das mesmas do soro integral não é eficiente (LUCENA *et al.*, 2006).

Lucena e colaboradores (2006) também se reportam à pesquisa de vários autores na precipitação seletiva das proteínas do soro, visando seu fracionamento. Alguns desses processos envolvem a desnaturação irreversível da proteína por altas temperaturas, meios fortemente ácidos ou a combinação de ambos, ou pela adição de reagentes químicos que possam ser removidos posteriormente. Porém, nestes casos, as proteínas não são obtidas no seu estado nativo, apesar de manter algumas características nutricionais, e mostram baixa solubilidade, dificultando seu uso como ingrediente alimentício.

O soro de leite pode ainda ser processado por secagem simples ou evaporação, visando a separação proteica da lactose e dos minerais (FOEGEDING *et al.*, 2002; MAWSON, 1994). No entanto, estes processos parecem não contribuir para a recuperação dos componentes nobres do soro, são mais utilizados visando a redução de volume do material (facilitando o transporte) e para aumentar o tempo de conservação sem que haja deterioração por contaminação microbológica e, é alto o custo da instalação industrial para estas operações (YORGUN; BALCIOGLU; SAYGIN, 2008).

Processos de conversão dos nutrientes do soro também têm sido pesquisados, nos quais a lactose é convertida a outros produtos pela atividade de microrganismos ou por reações químicas (MAWSON, 1994). Kargi e Uzunçar (2012) indicam que o soro de leite é considerado um meio nutricionalmente rico para produção de combustíveis (metano, etanol e bio-hidrogênio) e de produtos químicos (ácidos orgânicos) por fermentação devido às altas concentrações de carboidratos, proteínas e gorduras.

As tecnologias para fracionamento, concentração e/ou aproveitamento dos nutrientes do soro são promissoras. No entanto, muitas delas não são interessantes para as indústrias queijeiras pelo grande investimento necessário para implantação, além do que, muitas delas

não comportam o processamento dos volumes de soro de leite gerado diariamente pelas indústrias. Nestas circunstâncias, é indispensável a pesquisa focada nas técnicas de separação dos nutrientes do soro que apresentem menor custo e maior rendimento.

#### 1.2.7 Produtos obtidos a partir do fracionamento dos nutrientes do soro de leite

Existem vários produtos derivados de soro de leite disponíveis comercialmente. Eles são obtidos a partir de processos de fracionamento, principalmente de proteínas, e tem inúmeras funções na alimentação.

- Concentrado de soro com lactose reduzida:

É um produto que contém menos de 1% de lactose. Em geral, é obtido por hidrólise enzimática utilizando  $\beta$ -galactosidase, seguida de ultrafiltração (ANTUNES, 2003).

- Soro com minerais reduzidos:

Obtido pela remoção seletiva de parte dos minerais do soro, resultando num produto seco com teor final de cinzas inferior a 7%, através do emprego de técnicas de troca iônica ou filtração em membranas (ANTUNES, 2003).

- Concentrado proteico de soro de leite (CPS ou WPC):

É um produto resultante da remoção dos constituintes não-proteicos do soro (lactose, gordura e/ou minerais) e apresenta um teor proteico que varia de 25 a 89% (LUCENA *et al.*, 2007).

- Isolado proteico de soro de leite (IPS ou WPI):

Considerado a forma comercial mais pura das proteínas do soro, com um teor proteico superior a 85% e pequenas quantidades de lactose e gordura. Obtido através de operações de microfiltração, hidrólise, troca iônica e ultrafiltração (LUCENA *et al.*, 2007).

- Proteína de soro hidrolisada:

Produto obtido a partir da hidrólise do soro de leite, resultando em segmentos proteicos menores (peptídeos). Os hidrolisados são mais facilmente digeridos e são utilizados em alimentos para praticantes de esportes e fórmulas infantis (ANTUNES, 2003).

### 1.3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA

O soro de leite é o principal subproduto da produção de queijo. Estima-se que de 100 kg de leite originais utilizados como matéria-prima para os queijos, são gerados 80-90 kg de soro. Usualmente, é utilizado na alimentação animal ou destinado para o tratamento de efluentes, embora contenha importantes componentes, como proteínas e lactose. No entanto, seu manejo é complexo, visto o potencial poluidor, alto custo e dificuldades do processo de tratamento deste rejeito como efluente, bem como as altas concentrações de lactose e sais minerais, que impedem seu uso direto na alimentação. Como existem inúmeros produtores de queijos, e grande parte trabalha de forma artesanal, este rejeito é lançado em corpos d'água, sem tratamento correto, destruindo flora e fauna locais.

Os principais componentes de interesse nutricional encontrados no soro de leite são a lactose, minerais (predominância de cálcio, magnésio e fósforo) e proteínas ( $\beta$ -lactoglobulinas,  $\alpha$ -lactoalbuminas, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e lactoferrina). Estes, quando presentes nos alimentos, exercem importantes funções biológicas, contribuindo para a saúde humana. Para sua utilização através do soro de leite, muitas pesquisas têm mostrado o emprego de tecnologias para o fracionamento dos nutrientes, para seu aproveitamento e isolando aqueles que são prejudiciais ao organismo, ou mesmo para retirar porções que contribuem para a poluição ambiental.

Dentre as tecnologias encontradas para fracionamento dos nutrientes do soro encontram-se cromatografias, osmose reversa, utilização de membranas para filtração, evaporação, secagem, hidrólises e tratamentos eletroquímicos do soro. Porém, são processos reconhecidamente dispendiosos e que não comportariam o grande volume produzido, se empregados como uso rotineiro nos laticínios.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos gerais a caracterização físico-química de diferentes tipos de soro de leite na busca de um processo para isolamento de seus componentes simultaneamente à redução da sua capacidade poluente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos, este trabalho buscou:

- Avaliar parâmetros como pH, acidez titulável, sólidos totais, cinzas, umidade, densidade, viscosidade relativa, proteína total, lactose, gordura e metais para caracterização de diferentes tipos de soro de leite;
- Empregar processos de baixo custo no isolamento das proteínas presentes no soro visando a redução do potencial contaminante do efluente tais como precipitação em acetona 9:1 e ácido tricloroacético (TCA) 10%; carboximetilcelulose (CMC) 0,3%; mistura PEG-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e precipitação fracionada com 10, 15, 20 e 30% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- Comparar parâmetros físico-químicos tais como concentração de proteína, lactose e DQO, *a priori* e *a posteriori*, aos processos de isolamento ou fracionamento.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 SORO DE LEITE

Foram utilizados seis tipos diferentes de soro de leite líquido, oriundos da produção de queijo Colonial Fresco, Reblochon, Prato e Minas Frescal. Para o soro de queijo tipo Reblochon foram analisadas amostras obtidas a partir de leite cru e pasteurizado, e para o soro de queijo tipo Minas Frescal foram analisadas amostras provenientes de queijos com maior tempo de fermentação, seguida ou não de prensagem. Os soros dos queijos Colonial Fresco e Prato analisados foram coletados após modo convencional de fabricação, sem tratamentos diferenciados.

O soro do queijo Colonial Fresco foi cedido por uma queijaria X e os demais soros por uma fonte Y. As amostras foram armazenadas em recipientes de polipropileno (PP) de 5 litros de capacidade e mantidas em refrigerador a 8°C até o momento da realização de análises. Amostras que não foram imediatamente utilizadas foram armazenadas em congelador a -4°C.

#### 3.2 REAGENTES ANALÍTICOS

Na Tabela 2 estão listados os reagentes utilizados nas análises químicas. No preparo das soluções aquosas foi utilizada H<sub>2</sub>O destilada.

TABELA 2 - Reagentes, fórmulas moleculares, pureza e fornecedores.

(continua)

Reagente	Fórmula Molecular	Pureza	Fornecedor
Análise de proteína - Método de Biureto			
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	P.A.	Dinâmica
Tartarato Duplo de Sódio e Potássio	NaKC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	P.A.	Ecibra
Hidróxido de Sódio	NaOH	P.A.	Vetec
Albumina de Soro Bovino	BSA	P.A.	Inlab
Análise de proteína – Método de Lowry			
Carbonato de Sódio	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	P.A.	Synth
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	P.A.	Dinâmica
Tartarato Duplo de Sódio e Potássio	NaKC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	P.A.	Ecibra
Reagente de Folin-Ciocalteu	-	-	Dinâmica

TABELA 2: Reagentes, fórmulas moleculares, pureza e fornecedores.

(continua)

Reagente	Fórmula Molecular	Pureza	Fornecedor
Análise de proteína – Método de Bradford			
Coomassie Brilliant Blue G-250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	P.A.	Cromato
Etanol 95%	$CH_3CH_2OH$	P.A.	F. Maia
Ácido ortofosfórico 85%	$H_3PO_4$	P.A.	Synth
Análise de lactose – Método do DNS			
Tartarato Duplo de Sódio e Potássio	$NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	P.A.	Ecibra
Hidróxido de Sódio	$NaOH$	P.A.	Biotec
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	$C_7H_4N_2O_7$	P.A.	Vetec
D(+)-Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	P.A.	Biotec
Análise de Acidez Titulável			
Hidróxido de Sódio	$NaOH$	P.A.	Biotec
Biftalato de potássio	$C_8H_5KO_4$	P.A.	Reagen
Fenolftaleína	$C_{20}H_{14}O_4$	P.A.	Reagen
Etanol 95%	$CH_3CH_2OH$	P.A.	Biotec
Análise de Demanda Química de Oxigênio			
Dicromato de Potássio	$K_2Cr_2O_7$	P.A.	Vetec
Sulfato de Mercúrio	$HgSO_4$	P.A.	Vetec
Ácido Sulfúrico	$H_2SO_4$	P.A.	F. Maia
Biftalato de potássio	$C_8H_5KO_4$	P.A.	Reagen
Sulfato de Prata	$Ag_2SO_4$	P.A.	Merck
Análise de Demanda Bioquímica de Oxigênio			
Fosfato de Potássio Monobásico	$KH_2PO_4$	P.A.	Synth
Fosfato de Potássio Dibásico	$K_2HPO_4$	P.A.	Reagen
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro	$Na_2HPO_4$	P.A.	Synth
Cloreto de Amônia	$NH_4Cl$	P.A.	Synth
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	P.A.	Merck
Cloreto de Cálcio Anidro	$CaCl_2$	P.A.	Reagen
Cloreto Férrico Hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	P.A.	Reagen
Ácido Sulfúrico	$H_2SO_4$	P.A.	F. Maia

TABELA 2: Reagentes, fórmulas moleculares, pureza e fornecedores.

(continua)

Reagente	Fórmula Molecular	Pureza	Fornecedor
Análise de Demanda Bioquímica de Oxigênio			
Fluoreto de Potássio Dihidratado	KF.2H <sub>2</sub> O	P.A.	Vetec
Sulfato Manganoso Monohidratado	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	P.A.	Synth
Hidróxido de Sódio	NaOH	P.A.	Biotec
Iodeto de Potássio	KI	P.A.	Reagen
Azida Sódica	NaN <sub>3</sub>	P.A.	F. Maia
Glicose-D Anidra	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	P.A.	Synth
Ácido Glutâmico-L Amido Solúvel	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	P.A.	Synth
Tiosulfato de Sódio	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	P.A.	Synth
Análise de Fósforo Total			
Ácido Clorídrico	HCl	P.A.	Micro-Química
Carbonato de Bismuto	Bi <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	P.A.	Vetec
Ácido Sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	P.A.	F. Maia
Molibdato de Amônio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4 H <sub>2</sub> O	P.A.	Synth
Ácido Ascórbico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	P.A.	Vetec
Fosfato de Potássio Monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P.A.	Synth
Precipitação de Proteínas com Ácido Tricloroacético			
Ácido Tricloroacético (TCA)	CCl <sub>3</sub> COOH	25%	Biotec
Etanol 95%	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	P.A.	F. Maia
Éter Etilico	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O	P.A.	Biotec
Concentração de Proteínas com Acetona			
Acetona	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	P.A.	Vetec
Fracionamento de Proteínas por Coacervação			
Carboximetilcelulose Sódica (CMC)	-	P.A.	Synth
Fracionamento de Proteínas em Sistema Aquoso Bifásico			
Polietilenoglicol (P.M. 3350)	C <sub>2n+2</sub> H <sub>4n+6</sub> O <sub>n+2</sub>	P.A.	Sigma
Sulfato de Amônio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	P.A.	Vetec
Fosfato de Sódio Mono	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P.A.	Reagen
Fosfato de Sódio Dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	P.A.	Reagen

TABELA 2: Reagentes, fórmulas moleculares, pureza e fornecedores.

(conclusão)			
Reagente	Fórmula Molecular	Pureza	Fornecedor
Precipitação Fracionada por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
Sulfato de Amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	P.A.	Vetec
Cloreto de Bário	$\text{BaCl}_2$	P.A.	Synth
Membrana de Diálise MD25-14	-	-	Viskase
Fosfato de Potássio Monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	P.A.	Synth
Fosfato de potássio Dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	P.A.	Reagen
Ácido Clorídrico	$\text{HCl}$	P.A.	Micro-Química
Análise Eletroforética			
Tris	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	P.A.	Invitrogen
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	P.A.	Reagen
Azul de Bromofenol	$\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$	P.A.	Nuclear
2-mercaptoetanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$	P.A.	Vetec
Acrilamida	$\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$	P.A.	Sigma
Persulfato de Amônio (APS)	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	P.A.	Synth
TEMED (Tetrametiletilenodiamina)	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	P.A.	Sigma
Bisacrilamida	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	P.A.	Sigma
Ácido Clorídrico	$\text{HCl}$	P.A.	F. Maia
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	P.A.	Vetec
Ácido Acético Glacial	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	P.A.	Vetec
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	P.A.	Vetec
Coomassie Blue	$\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$	P.A.	Sigma
Marcador de massa molecular	-	-	New England Biolabs
Tricina	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$	P.A.	Inlab
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	P.A.	Biotec
Análise de Metais – Espectroscopia de Absorção Atômica com Chama			
Ácido Clorídrico	$\text{HCl}$	Mín. 37%	Micro-Química
Ácido Nítrico	$\text{HNO}_3$	Mín. 65%	Micro-Química
Óxido de Lantânio	$\text{La}_2\text{O}_3$	99,3%	Merck
Soluções Padrão Monoelementares	Ca, Mg, Pb, Cd, Co, Mn, Zn, Cu, Fe, Cr	99,9%	Qhemis
Análise de Metais – Fotometria de Chama			
Cloreto de Potássio	$\text{KCl}$	P.A.	Synth
Cloreto de Sódio	$\text{NaCl}$	P.A.	Biotec

### 3.2.1 Reagentes utilizados para análises de proteína

#### - Reagente de Biureto

A solução foi preparada pela dissolução de 1,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 6 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 300 mL de solução de NaOH a 10%, sob constante agitação, completando-se o volume até 1 L com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### - Solução do corante (dosagem proteica por método de Bradford)

A solução do corante foi preparada a partir da dissolução de 10 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 5 mL de etanol. Sob agitação e por gotejamento, adicionou-se também 10 mL de ácido ortofosfórico 85%, elevando-se o volume em balão para 100 mL com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, filtrando-se a solução em filtro de papel faixa azul (filtração lenta).

### 3.2.2 Reagentes utilizados para análise de lactose

#### - Solução DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)

A solução foi preparada dissolvendo-se, sob aquecimento, 0,25 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 75 g de  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 50 mL de solução de NaOH 2 mol  $\text{L}^{-1}$  em 250 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

### 3.2.3 Reagentes utilizados para análise de DQO

#### - Solução de digestão

Dissolveram-se 5,108 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (previamente seco em estufa a  $105^\circ\text{C}$ ) e 16,65 g de  $\text{HgSO}_4$  em uma solução de 83,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado em 250 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Diluiu-se a 500 mL.

#### - Solução catalítica

A solução foi preparada dissolvendo-se 4,95 g de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  em 500 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

#### - Solução padrão de DQO

Dissolveram-se 0,8502 g de biftalato de potássio (previamente seco em estufa a  $105^\circ\text{C}$ ) em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada completando o volume a 1000 mL. A partir desta solução foram preparadas três diluições de 800, 500 e 200 mg  $\text{L}^{-1}$  para traçar a equação da reta.

### 3.2.4 Reagentes utilizados para análise de DBO

#### - DBO I (solução tampão de fosfato)

A solução foi preparada dissolvendo-se 4,25 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 300 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, seguida da adição de 10,875 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 16,7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0,85 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , transferindo-se para um balão de 500 mL e completando-se o volume com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

- DBO II (solução de sulfato de magnésio)

Dissolveram-se 11,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em 300 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, transferindo-se para um balão de 500 mL e completando-se o volume com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

- DBO III (solução de cloreto de cálcio)

A solução foi preparada a partir da dissolução de 13,75 g de  $\text{CaCl}_2$  anidro em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, totalizando um volume de 500 mL em balão volumétrico.

- DBO IV (solução de cloreto férrico)

Dissolveram-se 0,125 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, completando-se 500 mL em balão volumétrico.

- Solução de sulfato manganoso

A solução foi preparada dissolvendo-se 182 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , totalizando um volume de solução de 500 mL em balão volumétrico.

- Solução de azida sódica

Dissolveram-se separadamente 250 g de  $\text{NaOH}$ , 75 g de  $\text{KI}$  e 5 g de  $\text{NaN}_3$  em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. As soluções foram misturadas e, após o resfriamento da mistura, foram transferidas para um balão de 500 mL e completou-se o volume com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

- Solução de glicose - ácido glutâmico

Com os reagentes previamente secos em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , foram dissolvidos 0,075 g de  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  e 0,075 g de  $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4$  em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, totalizando-se um volume de 500 mL em balão volumétrico, sendo a solução renovada a cada 15 dias.

### 3.2.5 Reagentes utilizados para determinação de fósforo

- Solução de molibdato de amônio

A solução foi preparada pela dissolução de 0,5 g de  $\text{Bi}_2(\text{CO}_3)_3$  em 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, seguida de cautelosa adição de 69 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Em outro béquer, foram adicionados 10 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Em seguida, as duas soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume.

### 3.2.6 Reagentes utilizados para eletroforese

- Tampão de amostra (gel Tris-glicina e Tris-tricina)

No preparo de 10 mL de tampão de amostra, foram necessários 2 mL de Tris-HCl pH 6,8 a 100 mmol L<sup>-1</sup>, 4 mL de SDS 4%, 1 mL de azul de bromofenol 0,2%, 2 mL de glicerol 20%, 500 µL de 2-mercaptoetanol e 500 µL de água ultrapura.

- Tampão de corrida (gel Tris-glicina)

Para 1 L de tampão, foram adicionados 30 g de Tris, 144 g de glicina e 10 g de SDS, completando-se o volume em balão volumétrico com água ultrapura.

- Tampão cátodo (gel Tris-tricina)

Foram dissolvidos 6,055 g de Tris, 8,96 g de tricina e 0,5 de SDS em água ultrapura para totalizar uma solução de 500 mL.

- Tampão ânodo (gel Tris-tricina)

Dissolveram-se 24,22 g de Tris em 1000 mL de água ultrapura.

- Solução Acrilamida-Bisacrilamida (gel Tris-tricina)

Foram dissolvidos 30 g de acrilamida e 0,8 g de Bisacrilamida em 1000 mL de água ultrapura.

- Tampão do gel de Tris-tricina (3 mol L<sup>-1</sup>)

O tampão foi preparado a partir da dissolução de 36,34 g de Tris e 0,3 g de SDS em 100 mL de água ultrapura, ajustando-se o pH da solução com HCl para 8,45.

### 3.3 EQUIPAMENTOS

Na Tabela 3 estão listados os equipamentos utilizados ao longo dos experimentos.

TABELA 3 - Equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais.

(continua)

Equipamento	Marca/Modelo
Forno Mufla	Quimis Q-318.M.24
Balança	Shimadzu BL 320H
Banho-maria	Soc. Fabbe Ltda
pHmetro de bancada	Quimis Q400AS
Balança	Marte AL500C



TABELA 3 - Equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais.

(conclusão)

Equipamento	Marca/Modelo
Agitador e chapa aquecedora	Biomixer 78HW-1
Espectrofotômetro UV-VIS	Metrolab 1700
Espectrômetro de absorção atômica	Varian AA240FS
Fotômetro de chama	Evans Electro selenium 100/3327
Espectrofotômetro UV-VIS	Varian Cary 50
Digestor DQO	Alfakit AT 509
Estufa incubadora de DBO	Tecnal TE-371
Sistema de Eletroforese Vertical	Bio-Rad Mini-PROTEAN 3
Ultracentrífuga Refrigerada	Hitachi Himac CR21GII
Centrífuga Clínica	Centribio 80-2B

### 3.4 METODOLOGIA ANALÍTICA

#### 3.4.1 Determinação de pH

A determinação de pH foi feita utilizando-se um potenciômetro, constituído de eletrodo de medida (eletrodo de vidro) e outro de referência (eletrodo de calomelano). O eletrodo de medida de vidro permite a seletividade ao íon  $H^+$  e, quando em contato com uma solução aquosa, forma uma camada hidratada, funcionando como uma membrana de troca catiônica. Ocorrem forças de repulsão de ânions por parte do silicato negativamente carregado que está fixo no sensor e, na camada externa do sensor, gera-se um potencial que é função da atividade do íon  $H^+$  na solução. O eletrodo de referência é imerso em eletrólito o qual entra em contato com a amostra através de junção (líquida) em que se forma uma ponte salina, desenvolvendo um potencial de junção mínimo possível. Na prática, a diferença de potencial do eletrodo de medida e o de referência será a resposta à variação do pH (atividade do íon  $H^+$ ) na solução de interesse (CECCHI, 2007).

Nas determinações, o equipamento foi regularmente calibrado com padrões 4,01 e 6,86 conforme instruções do fabricante. A análise foi realizada em triplicata com soros filtrados em papel de filtro qualitativo e também sem filtração.

#### 3.4.2 Determinação de Acidez Titulável

A Acidez Titulável foi determinada segundo metodologia descrita para leite e produtos lácteos em A.O.A.C. (2000), sendo considerada como a quantidade de ácido de uma amostra

que reage com uma base de concentração conhecida, utilizando fenolftaleína como indicador. Em erlenmeyer, 20 g de amostra diluída em 40 g de H<sub>2</sub>O destilada foi titulada com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, padronizada em presença de indicador fenolftaleína, em triplicata. Para obtenção da quantidade de ácido láctico presente no soro, utilizou-se a relação:

$$1 \text{ mL } 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} = 0,0090 \text{ g ácido láctico}$$

### 3.4.3 Determinação de Densidade

Para determinação da densidade, foi empregado o método de picnometria utilizando-se de um picnômetro de 50 mL. O conjunto vazio foi pesado após lavagem e secagem da vidraria ( $m_1$ ). Em seguida, o picnômetro foi preenchido com H<sub>2</sub>O destilada, enxugando-se o excesso derramado pelo braço lateral do aparato e pesado para calibração ( $m_2$ ), observando a temperatura no momento da medida. Para a medida da amostra, H<sub>2</sub>O foi retirada, o picnômetro lavado com a solução-problema e preenchido da mesma forma como realizado com a H<sub>2</sub>O, evitando-se a formação de bolhas para não haver erros nos resultados, e tomou-se o peso ( $m_3$ ). Determinou-se o volume real do picnômetro a partir da densidade da H<sub>2</sub>O na temperatura no momento da medida, através da equação:

$$\rho_{H_2O} (g \text{ cm}^{-3}) = \frac{(m_2 - m_1)}{V_{pic}}$$

Sendo  $\rho_{H_2O}$  a densidade da H<sub>2</sub>O na temperatura do momento da análise,  $m_1$  a massa do picnômetro vazio,  $m_2$  a massa do picnômetro preenchido com H<sub>2</sub>O e  $V_{pic}$  o volume real do picnômetro.

Para determinação da densidade do soro de leite, utilizou-se o  $V_{pic}$  obtido anteriormente na equação:

$$\rho (g \text{ cm}^{-3}) = \frac{m_3}{V_{pic}}$$

Em que  $\rho$  é a densidade e  $m_3$  é a massa do picnômetro preenchido com soro.

### 3.4.4 Determinação de Viscosidade Relativa

A viscosidade relativa foi determinada utilizando-se o viscosímetro de Ostwald. À temperatura ambiente, foram introduzidos, com uma pipeta, 10 mL de H<sub>2</sub>O no tubo capilar pelo extremo aberto de maior diâmetro viscosímetro. Com o auxílio de uma pêra, o fluido foi aspirado pelo extremo aberto de menor diâmetro até que o bojo superior do tubo permanecesse parcialmente cheio. Desconectou-se a pêra para que a H<sub>2</sub>O começasse a fluir. Cronometrou-se o tempo de escoamento do fluido entre os dois meniscos do tubo capilar ( $t_1$ ). Após secar o tubo de Ostwald, foram introduzidos 10 mL de soro de leite e repetiu-se o procedimento para determinação do tempo de escoamento deste fluido ( $t_2$ ). O procedimento para ambos os fluidos foi realizado em triplicata. A viscosidade relativa do soro de leite em relação à H<sub>2</sub>O pôde ser obtida pela relação:

$$\eta_{2,1} = \frac{\rho_2 t_2}{\rho_1 t_1}$$

Em que  $\eta_{2,1}$  corresponde à viscosidade relativa do soro de leite em relação à H<sub>2</sub>O (adimensional),  $\rho_2$  é a densidade do soro de leite (obtida por picnometria),  $\rho_1$  é a densidade da H<sub>2</sub>O,  $t_2$  e  $t_1$  os respectivos tempos de escoamento do soro de leite e da H<sub>2</sub>O (em segundos).

### 3.4.5 Determinação de Umidade, Sólidos Totais e Cinzas

Os teores de umidade, sólidos totais e cinzas foram determinados por método gravimétrico segundo descrito em A.O.A.C. (2000). A determinação de umidade baseia-se na remoção de H<sub>2</sub>O por aquecimento, e a umidade corresponde à perda em peso sofrida pela amostra após este processo. Em triplicata, cápsulas de porcelana previamente calcinadas a 550°C por 1 hora foram pesadas vazias ( $m_1$ ), com aproximadamente 5,0 g de amostra ( $m_2$ ) e submetidas à secagem em estufa a 105°C até peso constante ( $m_3$ ), manipulando-se o material com pinça. Com as massas obtidas, foram determinadas as porcentagens de sólidos totais e umidade das amostras de soro através das seguintes relações:

$$\% ST = \frac{100 (m_3 - m_1)}{m_2 - m_1}$$

$$\% Umidade = 100 - \% ST$$

Em que % ST é a porcentagem de sólidos totais da amostra,  $m_1$  é a massa do cadinho vazio,  $m_2$  é a massa do cadinho com amostra e  $m_3$  é a massa do cadinho com amostra seca.

Deriva-se da técnica de determinação de umidade a análise de cinzas. A cinza de uma amostra é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NO}_2$ . A amostra de soro seca foi utilizada para a determinação do conteúdo de cinzas, submetendo-se o cadinho a uma temperatura de  $550^\circ\text{C}$ , em mufla, durante 6 horas. A massa resultante deste procedimento ( $m_4$ ) pôde ser utilizada para se determinar a porcentagem de cinzas das amostras segundo a relação:

$$\% \text{ Cinza} = \frac{100 (m_4 - m_1)}{m_2 - m_1}$$

Sendo  $m_1$  a massa do cadinho vazio,  $m_2$  a massa do cadinho com amostra e  $m_4$  é a massa do cadinho com amostra incinerada.

### 3.4.6 Determinação de Proteínas Totais

#### 3.4.6.1 Dosagem de proteínas pelo método de Biureto

A quantificação de proteínas pelo método de Biureto é descrito por Gornall e colaboradores (1948), e baseia-se na reação do reagente de Biureto (mistura de Cu e NaOH) com um complexante, o tartarato de sódio e potássio, que estabiliza o cobre em solução. O cobre reage com proteínas em meio alcalino, formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica, com banda de absorção em 540 nm.

Em tubo de ensaio, diluiu-se 0,5 mL de soro de leite em 9,5 mL de água destilada. Em triplicata, transferiu-se 1,0 mL da amostra para outro tubo de ensaio, adicionou-se 5,0 mL de reagente de Biureto (descrito em 3.2.1), agitou-se e manteve-se em repouso por 10 minutos. O mesmo procedimento foi realizado colocando-se 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada no lugar da amostra, sendo este tubo denominado branco. Foram feitas as medidas espectrofotométricas a 540 nm, usando o branco para acertar o zero da escala.

Para traçar a equação da reta que define a concentração de proteína das amostras seguindo a Lei de Lambert-Beer, a partir da solução padrão de proteína  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , foram feitas diluições para se obter diferentes concentrações de proteína.

Portanto, a concentração de proteína será dada pela equação:

$$\text{Proteína (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{y - b}{a} \cdot d$$

Em que a e b foram obtidos da equação da reta, y foi a absorbância da amostra e d a respectiva diluição.

#### 3.4.6.2 Dosagem de proteínas pelo método de Lowry

A quantificação de proteínas pelo método de Lowry é descrito por Lowry *et al.* (1951), sendo a técnica mais utilizada na detecção de aminoácidos específicos (Tirosina, Triptofano, Fenilalanina) (OKUTUCU *et al.*, 2007; METSÄMUURONEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖM, 2011). O método baseia-se na redução do reagente de Folin (ácidos mistos fosfomolibdco-tungstico) em presença de proteínas em solução, gerando cromóforos azuis com absorção característica na faixa de 700-750 nm, em que os principais cromóforos são as ligações peptídicas, resíduos aromáticos Trp e Tyr e as cadeias polares (BURGESS; DEUTSCHER, 2009).

Partindo-se de uma solução estoque de 1 mg mL<sup>-1</sup> de BSA para construção da curva padrão e 400 µL de amostras previamente diluídas (0,5 mL de soro de leite em 9,5 mL de água destilada), em triplicata, foram adicionados 2000 µL de solução D, com tempo de reação de 30 minutos (em ausência de luz), seguida de adição da solução E aguardando-se 10 minutos (em ausência de luz). Denominam-se os reagentes:

- Reagente A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>;
- Reagente B: CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1%;
- Reagente C: NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O 2%;
- Reagente D: numa proporção de 1:1:100 (C:B:A);
- Reagente E: Reagente de Folin.

Em seguida, foram feitas leituras espectrofotométricas em 700 nm, usando o branco para acertar o zero da escala. A concentração de proteína é então dada pela equação:

$$\text{Proteína (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = \frac{y - b}{a} \cdot d$$

Em que a e b foram obtidos pela equação da curva de calibração, y a absorbância da amostra e d a respectiva diluição.

### 3.4.6.3 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

O método de Bradford é descrito por Bradford (1976), cujo princípio é de que o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 interage com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas e a cor desenvolvida pela reação, medida espectrofotometricamente, indica o teor de proteínas da amostra. O corante G-250 do método tem maior resposta com aminoácidos específicos (arginina, lisina, histidina, fenilalanina, triptofano e tirosina), além de ser mais aplicável em proteínas puras a misturas (BURGESS; DEUTSCHER, 2009; RAUNKJÆR; HVITVED-JACOBSEN; NIELSEN, 1994).

Partindo-se de uma solução estoque de  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA para construção da curva padrão e  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de amostras previamente diluídas ( $0,5 \text{ mL}$  de soro de leite em  $9,5 \text{ mL}$  de água destilada), em triplicata, foram adicionados  $1000 \text{ }\mu\text{L}$  de solução do corante (descrita em 3.2.1). Em seguida, foram feitas leituras espectrofotométricas em  $595 \text{ nm}$ , usando o branco para acertar o zero da escala. A concentração de proteína é então dada pela equação:

$$\text{Proteína (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{y - b}{a} \cdot d$$

Em que a e b foram obtidos pela equação da curva de calibração, y a absorbância da amostra e d a respectiva diluição.

### 3.4.6.4 Dosagem de proteínas/nitrogênio pelo método de Kjeldahl

Os teores de nitrogênio e proteína pelo método de micro-Kjedahl tem metodologia descrita em APHA (1998). Esta determinação quantifica N orgânico total, ou seja, N proteico e não-proteico orgânico. A técnica fundamenta-se no aquecimento da amostra com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para digestão até que C e H sejam oxidados. O N da proteína é reduzido e transformado em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Com a adição de base concentrada (NaOH) e aquecimento,  $\text{NH}_3$  é liberada dentro de um volume conhecido de solução de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , formando borato de amônia, que é então dosado por titulação com uma solução ácida (HCl) padronizada, resultando no teor de nitrogênio. Para converter o nitrogênio medido em proteína, multiplica-se o conteúdo de nitrogênio por um fator arbitrário, que representa um fator médio para o material em estudo (no caso, o fator utilizado foi de 6,38, relacionado aos produtos lácteos) (CECCHI, 2007).

Pesou-se cerca de  $10 \text{ mL}$  de cada amostra em tubos e adicionou-se a cada tubo  $1,5 \text{ g}$  de catalisador e  $6 \text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Os tubos foram levados ao bloco digestor com temperatura inicial de  $50^\circ\text{C}$  e aumentou-se a temperatura em  $50^\circ\text{C}$  a cada  $30$  minutos até

atingir 350°C. Quando o conteúdo dos tubos ficou transparente, de cor verde-azulado, as amostras permaneceram por mais duas horas. Depois, nos tubos frios, adicionou-se um pouco de água destilada lavando as paredes do tubo. Em seguida, as amostras foram destiladas em destilador de nitrogênio, neutralizada com NaOH 50 % até o aparecimento de cor escura (óxido de cobre formado). O destilado foi recolhido em erlenmeyer com 10 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2% com indicador misto até um volume de 150 mL. O destilado foi titulado com HCl 0,01 N até que o indicador virou da cor azul para vinho. Realizou-se então o cálculo para o teor de nitrogênio (%N) segundo a equação:

$$\%N = \frac{Vol.(HCl).N(HCl).fc.1,4008}{peso\ da\ amostra}$$

Sendo, Vol.(HCl) o volume de HCl utilizado na titulação em mL, N a normalidade do HCl e fc o fator de correção do HCl. A análise de todas as amostras nesta técnica foi realizada pelo Laboratório de Análise de Alimentos, do Departamento de Engenharia de Alimentos da UEPG.

#### 3.4.7 Determinação de Lactose

A porcentagem de lactose das amostras de soro de leite foi determinada pelo método do DNS segundo metodologia descrita por Miller (1959). O método do DNS envolve a oxidação de um grupo carbonila que não está envolvido com uma ligação glicosídica, ou seja, quantifica açúcares redutores. O oxidante, chamado DNS, utiliza ácido 3,5-dinitrosalicílico, solução de tartarato duplo de Na e K (que serve para prevenir o reagente da ação do oxigênio dissolvido) e hidróxido de sódio, que é o redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitrosalicílico. Ocorrem neste caso a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (de cor amarelo forte) e a oxidação do carboidrato, formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de cor laranja-marrom forte), na proporção estequiométrica. Portanto, pela determinação da luz absorvida a 570 nm pelo ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, pode-se determinar a concentração de açúcar redutor, no caso a lactose, presente na solução.

Em tubo de ensaio, foi diluído 0,5 mL de soro de leite em 9,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Da diluição, em triplicata, uma alíquota de 200 µL foi adicionada a 2 mL de solução DNS (descrita no item 3.2.2). A mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C durante 10 minutos. O mesmo procedimento foi realizado colocando-se 200 µL de H<sub>2</sub>O destilada em lugar da

amostra, sendo este tubo denominado branco. Foram feitas as leituras espectrofotométricas em 570 nm, usando o branco para acertar o zero da escala.

Para traçar a equação da reta que define a concentração de lactose das amostras seguindo a Lei de Lambert-Beer, a partir da solução de 5 g L<sup>-1</sup>, foram feitas diluições de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 g L<sup>-1</sup> de lactose. Portanto, a concentração de lactose foi dada pela equação:

$$Lactose (g L^{-1}) = \frac{y - b}{a} \cdot d$$

Em que a e b foram obtidos da equação da reta, y foi a absorbância da amostra e d a respectiva diluição.

#### 3.4.8 Determinação de Gordura Total

O método empregado na determinação da gordura presente no soro de leite foi a extração de lipídeos por hidrólise ácida pelo processo de Gerber, descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Neste procedimento, foram pesados a vidraria específica para a análise (o butirômetro) e suas respectivas rolhas para se verificar a equivalência entre os pesos. Ao butirômetro, foi adicionado 1 mL de álcool isoamílico a 11 mL de amostra já presentes, que por sua vez foram adicionados lentamente a 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com densidade de 1,82. O frasco foi fechado e agitado até mistura dos três líquidos. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos e levadas em seguida a banho-maria a 65°C por 3 minutos, com a rolha para baixo. A camada de gordura foi então colocada dentro da escala graduada do butirômetro. O valor obtido na escala corresponde diretamente à porcentagem de gordura presente no soro. A análise de todas as amostras foi realizada pelo Laboratório de Análise de Alimentos, do Departamento de Engenharia de Alimentos da UEPG.

#### 3.4.9 Determinação de Metais

##### 3.4.9.1 Determinação de metais por absorção atômica com chama (Ca, Mg, Pb, Cd, Co, Mn, Zn, Cu, Fe e Cr)

A quantificação dos metais Ca, Mg, Pb, Cd, Co, Mn, Zn, Cu, Fe e Cr foi realizada por espectrometria de absorção atômica com chama. Na espectroscopia atômica, as amostras líquidas são aspiradas por um tubo capilar para dentro de um nebulizador, pelo fluxo rápido de um oxidante próximo da ponta do capilar. O líquido se dispersa como uma fina névoa, que



é direcionada em alta velocidade sobre uma pérola de vidro para que as partículas tornem-se ainda menores (nebulização). A névoa, o oxidante e o combustível fluem pelos defletores, que promovem uma homogeneização adicional e evitam a passagem de gotículas grandes de líquido e são direcionados à chama (com temperatura entre 1700°C e 2400°C, dependendo da mistura de combustível e oxidante) para que o líquido evapore e o sólido restante seja decomposto em átomos (atomizado). A quantidade presente de cada elemento é determinada pela absorção de radiação visível ou ultravioleta por parte dos átomos no estado gasoso (HARRIS, 2005).

Para as medidas de absorção atômica, são utilizadas lâmpadas de cátodo oco, compostas de um ânodo de tungstênio e um cátodo cilíndrico selado em um tubo de vidro preenchido com Ne ou Ar. O cátodo é construído com o metal cujo espectro é desejado. A ionização do gás inerte ocorre quando se aplica um potencial na ordem de 300 V através dos eletrodos, gerando correntes elétricas de 5 a 15 mA conforme íons e elétrons migram para os eletrodos. Se o potencial é suficientemente grande, os cátions gasosos adquirem energia cinética suficiente para expelir alguns dos átomos metálicos da superfície do cátodo e produzir uma nuvem atômica em um processo de remoção. Uma porção dos átomos metálicos removidos que se encontra no estado excitado e então emitem sua radiação característica quando retornam ao estado fundamental. Os átomos da amostra absorvem parte da luz proveniente da lâmpada e um detector, então, mede a quantidade de luz não absorvida que passa através da chama (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Assim como nos experimentos de absorção molecular, obtêm-se relações de transmitância e absorbância, de forma que:

$$T = \left( \frac{I_t}{I_0} \right) = \textit{transmitância}$$

$$A = \log \left( \frac{1}{T} \right) = \log \left( \frac{I_0}{I_t} \right) = \textit{absorbância}$$

Em que  $I_0$  é a energia radiante que atinge o detector quando não existe nenhuma amostra presente na chama e  $I_t$  é a energia medida quando a amostra está presente. A intensidade da absorção será, então, proporcional à concentração do composto analisado (HARRIS, 2005).

A digestão da amostra foi realizada por via seca, conforme descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), em cápsulas de porcelana. A partir das cinzas obtidas, conforme descrição no item 3.4.5, as amostras foram umedecidas com H<sub>2</sub>O desmineralizada e aquecidas, em chapa aquecedora, com 1 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado até a secura das cinzas. As cápsulas de porcelana foram novamente colocadas em mufla a 550°C até a completa mineralização da amostra, ou seja, até a obtenção de cinzas claras. As cinzas foram então dissolvidas em HCl concentrado, de modo que a concentração final da amostra no balão volumétrico fosse de 10%.

Aos balões volumétricos contendo branco dos reagentes e padrões foi adicionado solução de óxido de lantânio a uma concentração de 5,1 g L<sup>-1</sup>. O equipamento foi zerado, a curva padrão estabelecida e realizada a leitura das amostras, obtendo-se os resultados em mg L<sup>-1</sup>. Utilizando-se a massa de soro inicial e a concentração encontrada para a solução de amostra diluída, foi possível quantificar o conteúdo dos metais das amostras. Para limpeza da vidraria utilizada nesta análise, as mesmas foram mantidas em HNO<sub>3</sub> 10% por, no mínimo, 24 horas, para evitar a presença de interferentes nas amostras.

#### 3.4.9.2 Determinação de metais por fotometria de chama (Na e K)

A determinação de Na e K da amostra foi feita utilizando-se um fotômetro simples de filtro, realizando-se o mesmo procedimento de digestão de amostras citada em 3.4.9.1 para obtenção das espécies metálicas. O instrumento utilizado possuía feixe único e leitura direta, consistindo de uma lâmpada de filamento de tungstênio, uma lente para fornecer um feixe de luz paralelo, um filtro e uma célula fotovoltaica. A corrente produzida, indicada por um microamperímetro numa escala de 0 a 100, por apresentar relação linear com a concentração do analito, fornecia uma leitura direta da quantificação dos metais. Foi construída uma curva de calibração de 0 a 10 ppm de solução de cloreto de potássio e sódio, e para leitura das amostras de soro de leite, foi realizada uma diluição de 1:10.

#### 3.4.10 Determinação de Demanda Química de Oxigênio

A medida da DQO foi realizada segundo metodologia descrita em APHA (1998), utilizando-se o método colorimétrico de refluxo fechado, cujo princípio é baseado na drástica oxidação química da matéria orgânica e inorgânica presente na amostra com a utilização de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em ebulição. O consumo de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> resulta na demanda de oxigênio para a completa oxidação da matéria orgânica, sendo avaliado por leitura de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

Em tubo de digestão, foi adicionado 1,5 mL da amostra bem homogeneizada e 1,0 mL da solução digestora, mantendo-se sob agitação. Em seguida, foi adicionado lentamente 2,0 mL da solução catalítica pelas paredes do tubo, fechando-o imediatamente e agitando sob água corrente, devido ao aquecimento com a mistura das fases. O mesmo procedimento foi realizado colocando-se 1,5 mL de água destilada no lugar da amostra, sendo este tubo denominado branco. Os tubos foram colocados no bloco digestor a 150°C por duas horas. Para cada amostra foram feitas triplicatas. Depois das duas horas, os tubos foram retirados do bloco, esperou-se esfriar e foram feitas leituras em espectrofotômetro a 600 nm, usando o branco para acertar o zero da escala.

Preparou-se uma solução padrão de biftalato de potássio equivalente a 1000 mg L<sup>-1</sup> e diluiu-se para obter diferentes concentrações de 800, 500 e 200 mg L<sup>-1</sup> para traçar a equação da reta  $y = a.x + b$ , onde  $a$  e  $b$  são obtidos na equação da reta e  $y$  é o valor da absorbância. Calculou-se a DQO segundo a equação:

$$DQO (mgO_2 L^{-1}) = \frac{y - b}{a} \cdot d$$

Em que  $d$  é a diluição da amostra.

#### 3.4.11 Determinação de Demanda Bioquímica de Oxigênio

O método de análise para determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio seguiu a NBR 12614, que dispõe sobre o método de incubação a 20°C por cinco dias. A DBO representa a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação biológica e química das substâncias oxidáveis contidas na amostra, sendo um teste empírico que corresponde à diferença entre as concentrações de oxigênio no início ( $t = 0$ ) e no fim ( $t = 5$  dias) de um período de incubação, em condições específicas do ensaio (20°C). Admite-se que, nestas condições, 80% da matéria orgânica carbonatada esteja mineralizada e principiando a *nitrificação*.

Inicialmente, preparou-se a água a ser utilizada na diluição das amostras em quantidade suficiente para efetuar os testes (1200 mL para cada amostra + 600 mL para padronização + 600 mL para teste da água de garrafão), aerando água destilada (com o auxílio de uma bomba para aquário) por 30 minutos. Foram adicionados 1 mL de cada nutriente (DBO I a DBO IV, descritos em 3.2.4) e mais 0,3 mL de semente (esgoto doméstico, cedido

pela ETE Gertrudes da SANEPAR, bairro Shangrilá, Ponta Grossa-PR) para cada litro de água contido no garrafão, aerando por mais 30 minutos.

A partir dos valores obtidos de DQO, foi estipulado o uso de 5 µL de soro adicionado de água de diluição descrita anteriormente em dois frascos de DBO por amostra, resultando numa diluição final de 1:60000 na análise e pH ajustado entre 6,8-7,2 (com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH). Os frascos foram homogeneizados, um foi incubado a 20°C durante 5 dias em estufa e outro seguiu para a determinação de oxigênio dissolvido (OD).

Na determinação de OD, foram adicionados 1 mL de fluoreto de potássio, 2 mL de sulfato manganoso e 2 mL de azida sódica, tampando o frasco e agitando vigorosamente. As amostras foram deixadas em repouso por 15 minutos e adicionadas de 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, tampando o frasco, descartando o excedente e agitando-se até a completa dissolução do sedimentado. Tomou-se uma alíquota de 200 mL de amostra em erlenmeyer, titulou-se com tiosulfato de sódio 0,025 N até coloração amarelo claro, adicionou-se 1 mL de solução de amido 1% e continuou-se a titulação até viragem para a coloração incolor. O oxigênio dissolvido inicial (OD<sub>i</sub>) da amostra é então calculado:

$$OD (mgO_2 L^{-1}) = \frac{V.N.8000}{A}$$

Em que V é o volume gasto de tiosulfato (em L), N é a normalidade do tiosulfato, A é a alíquota titulada da amostra em litros e 8000 é o equivalente em gramas de O<sub>2</sub>.

Passados os 5 dias de incubação da amostra, o mesmo procedimento de OD foi realizado para determinação do oxigênio dissolvido final (OD<sub>f</sub>). Com os valores obtidos, foram calculados o decréscimo de oxigênio final em relação ao inicial e a DBO como segue:

$$Decréscimo (\%) = \frac{OD_i - OD_f}{OD_i} . 100$$

$$DBO (mgO_2 L^{-1}) = \frac{(OD_i - OD_f)}{A} . 300$$

Sendo A a alíquota da amostra.

Para testar a qualidade da água de diluição, dois frascos de DBO foram preenchidos somente com água de diluição, determinando-se OD<sub>i</sub> e OD<sub>f</sub>, como feito para a amostra, sendo

que uma água considerada adequada possuía uma diferença entre o oxigênio inicial e final inferior a  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Como teste de padronização da técnica, a determinação de  $OD_i$  e  $OD_f$  foi feita em 4,5 mL de uma solução de glicose-ácido glutâmico (descrita em 3.2.4), obtendo-se a DBO pelo mesmo cálculo utilizado para a amostra.

#### 3.4.12 Determinação de Fósforo Total

O fósforo foi determinado segundo metodologia descrita por Silva (1981). A determinação seguiu duas etapas, uma de conversão de todas as formas de fósforo para ortofosfato por hidrólise ácida com HCl, seguida de determinação espectrofotométrica em 725 nm com a adição de ácido ascórbico.

Adicionou-se 10 mL da amostra em cápsulas de porcelana que foram levadas à estufa para secagem da amostra. Para cada amostra foram feitas triplicatas. Depois de secas, as amostras foram levadas a mufla por 6 horas a  $550^\circ\text{C}$ . Retirou-se as cápsulas da mufla e, após esfriarem, foram adicionados 5 mL de HCl 1:1 e levadas ao aquecimento em chapa até secagem total do ácido. Depois, foram adicionados mais 5 mL do HCl e levadas novamente ao aquecimento até que o volume do ácido foi reduzido à cerca de 1 mL, quando retirou-se da chapa para esfriar. Em seguida, as cápsulas foram lavadas com água e filtradas em balão de 100 mL, preenchendo-se o volume. Desse balão, foram transferidos 5 mL para um balão de 50 mL e adicionou-se mais 5 mL de solução de molibdato de amônio e 2 mL de ácido ascórbico 2%, completando-se o volume com água destilada. Passado cinco minutos, foi efetuada a leitura em 725 nm. Um branco também foi preparado, usando água destilada mais os reagentes para acertar o zero da escala. Preparou-se uma solução padrão de fósforo com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  equivalente a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  e diluiu-se para obter diferentes concentrações de 0, 200, 400, 600, 800, e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  para traçar a equação da reta  $y = a.x + b$ , onde  $a$  é obtido na equação da reta e  $y$  é o valor da absorbância. O cálculo do teor de fósforo foi determinado pela equação:

$$\text{Fósforo (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{y - b}{a} \cdot d$$

Em que  $d$  é a diluição da amostra.

#### 3.4.13 Precipitação de proteínas com Ácido Tricloroacético (TCA)

Visando concentrar as proteínas contidas no soro de leite, amostra de soro de queijo tipo Reblochon (pasteurizado) foi submetida à precipitação por adição de TCA. Muitas proteínas podem ser precipitadas pela adição de solventes orgânicos solúveis em água. Nas misturas contendo água e solvente orgânico, a interação da água com as proteínas é reduzida devido ao fato que as moléculas de água interagem mais fortemente com as moléculas de solvente. A água que então interagira com porções hidrofóbicas das proteínas é substituída pelo solvente, aumentando a entropia e, sendo energeticamente favorável, proteínas com grande número de resíduos hidrofóbicos tendem a permanecer dissolvidas na solução orgânica, ocorrendo a precipitação (JANSON, 2011; ROSENBERG, 2005).

Trabalhando-se com um volume inicial de soro de leite de 40 mL, foram adicionados 25 mL de TCA solução de 25% incubando-se em gelo por 30 minutos. A amostra foi levada para centrifugação a 12000 x g por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi enxaguado com solução etanol:éter (1:1 v/v), seguida de centrifugação a 12000xg por 5 minutos. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0.

#### 3.4.14 Concentração de proteínas com Acetona

A concentração de proteínas com adição de acetona tem o mesmo princípio do uso de TCA para precipitação. Foram adicionados 9 volumes de acetona a -4°C na amostra de soro de leite (Reblochon pasteurizado), misturando-se e incubando-se o sistema a -4°C por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 12000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado resuspenso em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0.

#### 3.4.15 Fracionamento de proteínas por Coacervação

Para recuperação das diferentes frações proteicas presentes no soro de queijo Reblochon (pasteurizado), foi testada a precipitação seletiva das proteínas com carboximetilcelulose (CMC) pela técnica de coacervação, descrita por Capitani e colaboradores (2005), adaptada de Hidalgo e Hansen (1971). A coacervação é definida como a separação coloidal de sistemas em duas fases líquidas, estimulada por forças de atração dos polímeros com cargas opostas (SOUZA *et al.*, 2013). Este tipo de reação é dependente do pH em que o procedimento é conduzido e envolve a formação de complexos solúveis ou insolúveis em pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas de interesse. Uma vez que as interações nesta técnica são resultado de atrações iônicas entre cargas opostas dos coloides, é

esperado que diferentes proteínas possam ser seletivamente precipitadas por polieletrólitos adequados, ou seja, aqueles que possuem diferença significativa no caráter iônico em relação às proteínas alvo (HIDALGO, HANSEN, 1971).

Foi preparada uma solução de CMC de concentração 0,3% (p/v), sendo lentamente dispersa em água destilada à temperatura ambiente, sob agitação até completa dissolução, deixada em repouso e sob refrigeração no dia anterior ao procedimento. O soro de leite foi então adicionado de CMC 0,3% numa proporção de 1:0,43 (v/v), ajustando-se o pH da mistura para 4,0 com HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, seguido de centrifugação a 2150 rpm por 30 minutos. O precipitado obtido foi resuspenso em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 e o sobrenadante foi adicionado de CMC numa proporção de 1:0,14 (v/v), ajustando-se o pH para 3,2 com HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. A amostra foi novamente centrifugada a 2150 rpm por 30 minutos, retirou-se o sobrenadante e o precipitado obtido foi dissolvido em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0.

#### 3.4.16 Fracionamento de proteínas em Sistema Aquoso Bifásico

Na tentativa de separar as frações  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do soro de leite, foi testada a separação de proteínas em sistema aquoso bifásico utilizando o sistema polímero/sal com polietilenoglicol (PEG) de peso molecular de 3350 e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, adaptando-se as técnicas descritas por Chen (1992) e Rodrigues; Venâncio e Teixeira (2001). O mecanismo pelo qual a adição de sal influencia na separação de soluções aquosas de polímeros ainda não é bem elucidado na literatura. Uma explicação qualitativa do fenômeno diz respeito à incompatibilidade entre soluções aquosas de polímero e de sal de elevada força iônica. Sais de pequenos ânions multivalentes e alta densidade de carga são impedidos estericamente de interagir com o polímero, pela substituição de interações cátions-H<sub>2</sub>O por interações cátions-PEG-éter-O<sub>2</sub>, originando zonas depletadas de sal e, conseqüentemente, a separação eficiente das fases.

Numa alíquota de soro de queijo tipo Reblochon (pasteurizado), foram adicionados lentamente PEG 3350 e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de forma a obter uma solução 14% (p/p) de cada reagente. Em seguida, as fases foram separadas por centrifugação a 4000xg por 5 minutos a 18°C e as frações superior e inferior do centrifugado foram separadas com pipeta Pasteur.

#### 3.4.17 Precipitação fracionada com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

A precipitação fracionada de proteínas por adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ocorre pela desidratação do microambiente da molécula de proteína, fenômeno conhecido como *Salting out*. Numa solução contendo a mistura proteica e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , um grande número de moléculas de água está ligada ao íon  $\text{SO}_4^{-2}$ , reduzindo a quantidade de água disponível para interagir com as proteínas. Em uma determinada concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , uma porção insuficiente de água livre restará para deixar as proteínas em solução, resultando na precipitação (ROSENBERG, 2005).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido foi lentamente adicionado ao soro de queijo Reblochon (pasteurizado) filtrado, em quantidade suficiente para atingir uma saturação inicial de 10%, em banho de gelo e agitação suave por 30 minutos. A solução foi centrifugada a  $10000 \times g$  por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , visando a precipitação das proteínas de baixo peso molecular. Ao sobrenadante foi novamente adicionado  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nas mesmas condições, suficiente para atingir 15% de saturação, repetindo-se a centrifugação e adição de sal nas saturações de 20 e 30%.

O precipitado foi resuspenso em 10 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,2 e dialisado contra o mesmo tampão sob suave agitação a  $4^\circ\text{C}$ , sendo a exclusão do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  monitorada qualitativamente por teste de alíquotas do dialisado em presença de  $\text{BaCl}_2$  em meio ácido ( $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 3.4.18 Eletroforese

Os géis de eletroforese foram conduzidos como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese baseia-se na premissa que cada proteína tem uma mobilidade eletroforética específica,  $m$ , que determina sua velocidade de migração,  $v$ , em um campo elétrico  $E$  ( $\text{Vcm}^{-1}$ ), sendo tais parâmetros correlacionados pela equação:

$$v = m \cdot E$$

Devido à variação da velocidade de migração entre uma molécula e outra, por depender de seu tamanho e carga, os componentes de uma amostra são separadas em bandas e se apresentam em padrões característicos, distinguindo as proteínas presentes no material em estudo (JANSON, 2011; VOET, VOET, 1990).

Para análise do perfil de proteínas no soro de leite integral, uma amostra de soro de queijo Reblochon (pasteurizado) em diferentes diluições e após centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos foi submetida à eletroforese em gel Tris/glicina. 10  $\mu\text{L}$  das amostras foram



fervidas a 100°C por 10 minutos em banho-maria em presença de 10 µL tampão de amostra (descrito em 3.2.6). O gel de resolução se constituiu de 4,35 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 2,5 mL de Tris-HCl pH 8,8 1,5 mol L<sup>-1</sup>, 100 µL de SDS 10%, 3 mL de acrilamida 40%, 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED. Para o gel de empilhamento, foram necessários 3,162 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 1,3 mL de Tris-HCl pH 6,5 0,5 mol L<sup>-1</sup>, 50 µL de SDS 10%, 487,5 µL de acrilamida 40%, 25 µL de persulfato de amônio 10% e 10 µL de TEMED. A corrida eletroforética foi realizada a temperatura ambiente com uma diferença de potencial de 180 V até que o azul de bromofenol atingisse a base do gel (aproximadamente 1 hora). A amostra foi fixada no gel com uma solução corante contendo 2,5 g de corante Coomassie Brilliant Blue, 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 450 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura, por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo posteriormente descorada com uma solução contendo 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 450 mL de água ultrapura.

Para análise dos diferentes métodos de separação das proteínas do soro de leite, amostras de soro de queijo Reblochon (pasteurizado) pós-fracionamentos foram submetidas à eletroforese em gel Tris/tricina. 10 µL das amostras foram fervidas a 100°C por 10 minutos em banho-maria em presença de 10 µL tampão de amostra (descrito em 3.2.6). O gel de resolução (16%) se constituiu de 156 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 9 mL de solução Acrilamida-Bisacrilamida, 5,64 mL de tampão do gel 3 mol L<sup>-1</sup>, 2,28 g de glicerol, 300 µL de persulfato de amônio 10% e 14,4 µL de TEMED, totalizando dois géis. Para o gel de empilhamento, foram necessários 3,72 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 0,792 mL de solução Acrilamida-Bisacrilamida, 1,488 mL de tampão do gel 3 mol L<sup>-1</sup>, 200 µL de persulfato de amônio 10% e 7,2 µL de TEMED. A corrida eletroforética foi realizada a temperatura ambiente com uma diferença de potencial de 180 V até que o azul de bromofenol atingisse a base do gel (aproximadamente 1 hora). A amostra foi fixada no gel com uma solução corante contendo 2,5 g de corante Coomassie Brilliant Blue, 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 450 mL de água ultrapura, por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo posteriormente descorada com uma solução contendo 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 450 mL de água ultrapura.

#### 3.4.19 Análise dos dados

Para a construção de gráficos na interpretação de resultados, utilizou-se o software Origin 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SORO DE LEITE

Na Tabela 4 encontram-se a média dos valores obtidos para a composição físico-química dos soros de leite analisados e os respectivos desvios padrão. Comparativamente, observa-se que a composição do soro é variável e depende de fatores como o tipo de queijo produzido, do tratamento térmico dado ao leite e sua manipulação (ANTUNES, 2003; MIZUBUTI, 1994; TONI; IMAMURA; DORTA, 2012).

TABELA 4 - Composição físico-química de diferentes tipos de soro de leite.

Parâmetros	Queijo Colonial Fresco	Queijo Reblochon (cru)	Queijo Reblochon (Pasteurizado)	Queijo Prato	Queijo Minas Frescal	Queijo Minas Prensado	Faixa**
pH sem filtração*	6,51	6,69	6,68	6,34	6,60	6,56±0,01	6,20-6,40
pH com filtração*	5,53	6,69	6,67	6,41±0,01	6,62	6,53±0,02	6,20-6,40
Acidez titulável (g ácido láctico)	0,0363±0,001	0,015±5.10 <sup>-4</sup>	0,014	0,025±0,001	0,017±5.10 <sup>-4</sup>	0,018	0,05
Densidade (g cm <sup>-3</sup> )*	1,022	1,022	1,024	1,026	1,025	1,025	1,025-1,030
Viscosidade Relativa	1,273±0,015	1,287±0,014	1,296±0,015	1,292±0,014	1,291±0,028	1,291±0,028	-
Umidade (%)	93,30±0,42	93,12±0,16	93,08±0,01	93,86±0,16	93,42±0,27	92,68±0,87	93,10-93,60
Sólidos Totais (%)	6,70±0,42	6,88±0,16	6,92±0,01	6,14±0,16	6,58±0,27	7,32±0,87	6,40-6,90
Cinzas (%)	0,407±0,088	0,607±0,046	0,408±0,147	0,414±0,024	0,593±0,285	0,484±0,158	0,5-0,7
Gordura Total (%)	0,4	0,3	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3
Lactose (%)	6,418±0,077	6,229±0,226	6,790 ±0,529	5,810±0,051	5,871±0,248	6,094±0,427	4,90-5,10

\*n=2

\*\* Fontes: ANTUNES, 2003; MIZUBUTI, 1994; REYKDAL *et al.*, 2011; VENTUROSU *et al.*, 2007.

A análise do pH em soro se faz necessária quando se objetiva um emprego mais nobre para o rejeito, principalmente com relação ao conteúdo proteico, uma vez que a funcionalidade, bem como a previsão do comportamento das proteínas em processos de precipitação, separação e concentração está relacionada ao seu pI, sendo o pH um fator determinante para a manutenção da estrutura nativa destas proteínas (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012). O pH do soro de leite varia em função do tipo de queijo produzido.

Determinados queijos como a ricota necessitam de acidificação (geralmente pela adição de ácido láctico), gerando um soro ácido. Já o soro doce é obtido a partir da coagulação do leite pela adição de renina, resultando em um soro com pH entre 6,2 e 6,4 (ANTUNES, 2003). Os soros analisados neste trabalho eram doces e seu pH pouco diferiu da faixa citada na literatura. Foram avaliados os valores de pH dos soros, com e sem filtração em papel de filtro, para verificar se ocorre a retenção de algum componente; comparando-se os resultados foi observado que tal não ocorre, pois os valores pré e pós filtração não apresentaram grandes variações.

A acidez titulável é uma análise comumente utilizada em derivados lácteos por indicar a pureza e qualidade dos produtos fermentados, além da indicação de deterioração por bactérias com produção de ácido. A acidez em queijos está relacionada à formação de ácido láctico na sua produção, durante a ação do fermento lácteo (CECCHI, 2007). Dentre os soros estudados, foram encontradas pequenas quantidades de ácido láctico nas amostras, indicando que boa parte ficou retida no queijo. Na massa de queijo, a presença de ácido láctico é desejável por contribuir para inibição do crescimento de bactérias, conferindo maior estabilidade quanto à deterioração.

A densidade é outra determinação comumente empregada na avaliação da qualidade de produtos lácteos. Comparando-se com a literatura (LUCENA *et al.*, 2007; VENTUROSU *et al.*, 2007), os valores encontrados na pesquisa são coerentes com os descritos para soros de leite. Ainda com relação às análises físicas das amostras, foi avaliada a viscosidade relativa. A viscosidade é um parâmetro utilizado para caracterizar molecularmente os diferentes materiais fluidos e, em alimentos é tida como uma importante propriedade funcional, que no soro de leite é conferida pelas proteínas nele presentes (FOEGEDING *et al.*, 2002; RADE-KUKIC; SCHMITT; RAWEL, 2011). Do ponto de vista prático, a viscosidade relativa é a razão que define quanto o soro de leite é mais fluido que a água, indicando a maior viscosidade das amostras em temperatura ambiente em relação à água.

O teor de sólidos totais é um parâmetro utilizado para a verificação da concentração total de matéria seca não volátil, ou seja, é a diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo de umidade. Das amostras avaliadas, a maior porcentagem de umidade encontrada foi no soro de queijo tipo Prato e, portanto, a menor concentração de sólidos, e em média, as amostras apresentaram porcentagem de sólidos totais e umidade esperada para soro de leite.

Com relação ao conteúdo mineral das amostras (cinzas), ou seja, o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, observou-se uma fração pequena de minerais nas amostras analisadas, sendo que o soro de queijo tipo Reblochon (cru) apresentou

maiores valores. Entre as demais amostras, não foram observadas grandes variações nos teores de cinza, mantendo-se próximos às porcentagens descritas na literatura.

Por definição, queijo é um produto concentrado proteico gorduroso, resultante da coagulação do leite. É de se esperar, portanto, um baixo teor no conteúdo lipídico do soro de leite, já que boa parte da gordura fica retida no queijo. O conteúdo de gorduras totais nas amostras avaliadas ficou entre 0,2-0,4%, confirmando esta definição. Esta análise foi realizada em laboratório terceirizado e os laudos contendo os resultados não apresentaram os desvios padrão obtidos.

A lactose é um dos sólidos predominantes no soro de leite e é o carboidrato característico da matéria-prima, conferindo um sabor levemente adocicado. A maior porcentagem de lactose, 6,79%, foi encontrada no soro de queijo tipo Reblochon (pasteurizado), sendo que as demais amostras apresentaram conteúdos semelhantes.

É fundamental se caracterizar os diferentes tipos de soro de leite gerados pelas queijarias para que sejam direcionados ao processamento e disposição mais adequados. Análises da composição como sólidos totais, umidade, lipídeos totais, carboidratos, cinzas, além de pH e quantificação de nutrientes específicos como metais (LAYE; KARLESKIND; MORR, 1995; RUBIN, 1980; WALSH *et al.*, 2010) tornam-se necessárias para o estudo dos possíveis destinos do soro de leite.

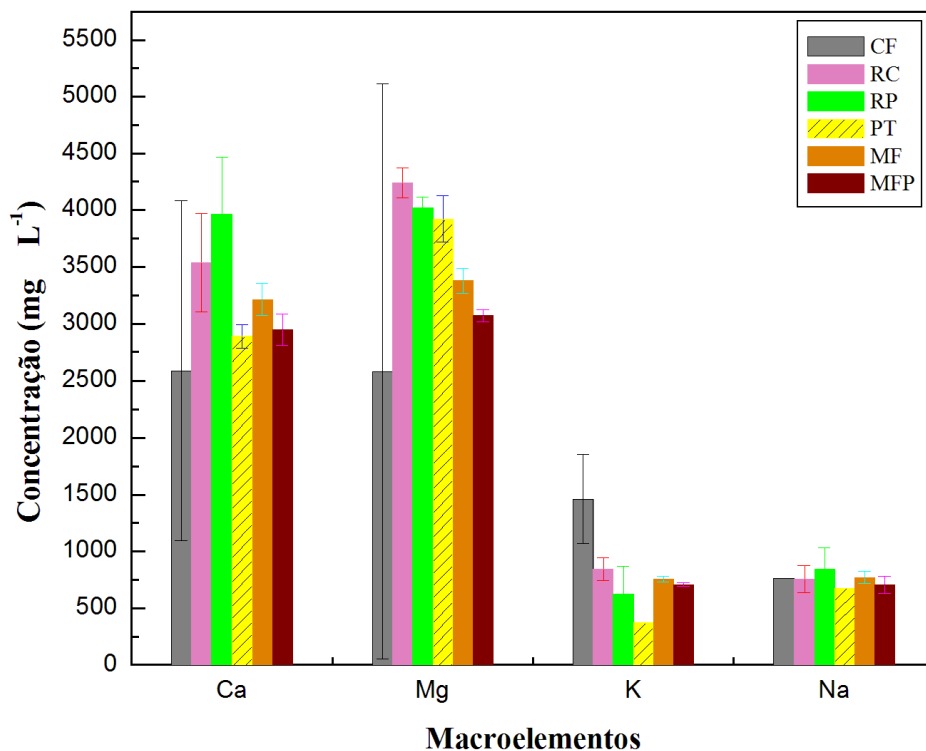
#### 4.2 MACRO, MICROELEMENTOS E ESPÉCIES METÁLICAS TÓXICAS

O soro de leite representa uma importante contaminação inorgânica, pela abundância de determinados tipos de sais e possível presença de metais tóxicos na matéria prima original – o leite (KIRA; MAIHARA, 2007). A contaminação do leite por metais é decorrente da água de consumo dos animais (pelo despejo de águas residuárias industriais) (TEMIZ; SOYLU; 2012) e das pastagens contaminadas pela deposição atmosférica (SOUZA *et al.*, 2009). Esta é incorporada à cadeia alimentar, permanecendo no ambiente e atingindo inclusive os seres humanos (MALHAT *et al.*, 2012). Neste contexto, a quantificação de macro e microelementos e espécies metálicas tóxicas torna-se importante para a verificação da qualidade e salubridade do efluente em estudo, tanto do ponto de vista toxicológico como nutricional (CONI *et al.*, 1996).

As Figuras 7, 8 e 9 apresentam os resultados de caracterização de diferentes tipos de soro de leite em termos de macroelementos (Ca, Mg, Na, K), microelementos (Fe, Cu, Zn) e espécies metálicas tóxicas (Pb, Cd), por fotometria de chama (Na e K) e absorção atômica - modo chama. Os metais Co, Mn e Cr também foram analisados por absorção atômica e

apresentaram concentrações inferiores a 0,0001 ppm, estando abaixo do limite de detecção do equipamento e da técnica utilizada, sendo dados omitidos do trabalho.

FIGURA 7 - Composição média dos macroelementos Ca, Mg, K e Na ( $\text{mg L}^{-1}$ ) nos diferentes tipos de soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado.



Altas concentrações de Ca, Na, Mg e K são esperadas neste tipo de matriz, visto serem elementos fundamentais no processamento de queijos. A adição de Ca é necessária para interação da caseína na formação do coágulo e diminuição da capacidade de retenção de água no queijo e, na produção dos queijos em estudo, resultou em valores muito maiores do metal quando comparados ao próprio leite. Martino, Sánchez e Medel (2000, 2001), na comparação de diversos elementos entre leite integral, desnatado e soro de leite, obtiveram concentração de cálcio variando entre  $443 \text{ mg L}^{-1}$  (em soro) e  $1187 \text{ mg L}^{-1}$  (em leite integral). Este fato comprova que o conteúdo total de Ca tem outras influências além do processo, é também função do pH dos queijos, bem como da concentração de Ca solúvel no leite original durante as etapas de coagulação e cozimento da massa. Sabe-se também que o teor de Ca em derivados lácteos acompanha o teor proteico dos mesmos (quanto maior o teor de proteínas, maior concentração do elemento) (AALTONEN, 2001), o que pôde ser demonstrado pela

maior concentração de Ca no soro de queijo tipo Reblochon (pasteurizado) que por sua vez apresentou maior teor proteico (vide item 4.4) quando comparado aos outros tipos de soro.

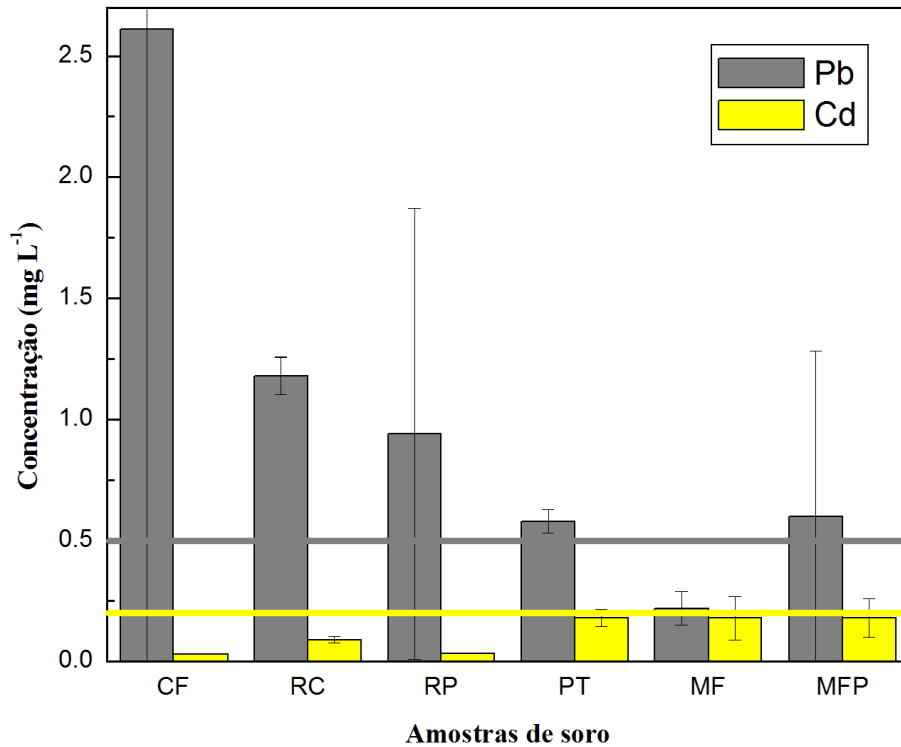
Obtiveram-se para Mg valores ainda maiores na concentração (média de 4250 mg L<sup>-1</sup>, para soro de queijo Reblochon cru). O metal é fundamental na fosforilação oxidativa e também apresenta função de ativação enzimática (SOARES *et al.*, 2010). Em leite, dados na literatura atingiram até 112 mg L<sup>-1</sup>, e comparativamente às amostras analisadas, são cerca de 35 vezes menor.

Espera-se que sejam encontradas altas concentrações também para o Na, visto que para a fabricação de queijo este metal também é adicionado à massa na forma de NaCl, no momento da salga. Entre as amostras estudadas, foi o único metal que não teve variações tão elevadas. Martino, Sánchez e Medel (2000) também investigaram os teores de Na em amostras de soro, encontrando-se concentrações de 429-441 mg L<sup>-1</sup>, valores igualmente menores quando comparados ao seis soros analisados.

A concentração de K de maior destaque foi encontrada no soro de queijo colonial fresco (aproximadamente 1500 mg L<sup>-1</sup>). Atribui-se a variação deste componente principalmente à alimentação animal, visto a adição do elemento no solo na forma de fertilizantes.

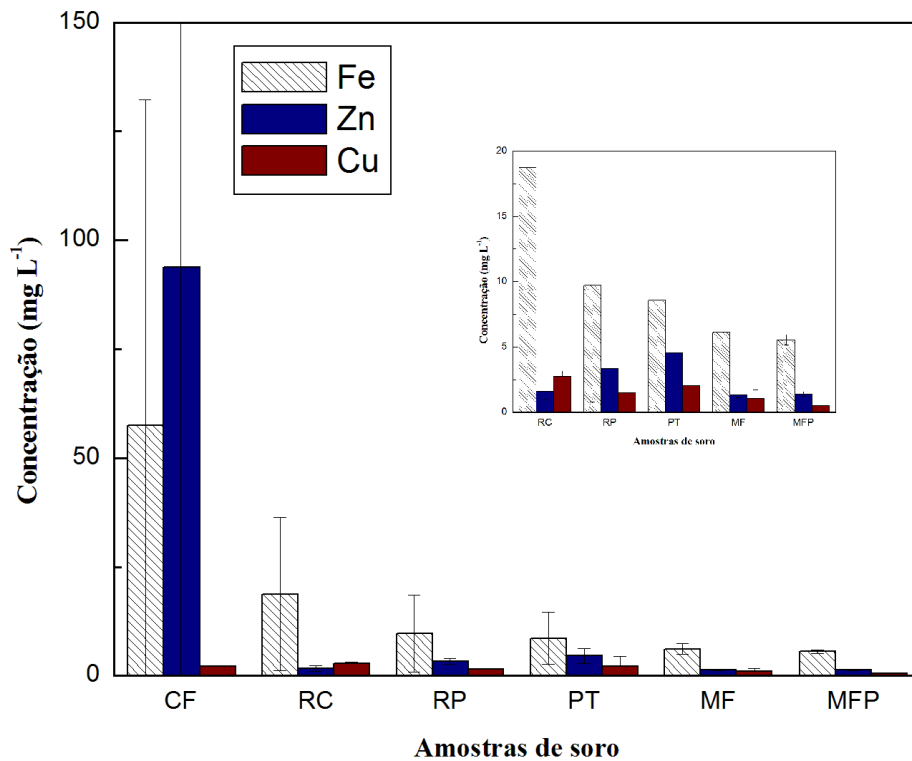
A determinação de macronutrientes em soro identificou valores bastante variáveis, verificando-se que fatores como região, clima, alimentação e saúde do animal, bem como tipo de queijo a ser produzido têm enormes influências na concentração final dos metais. Não há legislação vigente que determine uma concentração máxima dos elementos em efluentes, desconhecendo-se a ação dos mesmos quando presentes em corpos d'água.

FIGURA 8 - Composição média das espécies metálicas tóxicas (Cd e Pb, em  $\text{mg L}^{-1}$ ) nos diferentes tipos de soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. Gráfico em zoom, desconsiderando as barras de desvio padrão.



Com relação aos metais tóxicos, observaram-se altas concentrações de Pb, exceto para o soro de queijo minas frescal, estando inclusive acima do valor permitido pela resolução n° 430/2011 do CONAMA para lançamento de efluentes, de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Já para Cd, os valores não ultrapassaram os limites da legislação ambiental vigente. Altos teores de metais tóxicos têm sido encontrados nas mais diversas amostras (CONI *et al.*, 1994; LICATA *et al.*, 2004).

FIGURA 9 - Composição média de micrelementos (Fe, Zn e Cu, em  $\text{mg L}^{-1}$ ) nos diferentes tipos de soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. Gráfico em *zoom*, desconsiderando as barras de desvio padrão.



Já na quantificação de Zn, Fe e Cu, observaram-se maiores diferenças entre a amostra de soro de queijo Colonial fresco e as demais amostras. Como são fontes distintas da matéria-prima, as discrepâncias são atribuídas principalmente pela diferenciação dos animais, nas características fisiológicas dos indivíduos, bem como no tipo de alimentação fornecida.

Na literatura, podem ser encontradas variações do teor de ferro de  $0,16-1,05 \text{ mg L}^{-1}$  no leite (MARTINO; SÁNCHEZ; MEDEL, 2001; SOARES *et al.*, 2010) e de  $44-62 \mu\text{g L}^{-1}$  em soro de leite (MARTINO; SÁNCHEZ; MEDEL, 2001). Portanto, as concentrações de ferro para as amostras avaliadas são, no mínimo, 35 vezes superior às relatadas em outros estudos.

Exceto quando se compara os resultados com o soro de queijo colonial fresco, teores similares para Zn foram encontrados para soro de leite por Reykdal e colaboradores. Altas quantidades de cobre foram encontradas nos diferentes tipos de soro de leite, sendo, inclusive, superior a quantidade de Cu dissolvido permitida para efluentes pela resolução n° 430/2011 do CONAMA, de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , bem como de outros estudos com leite e/ou soro de leite



(MARTINO; SÁNCHEZ; MEDEL, 2000, 2001; REYKDAL *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2010).

Soro de leite oriundo do processo de obtenção do iogurte Torba, de origem turca, apresentou valores de Cd de  $0,06 \pm 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  e Pb da ordem de  $1,68 \pm 0,37 \text{ mg kg}^{-1}$  pelos estudos de Sanal e Güler (2010). Por outro lado, Yüzibasi e colaboradores (2009) quantificaram, em soros do queijo turco Kasar, teores de Cd variando entre 45,4 e  $138,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , um máximo de  $3,7 \pm 45,9 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  para Pb, Fe entre 2,5 e  $3,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , Zn entre 1,2 e  $2,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $\text{Cu} < 0,02 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , o que salienta a altíssima variação encontrada nas concentrações de macro e microelementos, bem como de espécies metálicas tóxicas na matriz em estudo.

#### 4.3 AVALIAÇÕES AMBIENTAIS DOS DIFERENTES TIPOS DE SORO DE LEITE

Como o potencial poluente do soro de leite é dependente de sua composição físico-química e esta é variável conforme tipo de queijo, tratamento térmico dado ao leite e sua manipulação, além da qualidade original da matéria-prima, pode-se deduzir que determinadas produções de queijo contribuem ainda mais para a poluição ambiental dos corpos d'água. Por isso, foram realizadas avaliações ambientais (incluindo-se DQO,  $\text{DBO}_5$ , nitrogênio e fósforo) para as amostras de soro de queijos Colonial Fresco, Reblochon (a partir de leite cru), Reblochon (a partir de leite pasteurizado), Prato, Minas Frescal e Minas Frescal prensado, com os dados obtidos representados na Tabela 5.

TABELA 5 - Teores de DQO, DBO, Nitrogênio total e Fósforo total em diferentes tipos de soro de leite.

Soro	DQO ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ )	DBO ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ )	Nitrogênio Total ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Fósforo Total ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Colonial Fresco	$101274 \pm 9836$	$248064 \pm 39813$	1400	$168,56 \pm 0,025$
Reblochon (cru)	$92267 \pm 6217$	$169728 \pm 30004$	1500	$151,60 \pm 0,174$
Reblochon (pasteurizado)	$101824 \pm 18722$	$255408 \pm 24811$	1400	$157,57 \pm 0,019$
Prato	$136170 \pm 3099$	148512	1700	$92,31 \pm 0,079$
Minas Frescal	$107975 \pm 26559$	$155856 \pm 5193$	1500	$79,83 \pm 0,067$
Minas Frescal Prensado	$94464 \pm 14314$	$155040 \pm 4616$	1400	$88,14 \pm 0,069$

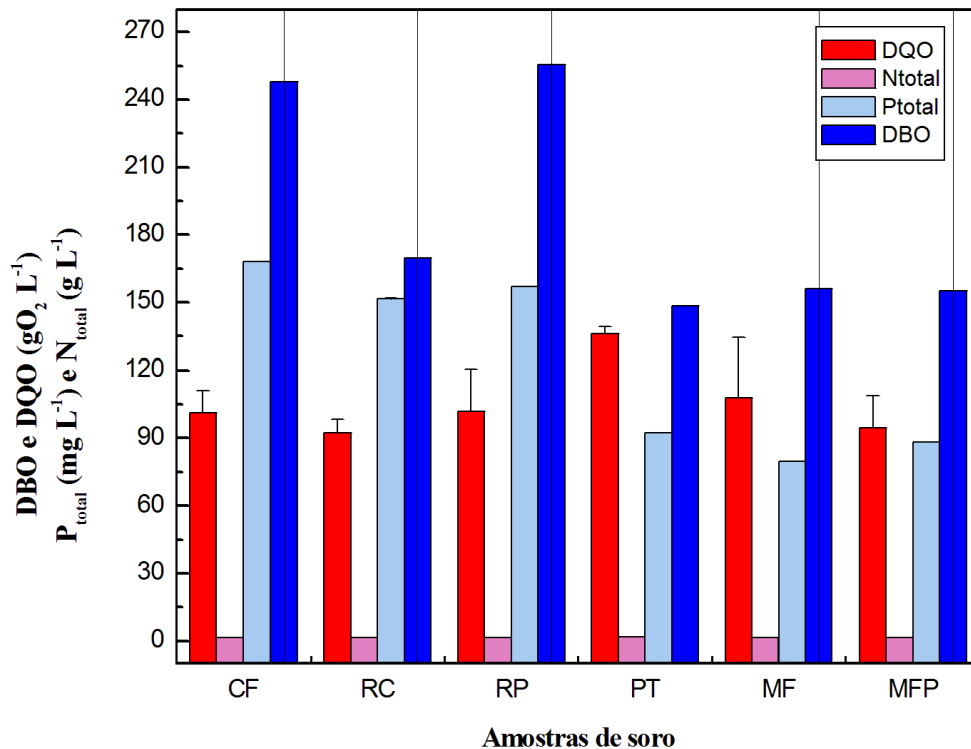
A DQO e  $\text{DBO}_5$  são comumente determinadas em efluentes para fornecer um indicativo do teor de matéria orgânica de uma amostra, e a relação DQO/ $\text{DBO}_5$  indica sua biodegradabilidade. Altas relações DQO/ $\text{DBO}_5$  são fortes indicativos de sua alta recalitrância, ou seja, baixa quantidade de compostos biodegradáveis por rotas anaeróbias

convencionais, dificultando, do ponto de vista operacional, os tratamentos de natureza biológica (JARDIM; CANELA, 2004). O soro de leite é considerado um efluente biodegradável, e dentre as amostras estudadas, a DQO e a DBO<sub>5</sub> foram bastante variáveis, sendo encontrados valores entre 92000-136000 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> e 148500-255000 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente. Güven e colaboradores (2008) relatam que amostras de soro podem apresentar uma DQO de 50000-70000 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, sendo relatados também valores maiores que 86000 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (KARGI; UZUNÇAR, 2012). Para DBO<sub>5</sub>, a faixa descrita em literatura é de 27000-60000 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (GÜVEN; PERENDECI; TANYOLAÇ, 2008; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012), demonstrando que os soros avaliados podem ser tão poluentes quanto se poderia prever para este tipo de rejeito.

As determinações de nitrogênio e fósforo totais são realizadas em amostras de efluentes pois quando presentes em altas quantidades em corpos d'água, estes componentes podem levar à eutrofização e consequente aumento da toxicidade das águas. O valor médio de nitrogênio total nas amostras manteve-se em 1500 mg L<sup>-1</sup>, sendo superior ao teor relatado em literatura, de 812 mg L<sup>-1</sup> (KARGI; UZUNÇAR, 2012). Os teores de fósforo se mostraram bastante variáveis, com valores entre 79-168 mg L<sup>-1</sup>, apresentando-se em menores proporções às relatadas por Kargi e Uzunçar (2012), de 230 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados corroboram o potencial poluidor que o soro de leite representa ao meio ambiente, no que tange aos parâmetros até aqui apresentados.

Buscando uma correlação entre as avaliações, foi construído um gráfico relacionando todas as amostras com os parâmetros em estudo.

FIGURA 10- Comparação entre DBO, DQO ( $\text{gO}_2 \text{L}^{-1}$ ), nitrogênio e fósforo ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) totais em soro de leite. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado. Gráfico em *zoom*, desconsiderando as barras de desvio padrão.



Foi observado que as correlações entre DQO-nitrogênio, DQO-DBO e nitrogênio-fósforo não correspondem a leis de proporcionalidade, ou seja, a concentração de um não interfere nas medidas do outro parâmetro. Entretanto, as medidas de DBO e fósforo aparentemente seguem uma proporcionalidade, em que maiores valores de fósforo na amostra apresentam maiores valores de DBO.

A Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011, complementar à de nº 357/2005, determina que quaisquer efluentes só possam ser lançados em corpos d'água mediante tratamento que atinja uma eficiência de redução mínima de 60% do teor de  $\text{DBO}_{5,20}$ . Ainda, estabelece que efluentes de uma Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) devam apresentar um valor máximo de  $120 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  para o mesmo parâmetro. No caso das amostras aqui analisadas, um tratamento que atendesse à exigência acima, ainda assim liberaria um efluente com valores de  $\text{DBO}_{5,20}$  entre 495 (PT) e 843 (RP) vezes acima do previsto para o rejeito final.

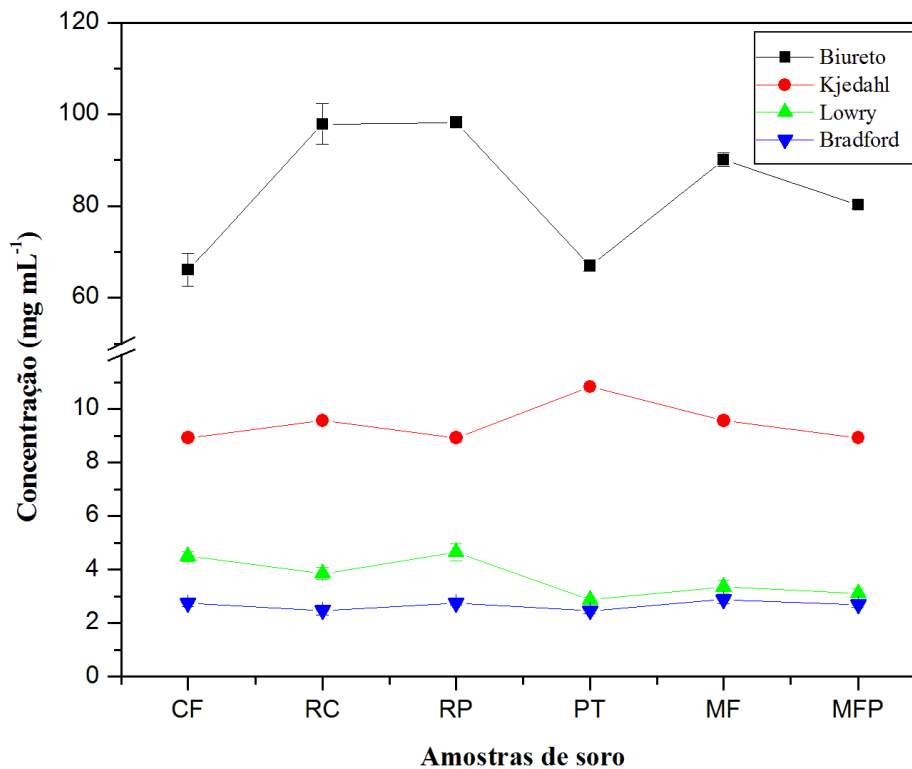
A partir da caracterização do ponto de vista ambiental, percebe-se que o soro de leite é um importante poluente da indústria, comprometendo os recursos hídricos quando neles lançado sem prévio tratamento. A literatura indica que tratamentos convencionais de efluentes ou de tecnologias “end of pipe” (fim da chaminé, na tradução para o português, definido por Kist e colaboradores (2009) como cada processo de produção que resulta em resíduos a serem tratados no final da linha de produção) não são suficientes para reduzir seu poder poluente (BEN-HASSAN; GHALY, 1994; FRIGON *et al.*, 2009; GANNOUN *et al.*, 2008; PERNA *et al.*, 2013; SPACHOS; STAMATIS, 2011). Conhecendo-se sua composição, podem ser estudadas formas alternativas para melhor dispô-lo no meio ambiente, sendo pertinente a investigação da influência da separação de proteínas do soro para diminuição do seu potencial contaminante.

#### 4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas é muito importante e comum para diversas aplicações (OKUTUCU *et al.*, 2007). Em soro de leite, a quantificação proteica é útil para avaliação da recuperação e purificação das proteínas nele presentes (METSÄMUURONEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖM, 2011), na busca por um emprego mais nobre para o rejeito, diminuindo o potencial contaminante e evitando o lançamento deste tipo de efluente em corpos d’água. Existem diversos métodos que possibilitam a determinação da concentração de proteínas (RAUNKJÆR; HVITVED-JACOBSEN; NIELSEN, 1994), mas não existe um método padrão para amostras de soro de leite. Desta forma, tornou-se conveniente a comparação de métodos clássicos de dosagem nas diferentes amostras de soro, dentre eles Biureto, Kjeldahl, Lowry e Bradford.

A Figura 11 apresenta a concentração média de proteína total nos soros de queijo Colonial Fresco, Reblochon (cru), Reblochon (pasteurizado), Prato, Minas Frescal e Minas Frescal Prensado, obtida pelos métodos selecionados, em mg mL<sup>-1</sup>.

FIGURA 11 - Concentração média de proteína total ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) em soro de queijo obtida pelo método de Biureto, Kjeldahl, Lowry e Bradford. CF: Colonial Fresco; RC: Reblochon (cru); RP: Reblochon (pasteurizado); PT: Prato; MF: Minas Frescal; MF: Minas Frescal Prensado.



Concentrações significativamente maiores de proteína total nos soros foram encontradas por Biureto, na faixa de 66 a 98  $\text{mg mL}^{-1}$ . O conteúdo de proteína total encontrado na literatura para soro de leite (ANTUNES, 2003; MIZUBUTI, 1994; REYKDAL *et al.*, 2011; VENTUROSOSO *et al.*, 2007) varia de 8,40 a 9,40  $\text{mg mL}^{-1}$  e, logo, os valores encontrados ultrapassaram em até 10 vezes essa média. Isso se justifica pela presença abundante de um componente interferente do método, a lactose, que devido às propriedades redutoras do carboidrato sobre o Cu, resulta numa interferência positiva (KAMIZAKE *et al.*, 2003; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). Assim sendo, este método não se comporta como o mais indicado para quantificação de proteínas neste tipo de amostra.

Dentre os resultados que mais se aproximaram da literatura, as amostras quantificadas pelo método de Kjeldahl apresentaram os maiores valores (8,93 a 10,84  $\text{mg mL}^{-1}$ ), visto que o método, além do nitrogênio orgânico, contabiliza também lipídeos, carboidratos e pigmentos nitrogenados; ainda assim, é uma técnica prática, econômica, que não contém interferentes, sendo a mais utilizada em amostras de alimentos (CECCHI, 2007). Os valores apresentados

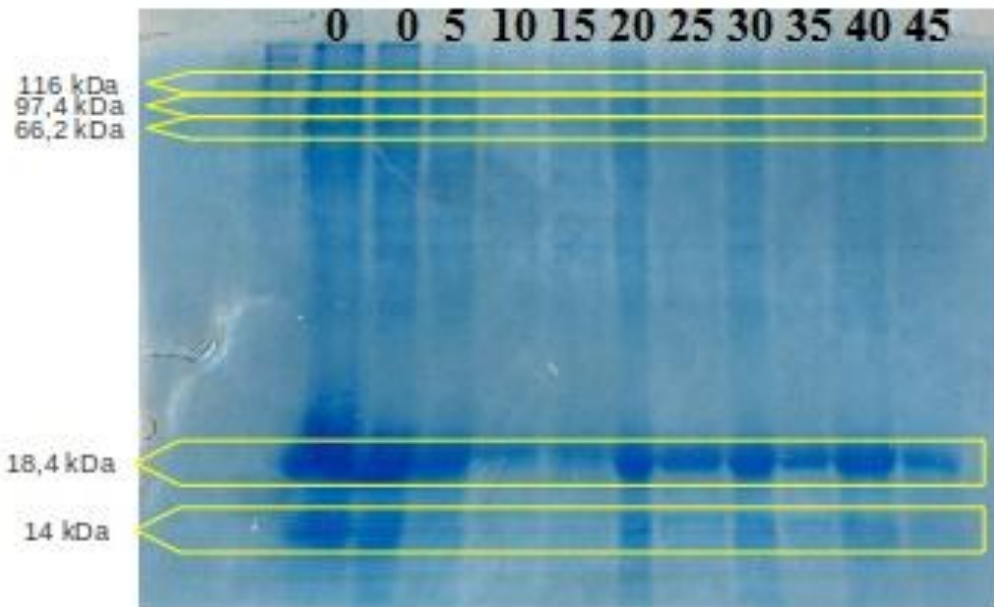
para este parâmetro na Figura 11 não apresentam desvio padrão por se tratar de uma análise realizada em laboratório terceirizado.

O soro de leite inclui em sua composição importantes proteínas como  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e Albumina do Soro Bovino (BSA), como observado na eletroforese da Figura 12. O perfil aminoacídico destas proteínas (METSÄMUURONEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖM, 2011) evidencia a alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada, como leucina, isoleucina e valina (JIMÉNEZ *et al.*, 2012), e baixa concentração dos aminoácidos com cadeia lateral aromática (Tirosina, Triptofano, Fenilalanina), preferenciais na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu no método de Lowry (OKUTUCU *et al.*, 2007; METSÄMUURONEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖM, 2011), subestimando assim o conteúdo proteico das amostras por este ensaio. Além disso, o Ca causa interferência no método (MORRISSEY; WOLTERING, 1989). Em média, a concentração de proteínas encontrada variou de 2,88 a 4,65 mg mL<sup>-1</sup>, sendo o maior valor encontrado para o soro de queijo Reblochon pasteurizado. O método, apesar das interferências, mostrou-se bastante preciso, com desvios padrão pequenos e grande linearidade entre as amostras.

Assim como em Lowry, o corante BG-250 do método de Bradford reage preferencialmente com aminoácidos específicos (arginina e lisina) (METSÄMUURONEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖM, 2011). Por este ensaio, a faixa de concentração proteica em soro foi de 2,47 a 2,87 mg mL<sup>-1</sup>. Portanto, foram contabilizados menores quantidades de proteínas na matriz, apesar de ser um método simples, com poucos interferentes e preciso, sendo mais aplicável em proteínas puras a misturas (RAUNKJÆR; HVITVED-JACOBSEN; NIELSEN, 1994).

Mesmo com uma grande variabilidade da dosagem proteica nas amostras avaliadas de soro de leite, observou-se que para os métodos de Biureto, Lowry e Bradford, o soro com maior concentração de proteínas foi o soro de queijo Reblochon pasteurizado. Desta forma, esta amostra foi escolhida para ser observado o perfil de proteínas encontradas no material por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), bem como para posteriores tratamentos de precipitação de proteínas.

FIGURA 12 - Eletroforese SDS-PAGE em gel 12% de poliacrilamida, amostra de soro de queijo Reblochon pasteurizado, obtida por centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos. Diluições (da esquerda para a direita): 0, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45x. Marcador de massa molecular aplicado na primeira raia, porém não identificado.



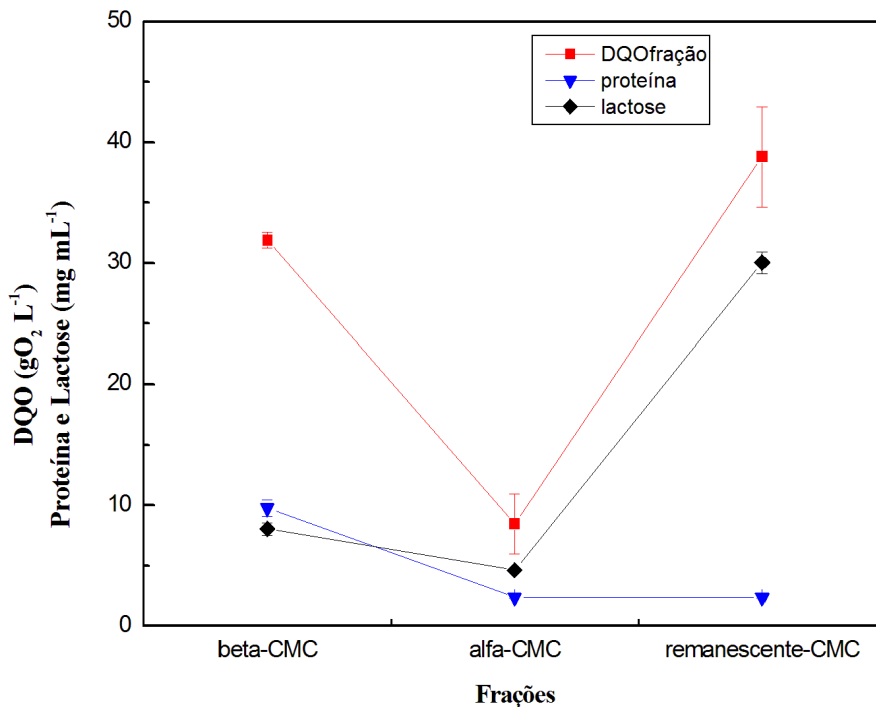
As bandas em destaque confirmam a presença considerável de proteínas tais como:  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa), BSA (66,2 kDa) e às bandas de maior peso molecular é atribuída a presença de imunoglobulinas, encontradas em menor proporção. Por consequência, torna-se plausível o emprego de métodos para precipitação das proteínas do soro de leite, caracterizando-se as diversas frações obtidas e verificando a influência das separações na redução do poder poluente do resíduo.

#### 4.5 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

Dentre os métodos clássicos de separação de proteínas em extratos brutos, optou-se pelos métodos de coacervação com polissacarídeo (CMC), sistema aquoso bifásico (sistema PEG +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), precipitação com ácido tricloroacético, acetona e sulfato de amônio para fracionamentos em soro de leite. Para investigar os efeitos da separação das proteínas na remoção de carga orgânica do efluente e eficiência dos processos, foram avaliados, após as técnicas de precipitação, os parâmetros DQO, lactose e proteínas, tanto nos precipitados como na fração remanescente dos tratamentos. Como descrito anteriormente, apenas o soro de queijo Reblochon pasteurizado foi submetido aos ensaios por apresentar, em média, maior concentração de proteínas.

A Figura 13 apresenta a concentração de proteínas, lactose e DQO das diferentes frações obtidas pela coacervação das proteínas do soro com CMC. A escolha pela concentração de CMC a 0,3% para complexação e precipitação foi devido ao estudo de Capitani e colaboradores (2005) e de Mann e Malik (1996), os quais verificaram maior eficiência do processo nesta condição, pela presença de menores valores de proteínas residuais depois da separação dos coacervados por centrifugação.

FIGURA 13 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das três frações obtidas na precipitação com CMC 0,3% (p/p).



A fração beta-CMC foi assim denominada devido ao pH da precipitação na primeira etapa do fracionamento (pH 4,0) ser abaixo do ponto isoelétrico da  $\beta$ -lactoglobulina (pI 5,2), em que se observa máxima diferença nas curvas de solubilidade de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, esperando-se que ocorra exclusivamente a precipitação da  $\beta$ -lactoglobulina e manutenção de  $\alpha$ -lactoalbumina em solução (HIDALGO; HANSEN, 1971). Pelo mesmo motivo, a fração obtida na sequência é considerada a alfa-CMC, cujo pI da  $\alpha$ -lactoalbumina está na faixa de 4,2-4,5 e o pH ótimo para seletivamente precipitá-la com CMC é de 3,2. A porção remanescente-CMC se refere ao sobrenadante do processo.

Foram observadas grandes diferenças dos parâmetros analisados entre as frações obtidas. A DQO do soro de leite inicial (média de  $101 \text{gO}_2 \text{L}^{-1}$ ) distribuiu-se entre as porções



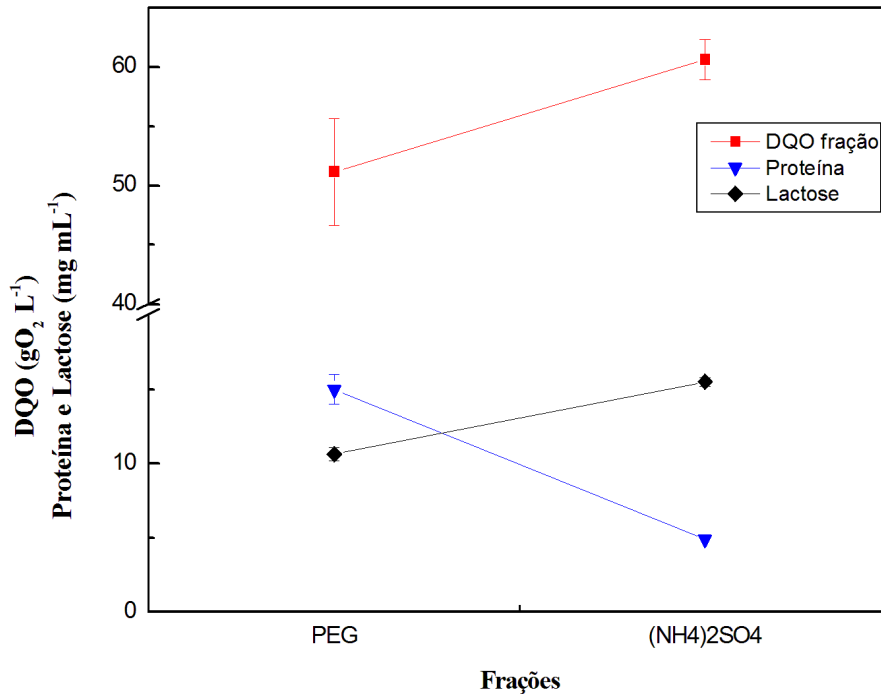
de proteínas e o sobrenadante, permanecendo em maior quantidade na fração remanescente ( $39 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$ , já descontada a contribuição da CMC). Mesmo assim, houve uma considerável redução da matéria orgânica após o fracionamento (60%), além de eficiente separação das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg. Este dado pode ser confirmado pelo maior teor de proteínas na fração beta-CMC, visto que esta é a proteína predominante na amostra, verificando-se inclusive a capacidade de concentração de proteínas pelo método. Pela Figura 13, também se verifica a influência proporcional da lactose sobre a DQO, ou seja, em maiores valores de lactose ocorreram maiores valores para DQO, comprovando que a maior fração da carga orgânica é atribuída ao carboidrato (FRIGON *et al.*, 2009; GÜVEN; PERENDECI; TANYOLAÇ, 2008; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

A literatura indica que a vantagem do emprego do método é que as frações proteicas separadas da matriz podem ser incorporadas em alimentos, conferindo diferentes propriedades funcionais oferecidas pela associação proteína + polissacarídeo e enriquecimento do teor de proteínas (PEREZ *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013). Ou seja, a coacervação das proteínas do soro de leite não apenas tem o potencial de diminuir a contribuição poluente do rejeito, como também possibilita sua valorização.

Os sistemas aquosos bifásicos (ATPS) têm sido amplamente estudados como etapa preliminar em processos de isolamento e purificação de proteínas em diversos materiais biológicos (ALVES *et al.*, 2000). Isto porque apresenta alta capacidade de processamento até mesmo em maiores escalas, sendo principalmente interessante para a pesquisa em soro de leite justamente pelos grandes volumes gerados do efluente (CHEN, 1992). O fracionamento de proteínas pelo método é função de pH do sistema, tipo e concentração do sal (em sistemas polímero-sal), peso molecular do polímero, além da concentração e propriedades das proteínas (como estrutura, hidrofobicidade, peso molecular) (RODRIGUES; VENÂNCIO; TEIXEIRA, 2001), sendo encontradas pesquisas que trabalham com a variação dos diferentes parâmetros, buscando as melhores eficiências do processo.

Para testar o ATPS no soro de queijo Reblochon pasteurizado, utilizou-se o sistema 14% PEG 3350/14%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (p/p) em pH 7,0 (ajustado com tampão fosfato). Foi selecionada esta porcentagem dos reagentes pois na literatura, observou-se que maiores coeficientes de partição (ou seja, melhores separações) foram obtidos nesta proporção de polímero-sal (CHEN, 1992; RODRIGUES; VENÂNCIO; TEIXEIRA, 2001). O monitoramento da técnica pode ser observado pelos valores de DQO, lactose e proteínas das duas frações obtidas, apresentados na Figura 14.

FIGURA 14 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das duas frações obtidas na separação com 14% PEG 3350/14%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (p/p).



Assim como para o tratamento com CMC, a DQO do soro de leite inicial (média de  $101 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ) distribuiu-se entre as frações obtidas, permanecendo em maior quantidade na fração de sal ( $60 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ). A porção PEG apresentou DQO mais baixa, apesar de maior quantidade de proteínas. Teoricamente, a fração PEG retém a  $\beta$ -lactoglobulina, isto porque esta proteína tem maior caráter hidrofóbico que  $\alpha$ -La, apresentando maior afinidade pelo PEG (CHEN, 1992). A redução de matéria orgânica atingiu 50% no máximo, sendo observada, concomitantemente, um aumento da concentração de proteínas razoavelmente distribuídas entre as distintas frações. Verificou-se a influência proporcional da lactose sobre a DQO, ou seja, para maiores valores de lactose ocorreram maiores valores de DQO, assim como no processo de coacervação das proteínas do soro.

Na investigação de tratamentos clássicos de concentração de proteínas, empregou-se a precipitação com os solventes orgânicos TCA 10% e acetona 9:1, monitorando-se os métodos com ensaios de DQO, lactose e proteínas na fração de precipitado e do sobrenadante.

FIGURA 15 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das duas frações obtidas na separação com TCA 10%.

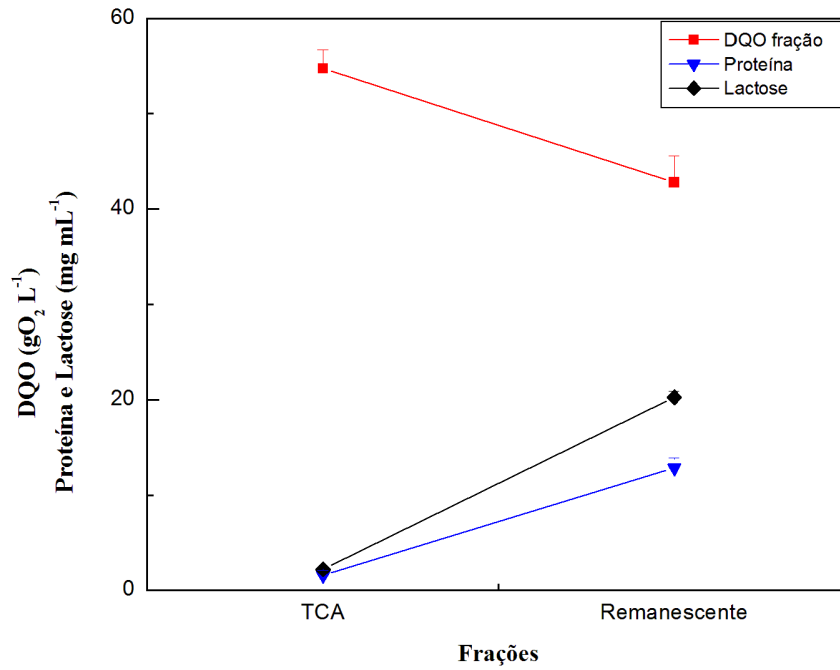
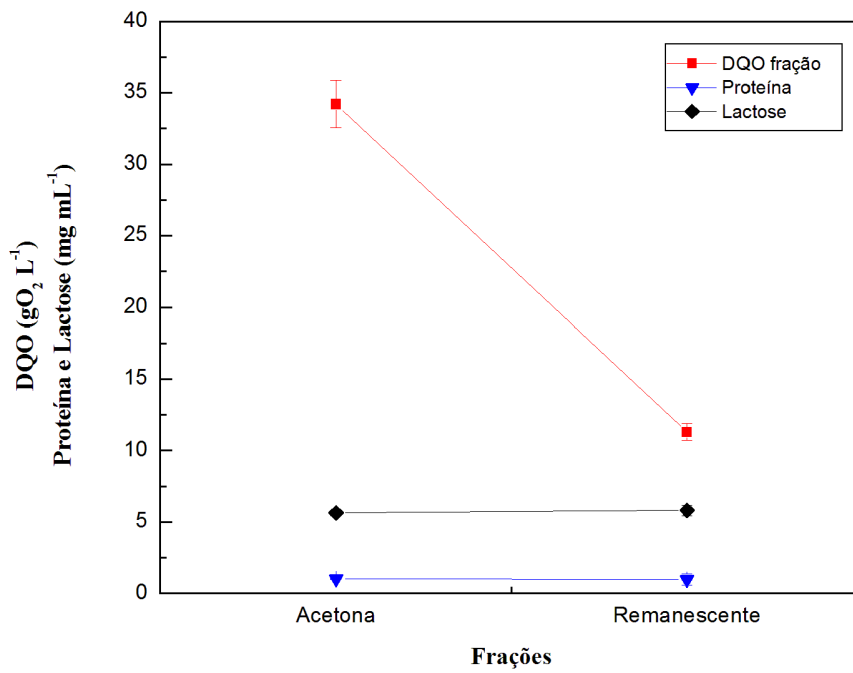


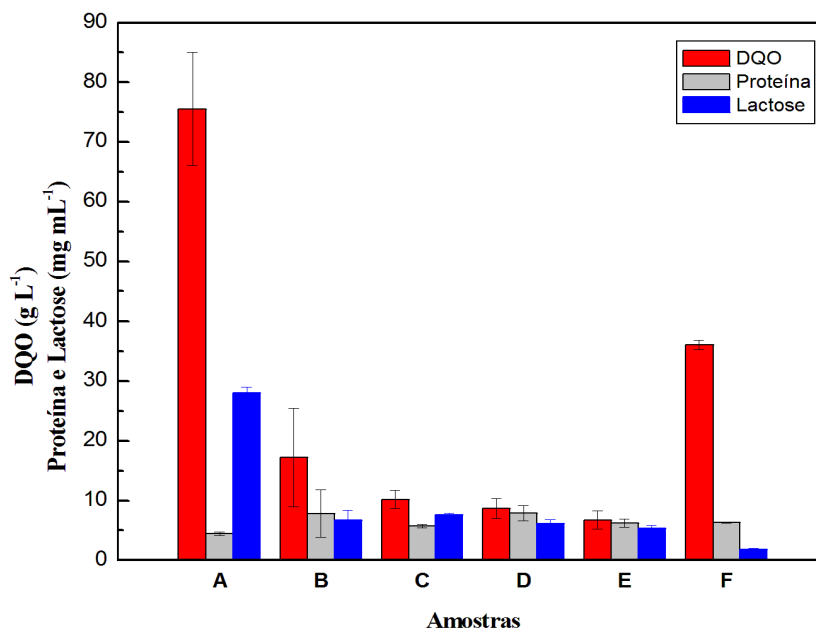
FIGURA 16 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das duas frações obtidas na separação com acetona 9:1.



O comportamento da DQO e proteínas nos ensaios com solventes orgânicos foram bastante distintos quando comparados com os demais tratamentos. A maior DQO, ao contrário do que foi obtido anteriormente, foi encontrada nas frações proteicas e, no método com TCA, o decréscimo da DQO acompanhou o aumento da concentração de proteínas. A precipitação com acetona manteve os valores de lactose e proteínas constantes, além de serem muito inferiores às dosagens do soro total, como também observado para DQO. Desta forma, o emprego de TCA e acetona não foram bons tratamentos, pois grande parte das proteínas foi concentrada no sobrenadante (com TCA), no estado desnaturado, subestimando o conteúdo proteico do soro (com acetona) e impossibilitando o potencial reaproveitamento dos concentrados proteicos. Além disso, não foi observada correlação entre DQO e lactose em ambos os tratamentos, sugerindo o descarte das técnicas para este objetivo.

O último método aplicado para separação das proteínas do soro de leite visando redução de sua carga orgânica foi a precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em saturações de 10, 15, 20 e 30%. Neste teste, o soro de queijo Reblochon pasteurizado passou por filtração prévia em papel de filtro qualitativo, a fim de remover a coalescência presente na amostra no momento do ensaio. A escolha das porcentagens de saturação de sal foi devido ao baixo peso molecular das proteínas do soro, esperando-se melhores separações nestas condições.

FIGURA 17 - DQO ( $\text{gO}_2 \text{L}^{-1}$ ), lactose e proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) das frações obtidas pela precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a partir de 100 mL de amostra. A: Soro total; B: 10% de saturação de sal; C: 15%; D: 20%; E: 30%; F: sobrenadante.

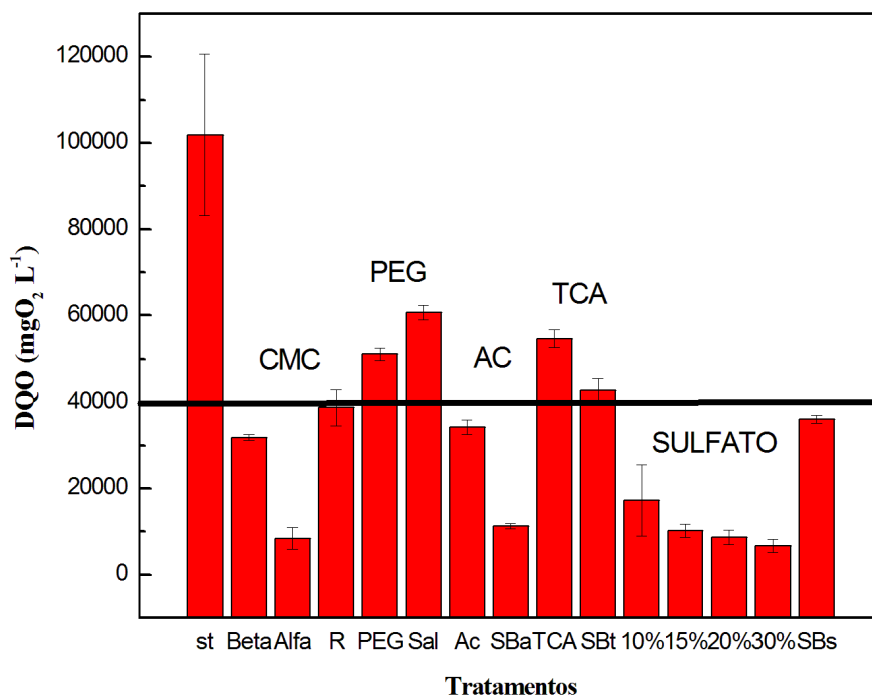


A DQO do soro de leite filtrado (média de  $76 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ) distribuiu-se entre as porções de proteínas e o sobrenadante, permanecendo em maior quantidade na fração remanescente ( $36 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$ ). A redução da matéria orgânica após o fracionamento foi, no mínimo, de 50% no sobrenadante, atingindo maiores remoções nas frações dialisadas. Observou-se que as proteínas foram concentradas em todas as saturações, inclusive no sobrenadante; no que se refere à lactose, observou-se sua distribuição entre as frações e que, assim como na precipitação com solventes orgânicos, não teve relação com os valores de DQO.

O método mostrou-se muito eficiente na separação das proteínas do soro de leite, por apresentar altas porcentagens de remoção de matéria orgânica e capacidade de concentração de proteínas. A desvantagem deste tipo de processo em grande escala aparece com a necessidade de diálise ou de ultrafiltração para remoção de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , encarecendo o processo (JIMÉNEZ *et al.*, 2012).

A Figura 18 mostra, a efeito de comparação, os valores de DQO do soro total, os obtidos nas frações proteicas e nas porções remanescentes dos métodos de separação de proteínas estudados.

FIGURA 18 - DQO ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ ) de soro total, das frações de proteína e sobrenadante dos métodos de separação das proteínas do soro de leite. st: soro total; Beta:  $\beta$ -CMC; Alfa:  $\alpha$ -CMC; R: remanescente CMC; PEG:  $\beta$ -PEG; Sal:  $\alpha$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; Ac: precipitado acetona; SBa: sobrenadante acetona; TCA: precipitado TCA; SBt: sobrenadante TCA; 10 a 30%: precipitado  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturação 10 a 30%; SBs: sobrenadante  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



A linha em  $40000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  faz referência à legislação ambiental vigente que regula os padrões de lançamento de efluentes (Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente), estabelecendo a remoção mínima de 60% da DBO de um efluente a ser lançado num corpo d'água. Os valores obtidos no estudo se referem a DQO das amostras; ao nível de remoção de carga orgânica, é possível fazer equivalência entre os parâmetros, e, como o soro total apresentou DQO de aproximadamente  $100000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ , uma redução eficiente levaria a DQO do efluente a uma faixa de  $40000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ .

O tratamento com CMC demonstrou ser um dos melhores métodos de separação de proteínas, pois além de eficiente na redução da carga poluente, torna-se plausível o redirecionamento do complexo proteína-CMC para enriquecimento nutricional e desenvolvimentos de funcionalidades em alimentos. Desta forma, obtém-se um prévio tratamento do efluente, com valorização de frações do resíduo.

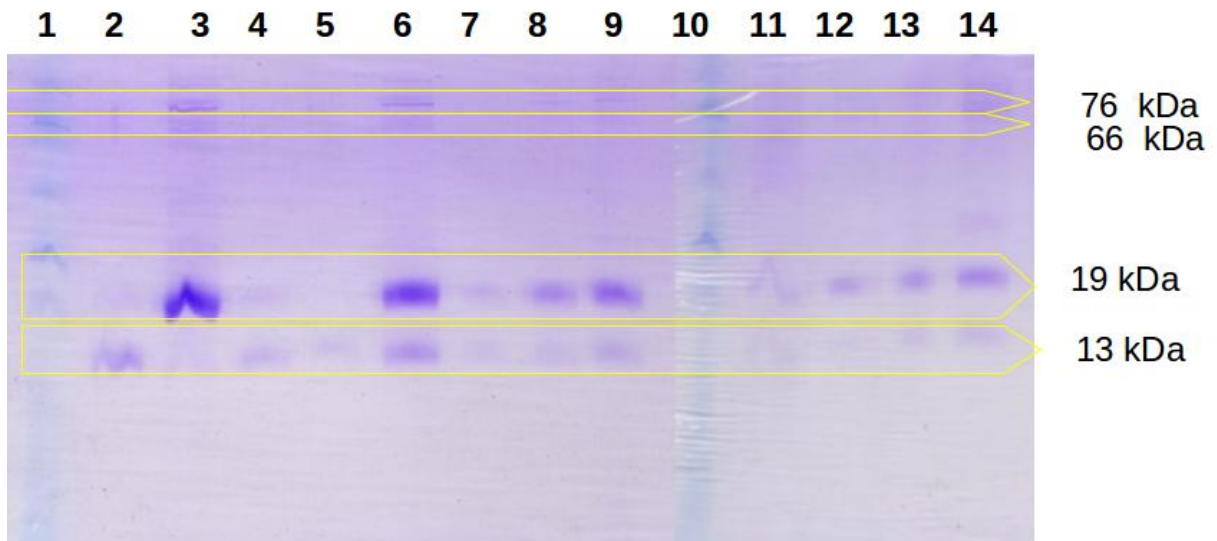
No teste de fracionamento de proteínas com sistema ATPS, observou-se que não houve grandes remoções de carga orgânica. O polímero além de contribuir para o aumento da DQO, requer a sua separação, geralmente por cromatografia de troca iônica, para aproveitamento da proteína isolada, não apresentando vantagens do ponto de vista econômico e operacional.

O uso de acetona na precipitação de proteínas mostrou as desvantagens de requer grande volume de solvente para execução da técnica e ocorrer desnaturação de proteínas, inviabilizando o aproveitamento do concentrado proteico; no entanto, justamente pela ação desnaturante, acarretou uma diminuição razoável do potencial contaminante. Já na precipitação por TCA, observou-se uma redução insuficiente dos teores de DQO.

A precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , método muito utilizado como etapa inicial em processos de purificação de proteínas, mostrou altas reduções de DQO nas frações obtidas. Possui a única desvantagem de necessitar de diálise ou ultrafiltração para obtenção de maior grau de pureza das proteínas alvo, visto que com a remoção do sal, as proteínas podem ser reutilizadas.

Para avaliar qualitativamente a eficiência dos métodos usados para separação das principais proteínas do soro de leite, foi realizada uma corrida eletroforética em gel Tris-tricina 16% com todas as frações proteicas. O gel de Tris-tricina é comumente utilizado para separar proteínas com pesos moleculares entre 1-100 kDa, o que facilita a visualização de bandas em misturas de proteínas de baixo peso molecular (SCHÄGGER, 2006).

FIGURA 19 - Eletroforese em gel Tris-tricina 16% das diversas frações obtidas nos tratamentos de precipitação de proteínas. Dois géis obtidos foram unidos para melhor visualização e comparação dos métodos. Gel A - 1: marcador de massa molecular; 2: fração  $\alpha$ -CMC; 3: fração  $\beta$ -CMC; 4: remanescente CMC; 5:  $\beta$ -PEG; 6:  $\alpha$ -(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 7: precipitado acetona; 8: precipitado TCA; 9: soro integral. Gel B - 10: Marcador de massa molecular; 11: precipitado 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12: precipitado 15% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 13: precipitado 20% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 14: precipitado 30% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Em comparação com a banda de soro integral, o processo de coacervação mostrou um dos melhores resultados no que tange à concentração de proteínas e eficiência na separação. Comprovou-se que a precipitação com polissacarídeo em pH inferior ao pI das proteínas atingiu um alto nível de isolamento proteico, com bandas distintas referentes à  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, com resquícios proteicos na fração remanescente.

O sistema ATPS, por sua vez, não apresentou separações evidentes, sendo que o sal carregou todas as proteínas para sua fase. Atribuiu-se ao ocorrido o fato de que melhores separações das proteínas do soro de leite são obtidas com polímero de peso molecular mais baixo que o utilizado na pesquisa (RODRIGUES; VENÂNCIO; TEIXEIRA, 2001).

Com a acetona e TCA, observou-se a desnaturação proteica provocada pelos solventes, devido às baixas concentrações de proteína confirmadas pela eletroforese. Por outro lado, a precipitação seletiva com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mostrou um aumento gradual da concentração proteica à medida em aumentou a saturação do sal, encontrando-se significativas quantidades de proteínas. Ao contrário do que se esperou, não houve isolamento das proteínas neste processo, ou seja, frações  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina não foram devidamente separadas.

## 5. CONCLUSÃO

Com os resultados de caracterização dos diferentes tipos de soro de leite, observa-se que a matriz apresenta uma composição complexa e variável segundo o tipo de queijo produzido, tratamento térmico dado ao leite e manipulação. Em média, encontrou-se uma caracterização semelhante com a relatada em literatura, confirmando a riqueza nutricional deste subproduto. A análise da composição do soro é imprescindível quando se busca um destino mais nobre para o rejeito.

Cinco das seis amostras estudadas apresentaram valores de Pb que excedem, em muito, o valor de referência estabelecido pelas Resoluções CONAMA 357/2005 e 430/2011, inviabilizando o despejo direto em cursos d'água, sem qualquer tipo de tratamento eficiente.

Os resultados sugerem que os teores de Fe e Zn poderiam ser utilizados como indicadores de diferentes fornecedores de matérias primas, uma vez que as concentrações na amostra da fonte X (soro de queijo colonial Fresco) ultrapassaram em 20 e 3 vezes, respectivamente, os maiores valores obtidos para as amostras cedidas pela fonte Y.

A quantificação de metais corrobora a presença de macro, microelementos e de espécies metálicas tóxicas em soro de leite, confirmando a contribuição inorgânica para a carga poluente deste rejeito industrial e a necessidade da aplicação de técnicas que detectem quantidades ainda menores para alguns elementos.

Nas avaliações ambientais, a caracterização de diferentes tipos de soro de leite corrobora a premissa da variação de sua composição físico-química em função do tipo de queijo, tratamento dado ao leite e manipulação, o que resulta num efluente com valores variáveis de parâmetros como sólidos totais, DQO, DBO<sub>5</sub>, nitrogênio e fósforo total. DQO, DBO<sub>5</sub> e nitrogênio total das amostras analisadas foram superiores em comparação à literatura; em contrapartida, valores menores de fósforo foram detectados. Confirma-se, portanto, que o soro de leite é um importante poluente industrial, podendo comprometer os recursos hídricos quando neles lançado sem tratamento prévio.

Métodos de dosagem de proteínas em soro de queijo tais como Lowry e Biureto possuem interferentes que limitam a confiabilidade dos resultados, como Ca e lactose. Bradford e Lowry, apesar de bastante sensíveis e precisos, necessitam da presença abundante de aminoácidos específicos para uma quantificação proteica confiável, não sendo os mais indicados à matriz em estudo. Mesmo assim, optou-se por dosar proteínas pelo método de Lowry em função do grau de precisão e maior utilização pelo grupo de pesquisa.

Os tratamentos clássicos de separação de proteínas possibilitaram a redução da carga poluente do soro de leite em termos de DQO. O processo de coacervação com CMC e



precipitação seletiva de proteínas com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  possibilitou ainda a separação de importantes frações proteicas, indicando que além de redução de DQO, estes tratamentos viabilizam o reaproveitamento de importantes componentes do soro de leite. Técnicas de precipitação com solventes orgânicos revelaram-se pouco eficientes no fracionamento das proteínas e com TCA, não houve redução satisfatória da carga poluente. O teste de separação proteica com sistema aquoso bifásico PEG-sal também mostrou baixa eficiência, visto que a separação das proteínas foi insatisfatória, além do acréscimo de DQO devido à contribuição exercida pelo polímero sobre a DQO do sistema.

Desta forma, a precipitação de proteínas com CMC e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  revelaram-se como alternativas para o tratamento do soro de leite, com potencial para redução do volume de efluente liberado ao final do processamento de queijos, diminuindo custos e preservando os recursos hídricos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **O maravilhoso mundo dos queijos especiais.** Disponível em: <<http://www.abiq.com.br/imagens/namidia/superhiperjunho2012.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2013.
- ABNT (Associação Brasileira e Normas Técnicas): **NBR 12614.** Águas – Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) - Método de incubação (20°C, cinco dias). Rio de Janeiro, 1992. 5 p.
- AALTONEN, T. Standardisation of the calcium content of whey protein-free milk concentrate. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 2, p. 178-182, 2001.
- ALVES, J. G. L. F.; CHUMPITAZ, L. D. A.; SILVA, L. H. M.; FRANCO, T. T.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 235–239, 2000.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteína do soro de leite bovino.** 1ª edição. São Paulo: Editora Manole, 2003. 135 p.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington: APHA/AWWA, 1998.
- ARANHA, F. Q.; BARROS, Z. F.; MOURA, L. S. A.; GONÇALVES, M. C. R.; BARROS, J. C.; METRI, J. C.; SOUZA, M. S. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. **Revista de Nutrição**, v. 13, n.2, p. 89-97, maio/ago., 2000.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite.** 7ª edição. São Paulo: Livraria Nobel, 1977. 320 p.
- BEN-HASSAN, R. M.; GHALY, A.E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 89-105, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-245, 1976.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais.** São Paulo: CETESB, 1993. 746p.

- BRASIL. **Portaria n° 146, de 7 de março de 1996.** Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 11 mar. 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344>>. Acesso em: 22 jan. 2013.
- BRASIL. **Resolução CONAMA n° 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União, Brasília, 16 maio 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 3 fev. 2014.
- BUND, T.; ALLELEIN, S.; ARUNKUMAR, A.; LUCEY, J. A.; ETZEL, M. R. Chromatographic purification and characterization of whey protein–dextran glycation products. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 98– 105, 2012.
- BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Guide to protein purification.** 2<sup>nd</sup> edition. V. 463. London: Elsevier, 2009. 851 p.
- CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F. L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.
- CARULLI, S.; CALVANO, C. D.; PALMISANO, F.; PISCHETSRIEDER, M. MALDI-TOF MS characterization of glycation products of whey proteins in a glucose/galactose model system and lactose-free milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1793-1803, 2011.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** 2<sup>a</sup> edição. Campinas: Editora Unicamp, 2007. 207 p.
- CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin – Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1229-1240, 2006.
- CHEN, J. P. Partitioning and separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in pEG/potassium phosphate ATPS. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 2, p. 140-147, 1992.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 593-599, 2009.

- CONI, E.; BOCCA, A.; CAPOLELLI, P.; CAROLI, S.; CAVALLUCCI, C.; MARINUCCI, M. T. Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. **Food Chemistry**, v. 57, p. 253-260, 1996.
- ELGAR, D. F.; NORRIS, C. S.; AYERS, J. S.; PRITCHARD, M.; OTTER, D. E.; PALMANO, K. P. Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. **Journal of Chromatography A**, v. 878, p. 183-196, 2000.
- FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 151-159, 2002.
- FRANCO, G. V. E. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 307 p.
- FRIGON, J. C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S. R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4156-4163, 2009.
- GAD, A. S.; KHADRAWY, Y. A.; EL-NEKEETY, A. A.; MOHAMED, S. R.; HASSAN, N. S.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. **Nutrition**, v. 27, p. 582-589, 2011.
- GANNOUN, H.; KHELIFI, E.; BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HAMDI, M. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6105-6111, 2008.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.
- GÜVEN, G.; PERENDECI, A.; TANYOLAÇ, A. Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, p. 69-78, 2008.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2005. 876 p.
- HIDALGO, J.; HANSEN, M. T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, v. 54, p. 1270-1274, 1971.
- HORWITZ, W. **Official methods of analysis of AOAC international**. Volume 2. 17ª edição. AOAC international, 2000.

- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da produção pecuária**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201302\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201302_publ_completa.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2013.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1ª edição digital, 2008. Disponível em: <[http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=20&func=startdown&id=24](http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20&func=startdown&id=24)>. Acesso em: 31 out. 2012.
- JANSON, J. C. **Protein purification: principles, high resolution, methods and applications**. 3<sup>rd</sup> edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. 517 p.
- JARA, F.; PILOSOFF, A. M. R. Partitioning of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 374-380, 2011.
- JARDIM, W. F.; CANELA, M. C. Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos. **Caderno Temático**, v. 1. UNICAMP, Campinas, 2004.
- JIMÈNEZ, X. T.; CUENCA, A. A.; JURADO, A. T.; CORONA, A. A.; URISTA, C. R. M. Traditional methods for whey protein isolation and concentration: effects on nutritional properties and biological activity. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56, n. 4, p. 369-377, 2012.
- KAMIZAKE, N. K. K.; GONÇALVES, M. M.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 507-516, 2003.
- KARGI, F.; UZUNÇAR, S. Simultaneous hydrogen gas formation and COD removal from cheese whey wastewater by electrohydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p.11656-11665, 2012.
- KIRA, C. S.; MAIHARA, V. A. Determinação de elementos essenciais maiores e traço em queijos por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido após digestão parcial **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 446-450, 2007.
- KIST, L. T.; MOUTAQI, S.; MACHADO, E. L. Cleaner production in the management of water use at a poultry slaughterhouse of Vale do Taquari, Brazil: a case study. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. 1200-1205, 2009.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos – teoria e aplicações práticas**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242 p.

- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAVINAS, L. Acessibilidade alimentar e estabilização econômica no Brasil nos anos 90, **IPEA**, Rio de Janeiro, set. 1998, texto para discussão 591. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br/pub/td/td0591.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2013.
- LAYE, I.; KARLESKIND, D.; MORR, C. V. Chemical and volatile organic compounds composition of whey protein concentrate. **Food Flavours: Generation, Analysis and Process Influence**, p. 769-789, 1995.
- LEITÃO, R. C.; VAN HAANDEL, A. C.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1105-1118, 2006.
- LICATA, P.; TROMBETTA, D.; CRISTANI, M.; GIOFRÈ, F.; MARTINO, D.; CALÒ, M.; NACCARI, F. Levels of “toxic” and “essential” metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. **Environment International**, v. 30, p. 1-6, 2004.
- LIMA FILHO, R. R.; POMBO, G. **Aumenta o consumo de queijo no Brasil**. Disponível em: <[http://www.bovinos.ufpr.br/100921\\_Aumenta\\_o\\_consumo\\_de\\_queijo\\_no\\_brasil\\_def.pdf](http://www.bovinos.ufpr.br/100921_Aumenta_o_consumo_de_queijo_no_brasil_def.pdf)>. Acesso em: 24 set. 2012.
- LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, H. L.; LOPEZ, A. M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 33-37, jan-mar, 2009.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCENA, M. E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C.; RIERA, F. A.; ALVAREZ, R. Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates: Production of milk derivatives as a base for infant formulas. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 310-316, 2006.
- LUCENA, M. E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C.; RIERA, F. A.; ALVAREZ, R.  $\alpha$ -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 446-453, 2007.
- MADAENI, S. S.; MANSOURPANAH, Y. Chemical cleaning of reverse osmosis membranes fouled by whey. **Desalination**, v. 161, p. 13-24, 2004.

- MALHAT, F.; HAGAG, M.; SABER, A.; FAYZ, A. E. Contamination of cows milk by heavy metal in Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, p. 611-613, 2012.
  
- MANN, B.; MALIK, R. C. Studies on some functional characteristics of whey protein-polysaccharide complex. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 202-206, 1996.
  
- MARQUES, M. D.; PEDROSA, C.; PIERUCCI, A. P. T. R.; ESTEVES, A. C. Propriedades biológicas das proteínas do soro do leite bovino benéficas à saúde humana. **Ceres**, v. 4, n. 2, p. 87-94, 2009.
  
- MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.
  
- MARTINO, F. A. R.; SÁNCHEZ, M. L. F.; MEDEL, A. S. Total determination of essential and toxic elements in milk whey by double focusing ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, p. 163-168, 2000.
  
- MARTINO, F. A. R.; SÁNCHEZ, M. L. F.; MEDEL, A. S. The potential of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milks. **Analytica Chimica Acta**, v. 442, p. 191-200, 2001.
  
- MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v. 47, p. 195-203, 1994.
  
- METSÄMUURONEN, S., MÄNTTÄRI, M., NYSTRÖM, M. Comparison of analysis methods for protein concentration and its use in UF fractionation of whey. **Desalination**, v. 283, p. 156-164, 2011.
  
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
  
- MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 80-94, 1994.
  
- MORRISSEY, T. B.; WOLTERING, E. A. Sodium oxalate corrects calcium interference in Lowry protein assay. **Journal of Surgical Research**, v. 47, p. 273-275, 1989.
  
- NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger - Princípios de bioquímica**. 3ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002. 1009 p.
  
- OKUTUCU, B., DINÇER, A., HABIB, Ö., ZIHNIUGLU, F. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 709-711, 2007.

- OLISZEWSKI, R.; Van NIEUWENHOVE, C.; GONZÁLES, S.N.; PÉREZ CHAYA, A.B. Identificación e caracterización tecnológica de bacterias acidolácticas aisladas de leche de cabra y quesos artesanales del noroeste argentino. **Revista Argentina de Lactología**, n. 24, 2006.
  
- OSTOJIĆ, S.; PAVLOVIĆ, M.; ŽIVIC, M.; FILIPOVIĆ, Z.; GORJANOVIĆ, S.; HRANISAVLJEVIĆ, S.; DOJČINOVIĆ, M. Processing of whey from dairy industry waste. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, p. 29-32, 2005.
  
- PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.2, p. 333-338, 2005.
  
- PAN, K.; SONG, Q.; WANG, L.; CAO, B. A study of demineralization of whey by nanofiltration membrane. **Desalination**, v. 267, p. 217-221, 2011.
  
- PDB. RCSB Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org>>. Acesso em: 18 fev. 2013.
  
- PEREZ, A. A.; CARRARA, C. R.; SÁNCHEZ, C. C.; PATINO, J. M. R.; SANTIAGO, L. G. Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. **Food Chemistry**, v. 116, p. 104-113, 2009.
  
- PERNA, V.; CASTELLÓ, E.; WENSEL, J.; ZAMPOL, C.; FONTES LIMA, D. M.; BORZACCONI, L.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; ETCHEBEHERE, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 54-62, 2013.
  
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.
  
- PyMol. Disponível em: <<http://www.pymol.org/>>. Acesso em: 18 fev. 2013.
  
- RADE-KUKIC, K.; SCHMITT, C.; RAWEL, H. M. Formation of conjugates between  $\beta$ -lactoglobulin and allyl isothiocyanate: effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 694-706, 2011.
  
- RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 135-156, 2000.



- RAUNKJÆR, K.; HVITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. **Water Research**, v. 28, n. 2, p. 251-262, 1994.
  
- REYKDAL, O.; RABIEH, S.; STEINGRIMSDOTTIR, L.; GUNNLAUGSDOTTIR, H. Minerals and trace elements in Icelandic dairy products and meat. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 980-986, 2011.
  
- RODRIGUES, L. R.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. A. Partitioning and separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1893–1897, 2001.
  
- ROSENBERG, I. M. **Protein analysis and purification**. 2<sup>nd</sup> edition. Boston: Birkhäuser, 2005. 520 p.
  
- RUBIN, J. Production of whey protein concentrates with high solids content. **Desalination**, v. 35, p. 193-199, 1980.
  
- RUIZ, I.; VEIGA, M. C.; DE SANTIAGO, P.; BLÁSQUEZ, R. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. **Bioresource Technology** v. 60, p. 251-258, 1997.
  
- SANAL, H.; GÜLER, Z. Changes in non-essential elements concentrations during Torba yoghurt production. **Akademic Gida**, v. 8, n. 4, p. 6-12, 2010.
  
- SANTOS, M. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fractionation of the major whey proteins and isolation of  $\beta$ -Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 90, p. 133-139, 2012.
  
- SCHÄGGER, H. Protocol Tricine–SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.
  
- SCOTT, R. **Fabricación de queso**. 2<sup>a</sup> edición. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 520 p.
  
- SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e pequenas Empresas. **Estudos de mercado - Queijos nacionais, 2008**. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/\\$File/NT0003909A.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/$File/NT0003909A.pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2013.
  
- SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-química das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n. 8, p. 43-56, 2005.

- SILVA, D. J. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, 1981.
  
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.
  
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
  
- SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins – from “gutter-to-gold”. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.
  
- SOARES, V. A., KUS, M. M. M.; PEIXOTO, A. L. C.; CARROCCI, J. S.; SALAZAR, R. F. S.; IZÁRIO FILHO, H. J. Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraíba region (Brazil). **Food Control**, v. 21, p. 45-49, 2010.
  
- SOUZA, M. V.; VIANNA, M. W. S.; ZANDIM, B. M.; FERNANDES, R. B. A.; FONTES, M. P. F. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1774-1781, 2009.
  
- SOUZA, C. J. F.; ROJAS, E. E. G.; MELO, N. R.; GASPAR, A.; LINS, J. F. C. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 375-381, 2013.
  
- SPACHOS, T.; STAMATIS, A. Thermal analysis and optimization of an anaerobic treatment system of whey. **Renewable Energy**, v. 36, p. 2097-2105.
  
- TEMIZ, H.; SOYLU, A. Heavy metal concentrations in raw milk collected from different regions of Samsun, Turkey. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 4, p. 516-522, 2012.
  
- TONI, J. C. V.; IMAMURA, K. B.; DORTA, C. Reaproveitamento do soro de leite bovino para produção de biomassa por *Kluyveromyces marxianus* 229. **Revista Alimentus**, 2ª Ed., p. 36-57, 2012.
  
- VENTUROSO, R. C.; ALMEIDA, K. E.; RODRIGUES, A. M.; DAMIN, M. R.; OLIVEIRA, M. N. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, 2007.
  
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 1223 p.
  
- VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3ª edição. Belo Horizonte: Segrac, v. 1, 2005.

- WALSH, H.; ROSS, J.; HENDRICKS, G.; GUO, M. Physico-Chemical properties, probiotic survivability, microstructure, and acceptability of a yogurt-like symbiotic oats-based product using pre-polymerized whey protein as a gelation agent. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, 2010.
  
- YORGUN, M. S.; BALCIOGLU, I. A.; SAYGIN, O. Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment. **Desalination**, v. 229, p. 204-216, 2008.
  
- YÜZIBASI, N.; SEZGIN, E.; YILDIRIM, Z.; YILDIRIM, M. Changes in Pb, Cd, Fe, Cu and Zn levels during the production of Kasar cheese. **Journal of Food Quality**, v. 32, n. 1, p. 73-83, 2009.
  
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.