

Meio Ambiente e Sustentabilidade: conceitos e aplicações

ISBN: 978-65-88884-45-4

Capítulo 04

TECNOLOGIAS CROMATOGRÁFICAS PARA APROVEITAMENTO DE SOROS DE LEITE E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Flávia Échila Ribeiro Batista^{a,*}, Ana Carolina Ataíde Silveira^a, Demerson Arruda Sanglard^a, William James Nogueira Lima^a, Bruna Mara Aparecida de Carvalho Mesquita^a

^aCentro de Pesquisas em Ciências Agrárias I (CPCA I), Universidade Federal de Minas Gerais (Campus Regional Montes Claros). Avenida Universitária, 1.000, Bairro Universitário, Montes Claros - MG, CEP: 39.404-547.

***Autor correspondente:** Flávia Échila Ribeiro Batista, Mestre em Biotecnologia. Laboratório de Biotecnologia - CPCA I, Universidade Federal de Minas Gerais (*Campus* Regional Montes Claros). Avenida Universitária, 1.000, Bairro Universitário, Montes Claros - MG, CEP: 39.404-547. laviaechila@yahoo.com.br.

Data de submissão: 19-07-2023

Data de aceite: 25-07-2023

Data de publicação: 19-10-2023


EDITORA
INTEGRAR

10.55811/integrar/livros/3810 

RESUMO

Introdução: O soro de leite, subproduto mais abundante da produção de queijos, é fonte de proteínas com várias propriedades nutricionais, biológicas e funcionais que podem ser utilizadas como matérias-primas de diversos produtos. As proteínas purificadas do soro de leite possuem alto valor agregado e possíveis destinações mais rentáveis para o soro de leite ainda são objeto de estudo. **Objetivo:** Identificar na literatura possíveis metodologias de purificação de *whey proteins*, como também são conhecidas as proteínas do soro de leite. **Métodos:** Trata-se de um estudo de revisão narrativa de literatura, fundamentada em artigos indexados às plataformas de dados Science Direct, Google Acadêmico, Scielo e Periódicos CAPES utilizando os termos de busca: “Proteínas de soro de leite”, “Purificação de proteínas de soro de leite” e “Cromatografia de proteínas de soro de leite”. **Resultados:** A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) é uma técnica em que as biomoléculas de interesse podem ser convenientemente separadas do soro de uma maneira altamente específica e em uma única etapa. Os criogéis são resinas mais acessíveis do que as resinas já comercializadas e podem ser utilizados para a captura de proteínas. **Conclusão:** Este estudo propõe o desenvolvimento de resinas cromatográficas para tornar a purificação de proteínas mais acessível, visando potenciais de produção em maiores escalas.

Palavras-chave: Proteínas do soro; Purificação; Cromatografia.

1 INTRODUÇÃO

O soro de leite, substância líquida derivada da fabricação de queijos, é o subproduto mais abundante das indústrias produtoras de queijo e caseína. Trata-se da porção aquosa que se separa da caseína durante a produção de queijos. Também conhecido como soro de queijo, esse líquido opaco de cor amarelo-esverdeada contém 55% dos nutrientes do leite, além de representar de 80 a 90% do volume total do mesmo. O soro é constituído basicamente de 94 a 95% de água, 3,8 a 4,2% de lactose, 0,8 a 1,0% de proteínas e 0,7 a 0,8% de minerais (ALVES, 2014).

O soro de leite é constituído por lactose, minerais, vitaminas e proteínas com propriedades nutricionais, biológicas e funcionais, que podem ser utilizadas como matérias-primas (ROHLFES, 2011). As principais proteínas presentes no soro são alfa-lactalbumina (α -LA), beta-lactoglobulina (β -LG), imunoglobulina (IgG), albumina sérica bovina (BSA) e glicomacropéptido (GMP). As proteínas menores, porém, de maior valor agregado, são a lactoferrina (LF) e a lactoperoxidase (LPO) devido aos seus benefícios medicinais e nutricionais (DEETH, 2018). As composições do soro podem ser utilizadas como matérias-primas de inúmeros produtos em função de suas diversas propriedades biológicas e funcionais. Além disso, as proteínas do soro lácteo apresentam rica composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais de valor nutritivo (LIMA, 2016).

No entanto, a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) do soro de queijo, como também é conhecido, é alta e seu descarte inadequado é crime de acordo com a lei 9.433/97. Desta forma, as restrições ambientais em relação à disposição do soro, bem como o alto valor agregado de suas proteínas têm incentivado estudos mais aprofundados no que tange o aproveitamento eficaz deste subproduto e que viabilizem melhores purificações e fracionamentos das proteínas de interesse (PRAZERES, 2012).

Nos países desenvolvidos, tais como Estados Unidos e Irlanda, a proporção da utilização do soro do leite para a geração de novos produtos chega a 100% do volume produzido (BIEGER, 2008). No entanto, no Brasil, convive-se com a problemática de minimizar o seu descarte inadequado, caracterizado como crime de acordo com a Lei nº 9.433 de 8 de Janeiro de 1997 (DE MELLO, 2000).

Cerca de 40% do soro do leite produzido no Brasil é descartado de forma inadequada, principalmente pelas pequenas e médias empresas (MARQUARDT, 2011). Quando mal redirecionado, o soro transforma-se em um rejeito industrial nocivo à natureza e pode causar alto impacto ambiental e prejuízos à fauna e à flora. Tal fato ocorre porque sua Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) pode alcançar o valor de 80.000 mg O₂ L⁻¹, o que corresponde a aproximadamente cem vezes mais que a quantia presente em um esgoto doméstico (NUNES, 2018).

Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com a finalidade de encontrar opções para uma melhor utilização do soro do leite (GABARDO; 2011; FLORÊNCIO, 2013). Antes de ter seu valor nutricional estudado, o soro diluído era considerado apenas como produto residual, no entanto, os benefícios nutricionais e de saúde de suas proteínas atraíram grande interesse do mercado nos últimos anos (INGLE, 2018). As aplicações do soro são inúmeras, englobando desde as indústrias alimentícias como bebidas lácteas, misturas secas para condimentos, bolos, panificações, chocolate, cereais e aperitivos até a produção de etanol, fertilizante, entre outros (OLIVEIRA, 2012). Com base no contexto dessas afirmativas, o objetivo deste trabalho foi de buscar na literatura sobre reaproveitamento do soro de leite e possíveis metodologias para a purificação das proteínas presentes em sua composição.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho trata-se um estudo de revisão narrativa de literatura baseada em artigos científicos publicados nas plataformas de dados Scielo, Science Direct, Web of Science e periódicos CAPES. Também foram conduzidos exames de propriedade intelectual de acordo com as normas da Lei de Propriedade Industrial (Lei no 9.279/96). Para a obtenção das informações foram utilizados os sítios do INPI e Thomson Innovation. Não foram encontrados produtos de patentes ou modelos de utilidade desenvolvidos com novas colunas cromatográficas visando a separação específica de proteínas de soro de leite.

A pesquisa começou em março de 2018 com busca no diretório do CNPQ a fim de localizar grupos de pesquisa afins com a temática e termo de pesquisa utilizado foi “SORO LEITE”. Foram encontrados 27 grupos, dentre eles pode-se observar diversidade de áreas de concentração e 164 linhas de pesquisas distintas. Dentre as linhas de pesquisas encontradas apenas 9 delas puderam contribuir com essa revisão, sendo estas: Aproveitamento de soro de queijo; Aproveitamento de resíduos e coprodutos da Agroindústria; Tecnologia de subprodutos e aproveitamento de resíduos agroindustriais; Desenvolvimento de novos produtos lácteos funcionais; Aproveitamento de resíduos e coprodutos agrícolas para desenvolvimento do setor agroindustrial; Aproveitamento de resíduos da indústria de alimentos; Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos; Propriedades e aplicações dos constituintes do soro de queijo e leite e Química e bioquímica de produtos lácteos.

A etapa de busca dos artigos nas plataformas aconteceu entre março de 2020 e julho de 2023. Foram encontrados 11.714 trabalhos contendo ao menos um dos termos de busca: “Proteínas de soro de leite”, “Purificação de proteínas de soro de leite” e “Cromatografia de proteínas de soro de leite”. A seleção foi baseada na leitura dos títulos e resumos que resultaram na escolha de 36 artigos relacionados a temática analisada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Proteínas de soro de leite

As proteínas de soro de leite, também chamadas de *whey proteins*, possuem papel terapêutico na desnutrição, supernutrição, manejo de doenças crônicas, composição corporal e envelhecimento da população e podem ser amplamente utilizadas no auxílio de ganho de massa muscular (DEETH, 2018). As principais proteínas presentes no soro foram descritas a seguir:

(i) α -lactoalbumina - (α -LA) é a segunda maior fração proteica presente no soro do leite. Constitui cerca de 13% das proteínas totais sendo a única fração capaz de se ligar a minerais, como cálcio e zinco. É formada por 123 resíduos de aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 14 KDa. O fato do perfil aminoacídico da α -LA se assemelhar ao do presente no leite humano, permite a recomendação na formulação de produtos para nutrição infantil. As propriedades biológicas dos peptídeos derivados da α -LA são: anticancerígenos, antimicrobiano contra bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (DEETH, 2018).

(ii) β -lactoglobulina - (β -LG) é a proteína mais abundante no soro do leite bovino, ovino e caprino.

Apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada, com cerca de 25,1%. Contendo

162 aminoácidos dispostos em uma cadeia simples de peptídeos, sendo sensíveis a pH ácido e elevadas temperaturas. Apresenta peso molecular entre 18-36 KDa, o que lhe confere resistência à ação enzimas estomacais sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. As principais propriedades biológicas dos peptídeos derivados da β -LG são: anti-hipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, imunoestimulante e hipocolesterolêmico (RENHE, 2008; DEETH, 2018).

(iii) Albumina do soro bovino (BSA) - é um polipeptídeo simples contendo cerca de 582 aminoácidos, com alto peso molecular de 66 KDa. A BSA possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos favorecendo seu transporte na corrente sanguínea, por isto, têm importante papel nas atividades fisiológicas e funcionais. É uma das precursoras da síntese de glutathione, peptídeo que aumenta a atividade imune de indivíduos com HIV, além de conferir atividade anticancerígena (MAJOREK, 2012; DEETH, 2018).

(iv) Imunoglobulinas - estão presentes no leite bovino de várias formas, algumas delas são a IgG, IgA e IgM. A IgG é a principal, constituindo cerca de 80% do total, e a única que permanece presente no leite mesmo depois da fase do colostro. As imunoglobulinas apresentam um elevado peso molecular variando de 15-1.000 KDa. Suas principais ações biológicas residem na imunidade passiva e atividade antioxidante, oferecendo proteção contra infecções, pois, estimulam a produção de linfócitos (HURLEY, 2003; THEIL, 2013; DEETH, 2018).

(v) Glicomacropéptido (GMP) - é um peptídeo derivado da digestão da caseína pela ação da quimosina durante a coagulação do queijo. Apresenta peso molecular aproximado de 6-7 KDa. É um peptídeo com alto teor de aminoácidos essenciais não resistentes ao calor, assim como a mudanças de pH. Apresenta alta carga negativa, que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal. Oferecem proteção contra infecções, pois estimulam a produção de linfócitos, efeito inibidor sobre as secreções de ácido gástrico e atividade imunossupressora (FURLANETTI; PRATA, 2003; DEETH 2018).

(vi) Lactoferrina - é uma glicoproteína multifuncional a qual pertence à família da transferrina. É formada por 689 aminoácidos, com peso molecular variando de 78-80 KDa. Ela é responsável por vários papéis biológicos, como atividade imunomoduladora, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana e com o aumento da absorção de ferro na dieta. Desde a descoberta de suas múltiplas funcionalidades biológicas, a lactoferrina tem sido isolada do leite e soro de leite para uso como produto comercial em formulações. O mercado comercial para a lactoferrina vem se desenvolvendo de forma considerável e deverá aumentar ainda mais nos próximos anos (KORHONEN, 2011; DEETH, 2018).

(vii) Lactoperoxidases - consistem de uma única cadeia polipeptídica contendo 612 resíduos de aminoácidos, tendo peso molecular médio de 78 KDa. Fazem parte da família das peroxidases, grupo de enzimas responsáveis por catalisar a oxidação de 1845 moléculas, responsáveis pela ação antimicrobiana, antioxidante e antiviral, porém, estudos demonstraram que esta enzima pode ser desnaturada quando submetidas a temperaturas acima de 70°C (DEBOER, 2014; DEETH, 2018).

3.2 Estudos para purificação das proteínas do soro de leite

Em busca por métodos cromatográficos de purificação de proteínas de soro de leite na sciELO, foram encontrados apenas dois estudos, um deles apresentou o desenvolvimento de um processo de fracionamento cromatográfico de proteínas de soro de leite usando cátion único UNOsphere S (INGLE, 53

2018). Já o segundo artigo demonstrou efeitos da pressão operacional e da velocidade do fluxo cruzado no desempenho da membrana e nas resistências individuais na microfiltração do soro de leite, tanto para condições estacionárias quanto instáveis, com membranas poliméricas de Poliétersulfona (PES) e Fluoreto de polivinilideno (PVDF) (REZAEI; ASHTIANI, 2014).

No portfólio de artigos mais antigos, (ROJAS, 2004) apresentou a utilização da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) aplicada para purificar as proteínas do soro de queijo α -lactalbumina e β -lactoglobulina nas fases polimérica e salina de sistemas aquosos bifásicos, respectivamente.

Algum tempo depois em seu trabalho de Purificação cromatográfica e caracterização de produtos de glicação de proteína de soro de leite-dextrana (BUND, 2012) demonstra a utilidade da cromatografia de troca catiônica para a purificação em larga escala de proteínas glicadas usando produtos químicos e procedimentos de qualidade alimentar.

Em estudo mais recente, nanopartículas de magnetita revestidas com ácido cítrico e íons Cu^{2+} em diferentes proporções foram empregadas como adsorventes para remoção de proteínas do soro de queijo. As partículas carregadas com proteína foram isoladas por decantação magnética e lavadas com NaCl para conseguir a dessorção da proteína. A análise revelou que a principal proteína na lavagem com NaCl era a β -lactoglobulina. Os materiais aqui desenvolvidos apontaram nova alternativa interessante para recuperação de β -lactoglobulina (NICOLÁS, 2019).

Em seu trabalho (HIRSCH, 2020) mostrou a utilidade de novas matrizes cromatográficas multimodais à base de quitosana para obtenção de lactoferrina (LF) e um isolado de proteína de soro de leite (WPI) diretamente do soro de queijo sem qualquer pré-tratamento.

Na mesma temática, (MACIEL, 2020) propôs uma estratégia de integração de duas operações para a separação e purificação da lactoferrina. O soro doce contendo 0,12 mg/mL de lactoferrina foi submetido à microfiltração para clarificação, seguida de ultrafiltração e diafiltração a fim de reduzir em 10 vezes o volume total com simultânea concentração e pré-purificação da lactoferrina para 1,1 mg/mL. Na segunda operação, a proteína foi purificada por uma cromatografia preparativa baseada em cromatografia de leito expandido de troca catiônica.

Na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) um íon metálico funciona como um ligante de afinidade acoplado a um agente quelante ligado a um suporte. A adsorção de proteínas é baseada na interação entre grupos doadores de elétrons localizados na superfície da proteína e íons metálicos imobilizados presos a um suporte. As porções de aminoácidos, como histidina, cisteína, serina, glutamato, aspartato e triptofano presentes na superfície externa de uma biomolécula, contêm átomos de doadores de elétrons no amino terminal ou nas cadeias laterais e, portanto, têm maior afinidade com o metal de transição, íons como Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} (BONSMANN ;STORCKSDIECK, 2007).

Criogéis são materiais poliméricos, considerados como uma subclasse de monólitos de base orgânica, produzidos a temperaturas abaixo de zero. Eles apresentam boa estabilidade química e biológica e são amplamente utilizados como matrizes na separação de proteínas. A cromatografia com criogel foi testada pela primeira vez pelo grupo de Mattiasson (ARVIDSSON *et al*, 2002), e eles desenvolveram essa técnica em seus estudos de pesquisas subsequentes (KIRSEBOM, 2010;

LOZINSKY, 2012). A preparação de cilindros monolíticos poliméricos é simples e pode ser realizada dentro de colunas cromatográficas, convencionais ou capilares, através da polimerização *in situ* (FARIA *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos envolvendo criogel em IMAC vêm sendo estudados, dentre eles podemos destacar alguns como: cromatografia por afinidade com metais imobilizados sendo usada em colunas contínuas supermacroporosas (monólitos) de criogéis de poli (acrilamida), modificadas com resíduos de ácido iminodiacético, para captura direta de enzimas de homogenados celulares, tais como lactato desidrogenase (ARVIDSSON *et al.*, 2003); Criogéis em IMAC sendo sintetizados e utilizados para a adsorção e separação da imunoglobulina G (IgG) da solução de IgG e plasma humano (BAKSHPOUR, 2016); Captura direta de lactoferrina proveniente de soro de queijo ultrafiltrado em colunas supermacroporosas de criogel com íons cobre (CARVALHO, 2014); dentre outros.

Adsorventes IMAC (matriz com agente quelante imobilizado) podem ser também adquiridos comercialmente. No entanto, o alto custo dessas resinas pode ser um fator limitante para algumas aplicações. Dessa forma, a utilização de colunas de criogel para produção de adsorventes IMAC para a purificação de proteínas de soro de leite pode se mostrar como boa alternativa. Estes são mais acessíveis economicamente do que as resinas já encontradas no mercado já que os reagentes utilizados em sua composição são produtos químicos comuns e de baixo custo (LIAO, 2007).

4 CONCLUSÃO

A cromatografia é uma técnica amplamente aplicada a purificação de proteínas, pois, as substâncias de interesse podem ser convenientemente separadas das matérias-primas brutas de uma maneira altamente específica e em uma única etapa. A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) já é utilizada para a purificação de bioprodutos devido à sua alta especificidade e baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. No entanto, resinas cromatográficas de alto custo pode tornar os processo inviáveis para aplicações em larga escala. Logo, a utilização de colunas de criogel para produção de adsorventes IMAC para a purificação de proteínas de soro de leite pode se mostrar como boa alternativa visando o aproveitamento deste resíduo proveniente da fabricação de queijos.

REFERÊNCIAS

ALVES, Maura Pinheiro et al. Whey: technologies for coproducts production. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.

ARVIDSSON, Pär et al. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002.

ARVIDSSON, Pär et al. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275-290, 2003.

BAKSHPOUR, Monireh et al. [PHEMA/PEI]-Cu (II) based immobilized metal affinity

chromatography cryogels: application on the separation of IgG from human plasma. **Materials Science and Engineering: C**, v. 61, p. 824-831, 2016.

BIEGER, Arlei; DE LIMA, Jandir Ferrera. Empresa e desenvolvimento sustentável: um estudo de caso da Sooro. **Revista da FAE**, v. 11, n. 2, 2008.

BUND, Tejashree et al. Chromatographic purification and characterization of whey protein–dextran glycation products. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 98-105, 2012.

CARVALHO, B. M. A. et al. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

DE BOER, Ruud. **From milk by-products to milk ingredients: upgrading the cycle**. John Wiley & Sons, 2014.

DE MELLO LUCHINI, Adriana. Os desafios à implementação do sistema de gestão dos recursos hídricos estabelecido pela Lei nº 9.433/97. **Revista de Administração Pública**, v. 34, n. 1, p. 123 a 143-123 a 143, 2000.

DE OLIVEIRA, Débora F.; BRAVO, Claudia EC; TONIAL, Ivane B. Soro de leite: um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 64-71, 2012.

DEETH, Hilton C.; BANSAL, Nidhi (Ed.). **Whey proteins: From milk to medicine**. Academic Press, 2018.

FLORÊNCIO, Isanna M. et al. Produção de etanol a partir de lactossoro industrial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1088-1092, 2013.

FURLANETTI, Andréa Maria; PRATA, Luiz Francisco. Free and total GMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 121-125, 2003.

GABARDO, Sabrina; RECH, Rosane; AYUB, Marco Antônio Záchia. Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel spheres: predicting values to be used in immobilized bioreactors. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 56, n. 5, p. 2305-2309, 2011.

HIRSCH, Daniela B. et al. Lactoferrin purification and whey protein isolate recovery from cheese whey using chitosan mini-spheres. **International Dairy Journal**, v. 109, p. 104764, 2020.

HURLEY, W. L. Immunoglobulins in mammary secretions. **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B**, p. 421-447, 2003.

INGLE, Umesh; LALI, Arvind. Development and optimization of a single-step cation chromatographic whey protein fractionation process: Evaluation and comparison of scale-up strategies. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, p. 805-818, 2018.

KIRSEBOM, Harald et al. Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes. **Langmuir**, v. 26, n. 20, p. 16129-16133, 2010.

KORHONEN, H.; MARNILA, P. Lactoferrin. In . W. Fuquay, PF Fox, & PLH McSweeney. **Encyclopedia of dairy sciences**, v. 3, 2011.

LIAO, Yiqun; CHENG, Yangjian; LI, Qingge. Preparation of nitrilotriacetic acid/Co²⁺-linked, silica/boron-coated magnetite nanoparticles for purification of 6× histidine-tagged proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 1-2, p. 65-71, 2007.

LIMA, Fabiana Regina; ROCHA, Larissa de Oliveira Ferreira. Aproveitamento do soro de leite proveniente da produção do queijo do serro para fabricação de doce de leite: viabilidade econômica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 83-93, 2016.

LOZINSKY, Vladimir I. et al. Cryostructuring of polymer systems. Wide pore poly (vinyl alcohol) cryogels prepared using a combination of liquid–liquid phase separation and cryotropic gel-formation processes. **Soft Matter**, v. 8, n. 32, p. 8493-8504, 2012.

MACIEL, Kátia Silva et al. Purification of lactoferrin from sweet whey using ultrafiltration followed by expanded bed chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 251, p. 117324, 2020.

MAJOREK, Karolina A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular immunology**, v. 52, n. 3-4, p. 174-182, 2012.

NICOLÁS, Paula; FERREIRA, María Luján; LASSALLE, Verónica. Magnetic solid-phase extraction: A nanotechnological strategy for cheese whey protein recovery. **Journal of Food Engineering**, v. 263, p. 380-387, 2019.

NUNES, Luane Alcântara et al. O soro do leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 301-326, 2018.

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. **Journal of environmental management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

RENHE, Isis RT. O papel do leite na nutrição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 363, p. 36-43, 2008.

REZAEI, H.; ASHTIANI, F. Zokaee; FOULADITAJAR, A. Fouling behavior and performance of microfiltration membranes for whey treatment in steady and unsteady-state conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 503-518, 2014.

ROHLFES, Ana Lúcia Becker et al. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **Tecno-Lógica**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2011.

ROJAS, Edwin Elard Garcia et al. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. **Process biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1751-1759, 2004.

STORCKSDIECK, S.; BONSMANN, Genannt; HURRELL, R. F. Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. **Journal of food science**, v. 72, n. 1, p. S019-S029, 2007.