

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JAQUELINE PERALTA ROSA**

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE  
DE SORO DE LEITE EMPREGANDO COLORIMETRIA E IMAGENS DIGITAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**URUGUAIANA  
2021**

**JAQUELINE PERALTA ROSA**

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE  
DE SORO DE LEITE EMPREGANDO COLORIMETRIA E IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin

Coorientador (a): Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

**Uruguaiana  
2021**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R36q Rosa, Jaqueline Peralta  
Quantificação de proteínas em suplementos alimentares à  
base de soro de leite empregando colorimetria e imagens  
digitais / Jaqueline Peralta Rosa.  
67 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2021.  
"Orientação: Juliano Smanioto Barin ".

1. Método analítico . 2. PhotometrixPRO. 3. Biureto . 4.  
Proteínas. I. Título.

**JAQUELINE PERALTA ROSA**

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE SORO DE LEITE EMPREGANDO COLORIMETRIA E IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dissertação defendida e aprovada em: 09 de Outubro de 2021.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin

Orientador

UFSM

---

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Rodrigo Cordeiro Bolzan

UFSM



Assinado eletronicamente por **Rodrigo Cordeiro Bolzan, Usuário Externo**, em 14/02/2022, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Juliano Smanioto Barin, Usuário Externo**, em 14/02/2022, às 14:08, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **MARCELO DONADEL MALESUIK, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/02/2022, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0732525** e o código CRC **1DAEDA4F**.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente quero agradecer ao meu orientador, Prof. Dr Juliano Smanioto Barin e a minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva, pela ajuda, paciência e compreensão durante todas as etapas de execução do trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade; a todos os professores do Programa de Pós-graduação, que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal, de aprendizagem e crescimento profissional.

A Universidade Federal do Pampa, que me proporcionou ensino gratuito e de qualidade, meu agradecimento especial a todos os professores que participaram dessa jornada de graduação e pós-graduação.

A toda minha família por terem me proporcionado as melhores oportunidades e estarem sempre comigo, mesmo de longe e aos colegas de laboratório que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Essa dissertação teve por objetivo principal o desenvolvimento e a validação de um método analítico robusto, seletivo e de baixo custo, associado à instrumentação de fácil acesso para realizar a quantificação de proteínas em suplementos alimentares à base de soro de leite. A metodologia empregada foi fundamentada na captura de imagens digitais, utilizando uma câmera de smartphone Motorola G6. A análise de dados ocorreu mediante ao aplicativo PhotoMetrixPRO, em que as imagens capturadas pela câmera do smartphone foram transformadas em sinal analítico pelo aplicativo, em um cenário elaborado para essa finalidade. O método de Biureto foi aplicado para determinar as proteínas nas amostras dos suplementos proteicos, ocasionando a formação de tons violeta na solução reagida, a intensidade da coloração variou de acordo com a concentração de proteínas presente nas amostras estudadas. O volume total, o % do reagente e a distância da câmera do smartphone a placa de análises foram parâmetros estudados na otimização do método proposto, que utilizou o planejamento experimental *Central Composite Design* (CCD) avaliado pelo software Design-Expert. A validação do método ocorreu através das seguintes figuras de mérito: Efeito matriz/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e robustez. Durante a validação do método, este se mostrou linear, preciso, seletivo e robusto. A faixa linear foi estudada nas concentrações de 2 a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos pelo método foram comparados com o método convencional por espectrofotometria no UV-Vis indicando exatidão e valores proteicos adequados aos declarados nos rótulos dos produtos. Dessa forma, o método demonstrou uma excelente atuação nas análises com rapidez, simplicidade e baixo custo, podendo ser empregado com confiabilidade na determinação de proteínas em suplementos isolados e hidrolisados à base de soro de leite, apresentando inúmeras vantagens frente aos métodos convencionais e adequação aos princípios da química verde.

Palavras chave: Método analítico, PhotometrixPRO, Biureto, Proteínas.

## ABSTRACT

This dissertation have had as main objective the development and validation of a robust, selective and low cost analytical method associated with easy-access instrumentation to perform protein quantification in whey-based food supplements. The methodology used was based on the capture of digital images using a Motorola G6 smartphone camera. Data analysis was carried out using the PhotoMetrixPRO application, in which the images captured by the smartphone camera were transformed into an analytical signal by the application, in a scenario designed for this purpose. The Biuret method was applied to determine the proteins in the protein supplement samples, causing the formation of violet tones in the reacted solution, the intensity of staining varied according to the concentration of proteins present in the studied samples. The total volume, percentage of the reagent and the distance from the smartphone camera to the analysis plate were parameters studied in the optimization of the proposed method, which used the Central Composite Design (CCD) experimental planning, evaluated by the Design-Expert software. The validation of the method took place through the following figures of merit: Matrix/selectivity effect, linearity, precision (repeatability and intermediate precision), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy and robustness. During the validation of the method, it proved to be linear, precise, selective and robust. The linear range was studied at concentrations from 2 to 10 mg.mL<sup>-1</sup>. The results obtained by the method were compared with the conventional method by UV-Vis spectrophotometry indicating accuracy and adequate protein values to those declared on the product labels. In this way, the method demonstrated an excellent performance in the analysis with speed, simplicity and low cost, and can be reliably used in the determination of proteins in isolated and hydrolyzed supplements based on whey, thus presenting numerous advantages over conventional methods and adaptation to the principles of green chemistry.

Keywords: Analytical method, PhotometrixPRO, Biuret, Proteins.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados para determinar proteínas por métodos colorimétricos. ....	26
Tabela 2 - Descrição das amostras de suplementos à base de soro de leite e composição de proteínas por porção.....	35
Tabela 3 - Variáveis independentes codificadas.....	41
Tabela 4 - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária.....	50
Tabela 5 - Ensaio de recuperação em suplementos à base de soro de leite. ....	51
Tabela 6- Resultados da determinação de proteínas em suplementos alimentares formulados á base de soro de leite (n = 14). ....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica do sistema RGB.....	29
Figura 2 - Etapas empregadas na metodologia experimental baseada em imagens digitais. ...	34
Figura 3 - Interface do aplicativo PhotoMetrixPRO. ....	37
Figura 4 - Caixa confeccionada para criar o ambiente de luz controlada.....	38
Figura 5 - Caixa confeccionada com abertura circular na parte superior.....	38
Figura 6 - Transferência das soluções padrão de BSA (400 $\mu$ l) e o reagente de Biureto (1400 $\mu$ l) para a placa de análise. ....	39
Figura 7 - Soluções padrão de BSA na presença do reagente Biureto. ....	42
Figura 8 - Curvas de calibração de soluções padrão de BSA.....	43
Figura 9 - Influência de dois fatores: distância (cm) do smartphone à superfície do poço versus % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço.....	45
Figura 10 - Influência de dois fatores: Volume (mL) final do poço versus % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço. ....	46
Figura 11 - Influência de dois fatores: Distância (cm) versus volume final do poço (mL).....	46
Figura 12 - Curvas de calibração preparadas com soluções de padrão de BSA (representados por quadrados verdes) e amostras de suplementos à base de soro de leite (representados por triângulos azuis).....	48
Figura 13 - Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento experimental para estudar a influência de dois fatores nos parâmetros avaliados.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCAA - Aminoácidos de cadeia ramificada (do inglês, *Branched-Chain Amino Acids*)

BSA - Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

CCD - Delineamento Composto Central (do inglês, *Central Composite Design*)

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

LOD - Limite de detecção (do inglês, *Limited of Detection*)

LOQ - Limite de quantificação (do inglês, *Limited of Quantitation*)

NIRS - Espectrometria no infravermelho próximo (do inglês, *Near Infrared Spectrometry*)

R - Coeficiente de correlação

RGB - Vermelho, Verde e Azul (do inglês, *Red / Green / Blue*)

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, *Relative Standard Deviation*)

UPLC-MS - Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida de ultra desempenho (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

WPC - do inglês, *Whey Protein Concentrate*

WPH - do inglês, *Whey Protein Hydrolysate*

WPI - do inglês, *Whey Protein Isolate*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.2 Objetivos.....	16
1.2.1 Objetivo geral .....	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 Soro do leite: um subproduto valioso para a indústria .....	17
2.2 Contaminação e adulteração de suplementos dietéticos à base de soro de leite.....	18
2.3 Um panorama geral sobre a normatização de suplementos alimentares, suas definições e alegações no Brasil .....	20
2.4 Perfil dos consumidores de suplementos à base de soro de leite .....	21
2.5 Métodos analíticos aplicados à quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite .....	23
2.6 Métodos colorimétricos empregados para determinação de proteínas em suplementos à base de soro de leite.....	26
2.7 Metodologia experimental baseada em imagens digitais para quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite .....	28
2.8 Validação de um método analítico: Uma abordagem conceitual .....	31
2.8.1 Seletividade .....	32
2.8.2 Linearidade .....	32
2.8.3 Precisão.....	32
2.8.4 Exatidão.....	32
2.8.5 Limite de Quantificação (LOQ) .....	33
2.8.6 Limite de Detecção (LOD).....	33
2.8.7 Robustez .....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Descrição geral .....	34
3.2 Amostras de suplementos à base de soro de leite.....	34
3.3 Instrumentação.....	36
3.4 Reagentes e Soluções.....	37
3.5 Aplicativo PhotoMetrixPRO .....	37
3.6 Aparato para realização de medidas analíticas .....	38
3.7 Preparação do reagente de Biureto e protocolo de análise das amostras.....	39

3.8	Quantificação de proteínas em suplementos á base de soro de leite mediante ao método convencional: Espectrometria no UV-Vis.....	40
3.9	Otimização dos parâmetros instrumentais e domínio de robustez .....	40
3.10	Validação do método analítico proposto empregando colorimetria e imagens digitais ...	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1	Seleção do canal RGB .....	42
4.2	Otimização do ambiente de captura de imagens digitais por smartphone.....	43
4.3	Otimização das condições experimentais .....	44
4.4	Validação do método analítico .....	44
4.4.1	Efeito Matriz e Seletividade .....	47
4.4.2	Linearidade .....	48
4.4.3	Limite de detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) .....	49
4.4.4	Precisão.....	49
4.4.5	Exatidão .....	51
4.4.6	Robustez .....	51
5.	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS COM A METODOLOGIA CONVENCIONAL: ESPECTROMETRIA NO UV-VIS.....	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas do soro do leite (*whey protein*) resultam do processo da fabricação de queijos (MANN *et al.*, 2021). Diferentes técnicas de separação de proteínas são empregadas no processamento do soro do leite, obtendo três classes de suplementos proteicos: Concentrado (*Whey Protein Concentrate - WPC*), Isolado (*Whey Protein Isolate- WPI*) e Hidrolisado (*Whey Protein Hydrolysate - WPH*), possuindo uma alta concentração de proteínas de alto valor biológico (HINNENKAMP *et al.*, 2021).

Esses suplementos formulados à base de soro do leite, em geral, fornecem aminoácidos essenciais, incluindo os de cadeia ramificada: Leucina, isoleucina e valina (BCAA), apresentando inúmeros benefícios para o organismo atuando no transporte de oxigênio (hemoglobina), como catalizador de reações químicas (enzimas), atuando na contração muscular (actina e miosina), além de controlar e regular hormônios produzidos no organismo (SMITH *et al.*, 2018; DAVIES *et al.*, 2018).

No Brasil, o órgão de controle e normatização desses produtos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por tratar-se de um suplemento alimentar destinado ao consumo deve seguir um regulamento técnico sobre alimentos destinados para atletas. Essa normatização elenca a classificação, as características, os requisitos de composição e de rotulagem de suplementos alimentares permitidos no Brasil (RDC nº 243, 2018).

A adulteração de suplementos proteicos em território nacional pode causar um grande impacto sobre a saúde pública. Uma das estratégias de falsificação utilizada é a substituição de proteína do soro do leite por aditivos artificiais, ocasionando informação de rotulagem fraudulenta. Essa estratégia inapropriada tem por objetivo simular características do produto original, sem modificar a aparência. Outra problemática recorrente é a contaminação não intencional, ocorrendo em etapas da fabricação industrial (ABBAS *et al.*, 2018).

Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos para identificação e quantificação de proteínas nestes suplementos é de extrema importância, pois permite inferir sobre a composição dos produtos e seus nutrientes (BRESTRICH *et al.*, 2018). A literatura dispõe de diferentes métodos analíticos para a quantificação de proteínas, entre eles pode-se mencionar o método de Kjeldahl, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o método de Dumas, a espectrometria no infravermelho próximo (NIRS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (CID-BARRIO *et al.*, 2018). Outro método analítico difundido para a quantificação de proteínas é a espectrometria no UV-Vis, baseado em

medidas de absorção da radiação eletromagnética, nas regiões visível e ultravioleta do espectro (ZOU *et al.*, 2019).

Em contrapartida, a literatura dispõe dos métodos colorimétricos de Biureto, Bradford e Hartree-Lowry, que são uma alternativa analítica promissora para o desenvolvimento de métodos eficientes de análise. Esses métodos têm como característica principal utilizar o composto de proteínas com agentes complexantes, o produto formado absorve na região do visível no espectro eletromagnético (DENHOLM *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2020).

Apesar dos métodos colorimétricos possuírem inúmeras vantagens quando comparados aos métodos analíticos oficiais, como rapidez na análise, baixo custo, baixa utilização de reagentes e diminuição na produção de resíduos, ainda carece de desenvolvimentos para simplificação do procedimento analítico e de maior aderência aos princípios da química analítica verde (ZHENG *et al.*, 2017).

Além disso, os métodos colorimétricos quando associados a imagens digitais são uma importante ferramenta para determinação rápida de substâncias, requerendo apenas a utilização de um dispositivo de captura de imagens, como câmeras digitais ou smartphones. Recentemente, as câmeras de smartphone vêm sendo muito utilizadas, já que os aparelhos possuem alta capacidade de armazenagem de dados e o manuseio dos aplicativos costuma ser simples e fácil (SILVA *et al.*, 2020).

O uso de imagens digitais tem se tornado uma prática cada vez mais acessível, visto o avanço da tecnologia e a diminuição de preço das câmeras digitais acopladas a smartphones (NOWAK *et al.*, 2020). Já os aplicativos utilizados são gratuitos e permitem transformar a informação adquirida a partir de uma imagem digital colorida em sinal analítico, baseado em vários sistemas de cores, entre eles o sistema RGB (*Red-Green-Blue*), formado pelas 3 cores primárias e quando combinadas originam outras cores, definidas através de uma escala numérica, variando de 0 a 255 (NOWAK *et al.*, 2021). Outro sistema de cores disponível na literatura é o CMYK, trata-se de um sistema subtrativo, em contraposição ao sistema RGB, formado pelas cores: *Cyan-Magenta-Yellow-Black* (FU *et al.*, 2020).

Para aquisição de imagens a partir de reações coloridas pode-se empregar os sistemas “*spot-test*” apresentando a vantagem de usar volumes inferiores aos utilizados em métodos analíticos tradicionais, gerando uma menor quantidade de resíduos (HELFER *et al.*, 2017). De acordo com o que foi explanado, esse estudo tem por objetivo principal quantificar proteínas em suplementos formulados à base de soro de leite empregando colorimetria associada a imagens digitais.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Desenvolver uma metodologia utilizando método colorimétrico associado a imagens digitais para quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Definir o reagente a ser utilizado para desenvolvimento da cor e otimizar as condições experimentais da reação;
- Otimizar as condições experimentais referente a amostra para a aquisição das imagens digitais;
- Validar a metodologia proposta nas seguintes figuras de mérito: Efeito matriz/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e robustez;
- Comparar os teores de proteína encontrados neste estudo com os limites estabelecidos por agências reguladoras e com a metodologia convencional por espectrometria no UV-Vis.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Soro do leite: um subproduto valioso para a indústria

As indústrias de laticínios produzem efluentes líquidos, que por sua vez apresentam alta carga orgânica e quando descartados em cursos de água, geram consequências negativas para o meio ambiente (AHMAD *et al.*, 2019). Há décadas atrás, o soro do leite era descartado em rios em quantidades numerosas sem nenhum tratamento para amenizar o impacto ambiental, gerando uma grande poluição em ambientes aquáticos (OSTERTAG *et al.*, 2021).

Em meados dos anos 70, pesquisadores passaram a estudar as propriedades funcionais de suas proteínas, visando aproveitamento desse subproduto, com o objetivo de diminuir seu efeito negativo no meio ambiente (NUNES *et al.*, 2019). O soro do leite possui um elevado valor biológico, englobando aproximadamente 55% dos nutrientes do leite, tornando-se uma excelente fonte proteica para o consumo humano. Sua composição é cerca de 93,6% de água, 0,9% de proteínas, 5% lactose e 1% minerais. Essa composição de nutrientes corresponde respectivamente à fabricação de 1kg de queijo, onde são obtidos 9kg de soro de leite (WU *et al.*, 2021).

Com o passar dos anos e o constante avanço tecnológico o soro do leite deixou de ser visto como um resíduo descartável e passou a ter valor dentro da indústria na elaboração de novos produtos, destacando-se por sua multifuncionalidade e seu alto valor nutricional (ILTCHENCO *et al.*, 2018). Esse subproduto possui inúmeros benefícios para a saúde, reunindo proteínas de alto valor biológico, além de possuir uma excelente digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (CARTER *et al.*, 2021).

Um dos suplementos fabricados a partir desse subproduto são os suplementos à base de soro de leite, que consiste em um concentrado proteico. Para a fabricação do suplemento a indústria recebe o soro do leite que passa por um processo de ultrafiltração, impulsionando a retirada de água por meio de uma membrana semipermeável, sem emprego de calor, preservando todos os nutrientes presentes no soro (MARX *et al.*, 2019).

Atualmente o mercado de produtos nacionais e importados dispõem de três classes de suplementos à base soro de leite (whey protein), sendo eles: Whey protein concentrado (WPC), apresenta na sua composição uma concentração de proteínas que varia de 25 a 89%, reúne outros constituintes presentes no soro, entre eles, carboidratos, lipídios, minerais e lactose; whey protein isolado (WPI) possui na sua composição 90 a 95% de proteínas,

ausência de carboidratos, lipídios e lactose, sendo considerado a classe mais pura do produto e whey protein hidrolisado (WPH), contém na composição uma alta concentração de proteínas de alto valor biológico, ausência de carboidratos, lipídios e lactose. O WPH passa por um processo industrial de hidrólise em que as proteínas são fragmentadas em pequenos peptídeos, fazendo com que o organismo humano absorva esse suplemento de forma mais rápida (CASTRO *et al.*, 2019).

Esses produtos possuem uma forte atuação no mercado da nutrição esportiva, sendo comumente utilizado por atletas de alto rendimento, todavia vem tornando-se popular entre indivíduos que não fazem parte desse nicho, que buscam qualidade de vida e mudanças na sua rotina alimentar. Contudo, sua autenticidade é um problema no Brasil e no mundo, ocorrendo adulteração com substâncias substitutas a proteína, não declarados no rótulo (ANDRADE *et al.*, 2019).

Muitos fabricantes utilizam estratégias inadequadas para baixar o custo, visando auferir seu lucro. Dessa forma, fazem a modificação intencional de suplementos alimentares, adicionando compostos estranhos ao produto, comprometendo a sua qualidade e segurança. Alguns meios são a utilização proteínas de origem vegetal, carboidratos como a maltodextrina, lactose, creatina e soro do leite em pó pulverizado alterando a composição e o grau de pureza, levando profissionais de saúde a erro de prescrição nutricional, comprometendo seus benefícios funcionais (PEREIRA *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-OLIVER *et al.*, 2018).

Por conseguinte, uma abordagem metodológica de análise rápida, acessível e eficiente para testes de rotina disponível a laboratórios de pesquisa científica, órgãos reguladores e para a indústria é imprescindível, impedindo a adição proposital de substâncias estranhas e a contaminação não intencional, assegurando um controle de qualidade aos fabricantes e ao consumidor final (LIMA *et al.*, 2021).

## **2.2 Contaminação e adulteração de suplementos dietéticos à base de soro de leite**

O termo suplemento alimentar é uma expressão genérica, esse termo caracteriza substâncias ingeridas oralmente que contenham nutrientes capazes de complementar a alimentação diária, esses suplementos são comumente comercializados na forma de pó, géis, líquidos e são derivados de aminoácidos, proteínas, entre outros (MORTON *et al.*, 2018).

Na atualidade a utilização de suplementos alimentares tem crescido exageradamente, em especial o aumento do consumo de produtos proteicos formulados à base de soro de leite. Em contrapartida a isso, existe uma gama de produtos que são contaminados e adulterados, principalmente com substitutos das proteínas de alto valor biológico por substâncias com valor de mercado menor e adição de hormônios esteróides anabolizantes e estimulantes do sistema nervoso central (SNC). Esse fato se deve a fragilidades existentes na legislação brasileira, que não está bem elucidada e um controle de qualidade ineficaz (LIMA *et al.*, 2021; CASTRO *et al.*, 2019).

Em um estudo realizado por Garrido *et al* (2016), foram avaliadas fontes proteicas de 16 amostras de whey protein concentrado (WPC) e isolado (WPI), adquiridos no comércio brasileiro, fabricados com soro de leite bovino, utilizando proteômica baseada em espectrometria de massa (FERRARIS *et al.*, 2020). Através deste método analítico os autores constataram 523 tipos de proteínas, com 22 réplicas de proteínas. O número total de proteínas identificadas e quantificadas foi 211.

Em 10 amostras foi detectada a proteína do soro de leite bovino, estando de acordo com a rotulagem. Nas outras 6 amostras foram encontradas outras fontes proteicas em abundância, constatando contaminação do produto durante etapas da fabricação. Outro dado relevante identificado foram os baixos níveis de  $\beta$ -lactoglobulina, indicando uma possível adição de leite integral como substituto da proteína isolada e hidrolisada (GARRIDO *et al.*, 2016).

O que chama a atenção nesse estudo é o fato dos consumidores não receberem um produto de acordo com o valor que pagam, ou seja, um suplemento com proteínas de soro de leite bovino. Em 37,5% das amostras estudadas não foram detectadas proteínas de alto valor biológico, apontando a necessidade do controle de qualidade eficaz (MARX *et al.*, 2018).

Em outro estudo realizado por Alaedini *et al.* (2021) foram investigados 30 suplementos esportivos à base de soro de leite e albumina, objetivando averiguar a presença dos hormônios anabólicos metiltestosterona e 4-androstenediona. O método analítico empregado foi por espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida de ultra-desempenho (UPLC-MS) com ionização por eletrospray (ESI).

Nesse estudo, foi detectada a presença de 4-androstenediona em 36,67% das amostras, totalizando 11 contaminadas e ausência de metiltestosterona. A presença desse hormônio esteroide é considerada uma adulteração, podendo atuar na melhora da *performance* esportiva indevidamente, violando regras esportivas e comprometendo a saúde do atleta (ALAEDINI *et*

*al.*, 2021). Além disso, aproximadamente 10 milhões de brasileiros utilizam o produto como recurso ergogênico, podendo levar ao desenvolvimento de diversas patologias a longo prazo (DWYER *et al.*, 2018).

Em que pese à utilização de suplementos proteicos estar muito difundida visando o complemento da alimentação, alguns pesquisadores compreendem que substâncias estranhas ao produto não indicam melhorias no desempenho esportivo ou a saúde, podendo ser prejudiciais em ambos os aspectos mencionados (PEREIRA *et al.*, 2018; XUE *et al.*, 2020).

### **2.3 Um panorama geral sobre a normatização de suplementos alimentares, suas definições e alegações no Brasil**

No Brasil o órgão de controle e regulamentação de suplementos alimentares é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), todavia até meados de 2018 não havia uma normatização específica para suplementos no país, essa categoria ficava dispersa entre as normas técnicas para alimentos e medicamentos, possuindo uma estrutura desatualizada e fragmentada, atribuindo um cenário desfavorável para a indústria da suplementação e os órgãos reguladores (DASHTI *et al.*, 2019).

A partir de 26 de julho de 2018, ocorreu um marco regulatório e o Brasil passou a dispor da resolução única RDC n° 243, estabelecendo requisitos sanitários de suplementos alimentares. Essa legislação específica os requisitos para a composição, qualidade, segurança e rotulagem de suplementos. Compreende-se por suplementos alimentares os produtos consumidos por via oral, apresentados em formas farmacêuticas destinadas a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes isolados ou combinados (PEI *et al.*, 2018). A norma técnica elenca os constituintes permitidos para uso na composição do produto e de rotulagem complementar. Fica vedado o uso de substâncias químicas de doping, medicamentos com controle especial e óleos e gorduras hidrogenados (DASHTI *et al.*, 2019).

No que tange os constituintes ricos em nutrientes, ficou estabelecido como critério usar as seguintes referências: Farmacopeia Brasileira; para utilização de Farmacopeias estrangeiras seguir os critérios estabelecidos pela RDC n° 37, de 6 de julho de 2009 e suas atualizações; Código Alimentar (Codex Alimentarius); Comitê Conjunto de Especialistas FAO/OMS acerca de aditivos alimentares (Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA); Código de Produtos Químicos Alimentares (Food Chemicals Codex – FCC); Compêndio de Suplementos Alimentares da USP (USP Dietary Supplement

Compendium - DSC) e Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos (European Food Safety Authority - EFSA) (RDC nº 243, 2018).

A RDC nº 243 de 2018 também preconiza que a rotulagem dos suplementos deve apresentar a designação do produto, acrescentando os nomes individuais dos nutrientes, englobar as categorias dos nutrientes e o nome da fonte que foi extraída o nutriente. A identificação deve ser declarada próxima à marca do produto, destacada de forma legível com caixa alta, negrito e cor constante com o fundo do rótulo.

Essa regulamentação está em vigor desde 2018, no que pauta limites mínimos e máximos os fabricantes devem elaborar seus produtos seguindo recomendações diárias de consumo para os respectivos públicos alvos indicado pelo fabricante. Além disso, os suplementos devem ser desenvolvidos e elaborados com garantia da manutenção de suas características até o prazo final de validade, levando em consideração instruções de conservação e modo de preparo descrito no rótulo do produto (MOLIN *et al.*, 2019).

As exigências estabelecidas devem ser asseguradas por meios de estudos científicos de estabilidade e controle de qualidade, o descumprimento da norma técnica constitui infração sanitária (RDC nº 243, 2018).

#### **2.4 Perfil dos consumidores de suplementos à base de soro de leite**

Nos últimos anos, o ramo da suplementação à base de soro de leite, tem crescido de forma exponencial a nível mundial, os consumidores buscam os *e-commerces* para encontrar as melhores proteínas disponíveis. Os principais compradores desse mercado são atletas de fisiculturismo, praticantes de atividade física e indivíduos com deficiência de proteínas em sua alimentação (GARTHE *et al.*, 2018).

Entre os produtos mais buscados desse ramo, quem ganha destaque são os suplementos à base de soro de leite, que se tornou um clássico dos suplementos alimentares. As mídias sociais exercem forte influência sobre os consumidores e a compra facilitada no comércio varejista alavanca esse setor em ascensão. Entre os anos de 2010 a 2016 ocorreu um aumento de 233% do consumo de suplementos alimentares pela população brasileira, ocasionando um faturamento de 1,49 bilhão de reais para esse mercado no Brasil (HALLAK, 2020).

Os suplementos à base de soro de leite são categorizados como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considerado uma proteína de rápida absorção e

digestibilidade, uma vez que apresenta um excelente perfil de aminoácidos essenciais (SÁNCHEZ-OLIVER *et al.*, 2019). O produto possui na sua composição os BCAA (*Branched Chain Amino Acids*), o termo é atribuído à presença de três aminoácidos de cadeia ramificada: Leucina, isoleucina e valina, que estão diretamente relacionados ao bom desempenho físico, atuando na aceleração da recuperação de lesões musculares, por meio da prevenção do catabolismo muscular provocado pelo excesso de esforço físico, além de ser uma boa fonte energética quando ocorrem quedas glicêmicas em exercícios prolongados (BERGIA III *et al.*, 2018).

Sua utilização por atletas comumente ocorre no fisiculturismo, geralmente sua recomendação é realizada por nutricionistas ou médicos especializados seguida de uma avaliação nutricional. Essa categoria esportiva objetiva formas corporais bem definidas, delineadas e simétricas (ROBERTS *et al.*, 2020). Para conseguirem resultados estéticos positivos, com máximo de hipertrofia muscular e o mínimo de gordura corporal, os atletas fazem uma combinação de alimentação balanceada e suplementação bem controlada, prescrita com orientação dietética individualizada (GARTHE *et al.*, 2018).

Essa estratégia nutricional comumente é utilizada por profissionais de saúde visando alcançar necessidades proteicas que podem chegar a 2,0 g/kg/dia de proteínas para esse público devido ao seu alto nível de treinamento e fadiga muscular (MORTON *et al.*, 2018). Suas principais funções dentro de um contexto alimentar do atleta é aumentar as reservas energéticas, elevar a mobilização de substratos para o músculo e aumentar o anabolismo proteico (KARPIK *et al.*, 2020).

Outros consumidores desse mercado de suplementos são frequentadores de academias, clubes e escolas de esportes. Na maioria das vezes, a recomendação de uso para esses indivíduos é realizada por outros profissionais, como educadores físicos e profissionais da área de marketing de nutrição esportiva. Normalmente, esse público associa o uso de suplementos à base de soro de leite a programas de treinamento, especialmente treinos de musculação, buscando uma satisfação estética, com redução de percentual de gordura e aumento de massa magra (CASTRO *et al.*, 2019).

Essa conduta causa preocupação, visto que o uso inadequado deste produto pode provocar prejuízos à saúde do consumidor, além de aumentar gastos com a saúde pública (CAMARGO *et al.*, 2020). Seu uso em quantidades e finalidades ainda está controverso na literatura, estudos com atletas evidenciam reduzir o estresse muscular causado por exercícios intensos, repor perdas, complementar a dieta e desenvolver a *performance*, entretanto, pouco

se sabe acerca de sua utilização e resultados em indivíduos praticantes de atividades físicas diárias ou mesmo em indivíduos sedentários (LIMA *et al.*, 2021).

Todavia, os suplementos à base de soro de leite são muito procurados e não são restritos somente para atletas, a popularização rápida levou a uma expansão acelerada, existe uma gama de marcas nacionais e importadas disponíveis em um mercado ávido.

Em suma, esses suplementos estão disponíveis para todos os indivíduos que queiram usufruir dos seus benefícios funcionais. No entanto, a recomendação é sempre buscar orientação de um especialista habilitado, pois cada consumidor possui suas particularidades e suas necessidades proteicas específicas individuais (LECH, 2020).

## **2.5 Métodos analíticos aplicados à quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite**

A avaliação de um método analítico é uma etapa fundamental em procedimentos de qualidade e integra Boas Práticas em rotinas de Laboratórios de Pesquisa, garantindo que o método empregado, esteja de acordo ao que se propõe, identificando ou quantificando o analito de interesse (STANLEY *et al.*, 2019).

A literatura dispõe de inúmeros métodos analíticos para quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite, no entanto, os mais utilizados são: O método de Kjeldahl, a espectrometria no ultravioleta e no visível (UV-VIS), a espectrometria no infravermelho próximo (NIRS) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Através desses métodos analíticos é possível obter as características da matriz alimentar, em termos de composição e nutrientes (FALLER *et al.*, 2019).

O método de Kjeldahl é o método analítico oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). Trata-se de um método bastante utilizado pela sua confiabilidade, permitindo a determinação indireta de proteínas em inúmeras amostras biológicas, ocorrendo em três etapas: Digestão, destilação e titulação (BURKE *et al.*, 2021).

O método de Kjeldahl é fundamentado na decomposição de matéria orgânica por meio da digestão da amostra em uma temperatura de 400°C na presença de ácido sulfúrico concentrado, adicionado de sulfato de cobre como catalisador, intensificando a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio existente na solução ácida resultante é determinado pela destilação através do arraste a vapor, finalizada em titulação com o ácido diluído (STANLEY *et al.*, 2019).

Esse método analítico é aplicável a todo tipo de amostra, é um procedimento relativamente simples, de baixo custo e preciso. Entretanto, apresenta desvantagens, visto que determina o nitrogênio orgânico total da amostra, e não apenas o nitrogênio das proteínas. Além disso, a obtenção dos resultados é relativamente demorada e para sua execução são utilizados reagentes químicos altamente corrosivos (CENCI *et al.*, 2020).

Outro método analítico bem elucidado para análise de proteínas é a espectrometria no ultravioleta e no visível (UV-VIS). As medidas são obtidas através da absorção da radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta e visível no espectro, medindo a luz absorvida pela amostra, associando a mesma com a concentração do analito (BERNARDO *et al.*, 2021). A radiação eletromagnética é caracterizada pelo comprimento de onda, frequência e amplitude. A região do UV apresenta a frequência mais alta tem seu comprimento de onda em 400 nanômetros, já a região do Vis corresponde ao comprimento de onda no intervalo de 400 a 800 nanômetros (ZAHRA, 2019).

Inúmeros benefícios corroboram para sua popularidade, o mais importante é o fato de ser um método quantitativo, associado a isso, apresenta baixo custo operacional, fácil aplicação e fornece resultados imediatos e com interpretações simples (SAFDARIAN *et al.*, 2021). Contudo, demonstra suas limitações, em amostras complexas, muitas substâncias apresentam absorção na região ultravioleta, mostrando resultados com grande variabilidade (PASSOS *et al.*, 2019).

Em contrapartida, os compêndios abrangem a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), na qual a luz refletida de um material amostrado na região do infravermelho próximo ao espectro eletromagnético é avaliada (GUO *et al.*, 2021, WANG *et al.*, 2021). A intensidade da radiação absorvida pela matéria nos diversos comprimentos de onda é analisada e as regiões de maior interação com as amostras selecionadas (HONG *et al.*, 2021).

Esse método tem ganhado importância como alternativa aos métodos tradicionais, com excelente capacidade em estimativas seguras e rápidas da composição química, além de não destruir a amostra, permitindo análises posteriores, possui um equipamento de baixo custo e versátil (WANG *et al.*, 2020, CUI *et al.*, 2021, WANG *et al.*, 2021; HESPANHOL *et al.*, 2020).

A NIRS trabalha principalmente na região espectral entre 700 a 2500 nanômetros, quando associado a um software estatístico possibilita a identificação, qualificação e quantificação de inúmeros compostos orgânicos (CUI *et al.*, 2021). Todavia, quando o equipamento é adquirido, também são obtidas curvas de calibração, empregadas em um



número significativo de análises, entretanto a grande maioria das curvas de calibração é elaborada em cima de amostras dos países fabricantes do equipamento de NIRS, fazendo com que esse método analítico possua limitação para análises no Brasil. Em vista disso, para o adequado funcionamento da NIRS é recomendado utilizar uma ampla variedade de amostras na sua calibração, isso irá garantir a confiabilidade dos resultados alcançados (HONG *et al.*, 2021).

A literatura compreende a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês *high-performance liquid chromatography* (HPLC) é um método analítico muito utilizado na separação de vários componentes de uma mistura de substâncias, visando identificar, quantificar ou purificar esses componentes (VEIGA *et al.*, 2020).

Trata-se de um processo físico-químico de separação, constituído de uma fase móvel (líquido) e uma fase estacionária (sólido/ líquido). Na CLAE é colocado um pequeno volume de amostra líquida em uma coluna cromatográfica, com partículas porosas (fase estacionária), em seguida, o solvente é dispensado na coluna, fazendo os componentes da mistura se deslocar através da mesma (TORIBIO *et al.*, 2021; MEDINA *et al.*, 2020).

Na CLAE as substâncias que apresentarem maior afinidade pelo solvente irão ficar menos retidas na coluna, passando por um detector que emite um sinal elétrico, o qual é registrado, criando um cromatograma (SLABI *et al.*, 2019).

Esse método analítico é muito utilizado, pois expõe uma excelente detectabilidade e uma completa adaptabilidade às determinações quantitativas com exatidão. Tornou-se uma ferramenta analítica indispensável para a indústria farmacêutica e muitos campos da ciência, dispondo de uma excelente adequação na separação de compostos não voláteis ou termicamente instáveis (TAO *et al.*, 2019). Por outro lado, a CLAE é um equipamento com alto custo, se não houver demanda de análises, não é viável o investimento para sua aquisição, associado a isso, apresenta um alto custo de operação e necessidade de experiência no manuseio do equipamento (RIGANO *et al.*, 2019).

A literatura apresenta excelentes métodos analíticos, todavia seu uso para testes diários ou rotineiros na maioria das vezes é inviável, pois são métodos que ostentam um alto custo de investimento e operação (DAVIES *et al.*, 2018).

O aperfeiçoamento e o desenvolvimento de métodos novos, que originem resultados que possam ser interpretáveis e confiáveis são imprescindíveis, além de ser uma alternativa de criação ou reformulação de métodos de análise aos já estabelecidos.

Além disso, os métodos mencionados exigem laboratórios com infraestrutura adequada, equipamentos com alto custo de aquisição e pessoal especializado, inviabilizando a ampliação para controle de qualidade de suplementos à base de soro de leite (GARTHE *et al.*, 2018).

## 2.6 Métodos Colorimétricos empregados para determinação de proteínas em suplementos à base de soro de leite

Os métodos colorimétricos têm sido desenvolvidos e empregados em pesquisas de rotina, pois a cor é um atributo que pode ser quantificado e relacionado com a concentração de analitos de interesse, incluindo dispositivos miniaturizados que utilizam pequenas quantidades de reagentes e que geram poucos resíduos (FERNANDES *et al.*, 2020).

As determinações de proteínas podem ser realizadas por meio de testes específicos, tradicionalmente utilizados em Química, Bioquímica e Microbiologia. Na literatura, os seguintes métodos colorimétricos são frequentemente utilizados para determinação de proteínas: Lowry, Bradford e Biureto, que estão descritos na Tabela 1 (MARTÍNEZ *et al.*, 2020). Esses métodos colorimétricos são fundamentados na formação de reações de cor ocorridas entre as proteínas e reagentes químicos próprios para essa finalidade (SHEROVSKI *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Reagentes utilizados para determinar proteínas por métodos colorimétricos.

Método analítico	Reagentes	Referência
Lowry	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2% (m/v)/NaOH 0.1 mol/L + KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O 2% (m/v)/CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 1%(m/v)	LOWRY <i>et al.</i> , 1951
Bradford	Corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 (0.1 g/L) + ethanol (95%) (5% v/v) e H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% (10% v/v)	BRADFORD 1976
Biureto	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (1.5 g/L), KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O (6.0 g/L), KI + NaOH 10% (m/v)	GORNALL <i>et al.</i> , 1949

Fonte: da autora (2021), adaptado de Martínez *et al.* (2020).

O método de Lowry consiste no acréscimo de hidróxido de sódio (NaOH) e carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) a uma solução contendo proteínas, seguidos da adição de sulfato de cobre

( $\text{CuSO}_4$ ) e tártaro de sódio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$ ). Em seguida, uma coloração azul emerge em função da reação das proteínas com o íon cobre presente em solução alcalina. Por fim, é acrescentado o reagente Folin Ciocalteau (SILVA *et al.*, 2021). Essa composição ativa passa por uma redução, quando interage com as proteínas na presença de cobre em solução alcalina, provocando um complexo de coloração azul com absorção em um comprimento de onda de 750 nanômetros (NWACHUKWU *et al.*, 2019).

Esse método colorimétrico é sensível para a determinação de proteínas, em função da presença do reagente Folin-Ciocalteau, não necessitando de digestão; apresenta facilidade na adaptação em pequenas escalas de análise; em determinações com aminoácidos livres produzem excelentes tons de coloração (GOVINDASAMY *et al.*, 2019).

No entanto possui limitações, estando suscetível a interferentes no decorrer da análise apresentando absorção amplamente variável em diferentes amostras de proteínas e a coloração formada pode não ser adequada conforme a concentração do analito na amostra, devido a Lei de Lambert-Beer, portanto é recomendável sua aplicação somente em uma baixa faixa de concentração de proteínas (FELZ *et al.*, 2019).

O método de Bradford é baseado no acréscimo de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e um corante Azul Brillhante de Coomassie G-250 à solução contendo proteínas (SHEROVSKI *et al.*, 2018). No pH da reação, a interatividade entre proteínas de alto peso molecular e o corante promove o deslocamento do equilíbrio de forma aniônica, formando a coloração vermelha e da forma catiônica, formando a coloração azul, absorvendo em um comprimento de onda de 595 nanômetros (TIUFTIAKOV *et al.*, 2021).

Esse método colorimétrico pode ser realizado rapidamente, apresenta excelente sensibilidade e poucos interferentes quando comparado ao método de Lowry (FELZ *et al.*, 2019). Uma possível problemática acontece em decorrência da absorção em proteínas distintas, em razão da diminuição da solubilidade ou peso molecular; conforme a origem do corante e sua qualidade os resultados podem ser deficientes; outra dificuldade na sua execução está relacionada à predisposição da formação de um complexo proteína-corante podendo penetrar a parede das cubetas de quartzo, entretanto esse impasse pode ser anulado manipulando cubetas de vidro ou plástico. (FELZ *et al.*, 2019).

O método de Biureto é o mais utilizado quando comparado aos outros dois métodos colorimétricos mencionadas, sua elaboração se dá através da mistura de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) com o composto orgânico tártaro de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), estabilizando o cobre em solução. Depois de preparado, o reagente de

Biureto origina um complexo em tons azul-violeta na presença de proteínas e a intensidade da cor irá corresponder à concentração do analíto presente na amostra. Para que o método de Biureto alcance resultados aceitáveis é preciso que o composto contenha pelo menos duas ligações peptídicas na molécula (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A solução resultante irá mostrar duas bandas de absorção, uma de 270 nanômetros e outra de 540 nanômetros. A banda de 540 nanômetros é mais amplamente empregada para fins analíticos em proteínas, visto que é o ponto mais elevado de absorbância, pois diversas substâncias absorvem na região de 270 nanômetros causando interferência do método (ZHENG *et al.*, 2017).

O método de Biureto é aplicado para quantificar proteínas nos mais variados meios, sendo eles: aplicação em soro ou plasma sanguíneo, líquido cérebro espinhal, urina, alimentos, saliva, fibrinogênio e tecido animal, entre outros (LIU *et al.*, 2017).

Esse método é recomendado e utilizado por diversos autores, em razão de ser viável para análise e quantificação de proteínas, trata-se de um recurso seguro e eficaz, não exige treinamento do pesquisador, são utilizadas pequenas quantidades de amostra e solventes com baixo custo, quando comparado a outros métodos analíticos disponíveis em diversos compêndios, além disso, com o avanço da tecnologia, os métodos colorimétricos podem ser associados a instrumentos de captura de imagens digitais (LI *et al.*, 2020).

## **2.7 Metodologia experimental baseada em imagens digitais para quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite**

Quando capturamos uma imagem com uma câmera de smartphone, o sinal é transformado em formato numérico, a região capturada é fragmentada em pequenas partes localizadas em arranjos bidimensionais, cada sinal é chamado de *pixel* (CHEN *et al.*, 2021). Para uma imagem digital ser próxima de uma imagem real, é indispensável um número relevante de *pixels* (VS *et al.*, 2017). Para isso, as câmeras dos smartphones são providas de alta resolução, com várias funções, tais como, foco, zoom e balanço de colorações (FERNANDES *et al.*, 2020; REZAZADEH *et al.*, 2019).

O pesquisador Bryce Bayer, da Kodak, sugeriu a reprodução de cor digital com combinação numérica em 3 cores: vermelho, verde e azul, o arranjo de suas intensidades desenvolve diferentes tons. Comumente, são empregadas 3 matrizes para armazenar

informações de uma imagem, depositadas na matriz R (*Red*) vermelho, G (*Green*) verde e B (*Blue*) azul, denominado RGB (SILVA *et al.*, 2020).

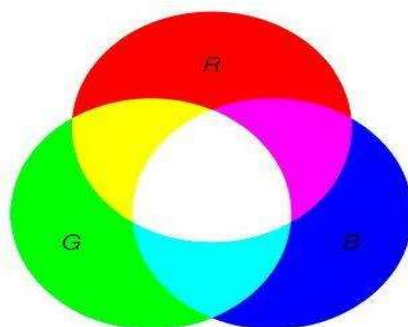
O modelo de cores RGB é aplicado em monitores e televisores, criando cores a olho nu nesses aparelhos. Dessa maneira, a combinação das 3 cores em vários níveis de intensidade origina outras inúmeras cores existentes no espectro na região do visível, definidas por escala numérica, variando de 0 a 255 (LIMA *et al.*, 2020; NOWAK *et al.*, 2021; JIA *et al.*, 2021).

O CMYK (*Cyan, Magenta, Yellow and Black*) é um sistema substrativo ou sistema cor-pigmento, utilizado na indústria gráfica. Esse sistema utiliza cores opostas ao RGB, ou seja, que são resultantes da mistura das 3 cores do RGB, assim sendo: Ciano/Vermelho, Magenta/Verde e Amarelo/Azul, a soma das 3 cores nas proporções corretas obtem-se o preto (Black), representado pela letra K (FAN *et al.*, 2021).

Já o LAB trabalha em 3 canais diferentes, o canal L varia de 0 (preto) e 100 (branco), gerando informações de luminosidade, os canais A e B, comportam as informações da cor, o primeiro é atribuído a valores positivos que indicam magenta e negativos, indicando verde, o segundo representa valores positivos em azul e negativos em amarelo (YUSUFU *et al.*, 2018). O LAB é o único sistema que tem a capacidade de produção de cores existentes no espectro visível, chegando o mais próximo possível da realidade, esse formato geralmente é utilizado para garantir qualidade de imagens (ROPELEWSKA *et al.*, 2021).

A Figura 1 mostra a combinação de cores primárias do sistema RGB resultando na formação de cores secundárias. O ciano, magenta e o amarelo são opostos ao vermelho, verde e azul; o branco é formado a partir das três cores; as demais colorações são resultantes da combinação de dois tons, sendo eles: vermelho + azul = magenta; vermelho + verde = amarelo e verde + azul = ciano (NOWAK *et al.*, 2021).

Figura 1 - Representação gráfica do sistema RGB.



Fonte: Hamedpour *et al.* (2020).

A resposta analítica que uma imagem produz é baseada nesse sistema de cores (RGB), com escala numérica variando de 0 a 255 para cada tonalidade. O canal 0 significa completa ausência de cor (branco), já o canal 255 significa a presença de cor na sua intensidade máxima (preto). A combinação da escala numérica dos canais RGB fornecem uma infinidade de tons e subtons (Figura 1) (SANGSIN *et al.*, 2021; SHENDE *et al.*, 2019).

O uso de aplicativos via captura de imagens por smartphone já vem sendo utilizado em diversas análises químicas, os quais possibilitam a quantificação de amostras pelo sistema RGB. Essa técnica deve ser considerada como alternativa para quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite já que não consta na literatura para esse tipo de amostra, podendo ser empregada manuseando aplicativos disponíveis gratuitamente, os quais permitem a coleta do sinal analítico por meio do telefone móvel (AIT ERRAYESS *et al.*, 2018; AGUIRRE *et al.*, 2019; MERLI *et al.*, 2019).

O aplicativo PhotoMetrixPRO é de uso gratuito e utilizado tanto para identificar como para quantificar diferentes analitos, como por ex.: iodo no biodiesel, identificação de cocaína em amostras forenses, assim como quantificação de adulterantes e determinação de amônia em amostras de águas (SOARES *et al.*, 2017; AIT ERRAYESS *et al.*, 2018).

Este aplicativo possibilita por meio da aquisição de imagem e transformação desta em sinal analítico, uma forma gratuita, rápida, prática e eficaz de desenvolvimento de metodologias de análise, tanto para ensaios qualitativos e quantitativos de amostras, evidenciando um desempenho analítico satisfatório (LUO *et al.*, 2021).

A imagem digital formada por *pixels* e o sistema RGB possibilita através das suas 3 matrizes, relacionadas às cores: vermelho (R), verde (G) e azul (B), armazenar as informações no sistema e converter a intensidade da radiação incidente de um sinal elétrico analógico em um sinal digital que irá estabelecer uma relação entre a cor da amostra e a concentração do analito (SILVA *et al.*, 2021).

A quantidade de *pixels* das imagens adquiridas, relacionada aos canais de cores pode ser empregue para inúmeras aplicações analíticas, utilizando métodos de correlação linear simples para análises univariadas ou multivariadas, avaliando relações de um grupo ou calibrações com grande número de variáveis (HOLKEM *et al.*, 2020).

Outra vantagem desse aplicativo está relacionada ao uso dos sistemas *spot tests*, esse micro método é empregado em reações químicas sensíveis e seletivas, exibe como característica principal o manuseio de pequenos volumes de analito (os) e reagente (s), que podem ser realizados por microescala, com equipamentos portáteis e *in situ* (JIA *et al.*, 2021).

A quantidade de produtos químicos que é liberada no meio ambiente com emissões de rotina de laboratórios é enorme e apresenta um grande risco à saúde da sociedade e ao meio ambiente (COSTA *et al.*, 2020). No entanto, as vantagens que esses produtos podem trazer para a indústria química moderna e as pesquisas científicas são indiscutíveis e incontestáveis (KANCHI *et al.*, 2018).

Em vista que os dispositivos digitais são um caminho alternativo para quantificações analíticas, tornando-se uma alternativa viável, levando em consideração o alto custo de equipamentos de métodos tradicionais, uma política que venha a ter como objetivo evitar a geração de resíduos, com a aplicação de tecnologia que utilizem menores quantidades de matéria-prima é imprescindível (SOARES *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2021).

## **2.8 Validação de um método analítico: Uma abordagem conceitual**

Para uso de rotina de um determinado método analítico é necessária sua validação de acordo com órgãos responsáveis, assegurando a confiabilidade na qualidade das análises, através de comparações, investigações e segurança (RAPOSO *et al.*, 2020).

O procedimento de validação tem por objetivo principal garantir que o produto será sempre fabricado com o mesmo padrão de qualidade, seguindo os limites toleráveis, assegurados pelos órgãos regulamentadores e farmacopeias, para cada tipo de amostra a ser estudada se faz necessário à realização de testes estatísticos e resultados experimentais (GARNEAU *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2021; POMERANTSEV *et al.*, 2021).

O Brasil conta com duas agências que trabalham na regularização de procedimentos empregados para a validação de um método analítico, sendo as seguintes: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO) (ICASIO–HERNÁNDEZ *et al.*, 2021; KADIAN *et al.*, 2016). Na esfera internacional as normatizações são estabelecidas de acordo com as exigências do ICH, abrangendo Europa, Estados Unidos e Japão com representação de órgãos regulamentadores e indústrias (CARMO *et al.*, 2018)

No Brasil, a ANVISA dispõe da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, determinando critérios para a validação de métodos analíticos, assegurando por intermédio de estudos experimentais que o método executado atenda os requisitos analíticos (CHEIBUB *et al.*, 2020). Os parâmetros de validação que um método deve seguir são: Seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de

quantificação (LOQ) e robustez (SOUZA *et al.*, 2019). A seguir serão descritos os preceitos básicos de cada parâmetro empregado na validação de métodos analíticos.

### **2.8.1 SELETIVIDADE**

A seletividade é determinada por meio da identificação ou quantificação do analito de interesse, mesmo que haja a presença de outros componentes na amostra, por exemplo, impurezas e diluentes. A especificidade tem por objetivo garantir que o sinal medido seja somente do analito de interesse (RAPOSO *et al.*, 2021; SVEČNJAK *et al.*, 2021).

### **2.8.2 LINEARIDADE**

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados alcançados são exatamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em um intervalo especificado, obtido por expressão matemática. Sua execução se dá por no mínimo 5 concentrações diferentes, em triplicata (RAPOSO *et al.*, 2020).

### **2.8.3 PRECISÃO**

A precisão indica que os resultados atingidos apresentam valores aproximados a um valor central (SOUZA *et al.*, 2019). Esses valores são alcançados através de ensaios independentes, seguidos com as mesmas amostras ou padrões, em condições experimentais estabelecidas e elaboradas de acordo com o método analítico a ser validado (CARMO *et al.*, 2018). Uma vez que, a precisão é representada através da repetibilidade do ensaio, da precisão intermediária ou reprodutibilidade (MENDES *et al.*, 2020; CHEIBUB *et al.*, 2020).

### **2.8.4 EXATIDÃO**

A exatidão é obtida na aproximação de valores entre resultados analisados individualmente em relação ao valor de referência. Para o método analítico apresentar exatidão a verificação deve ocorrer em no mínimo 9 determinações, através de 3 concentrações: baixa, média e alta, em triplicata, ressaltando que as amostras devem ser preparadas individualmente (ICASIO–HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).



### **2.8.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)**

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade de analito identificado, mas não necessariamente quantificado, sua determinação é associada com a precisão e exatidão em condições experimentais definidas. A estimativa da LOQ se dá pela realização de métodos específicos com técnicas visuais, de sinal / ruído ou por meios dos resultados da curva analítica (MANSUR *et al.*, 2021).

### **2.8.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)**

O limite de detecção (LOD) é representado pela quantidade mais baixa de analito em uma amostra, sua quantificação pode ocorrer se a precisão e exatidão apresentarem resultados aceitáveis (MENA–GARCÍA *et al.*, 2021).

### **2.8.7 ROBUSTEZ**

A robustez é caracterizada quando o método apresenta resultados confiáveis, resistindo a pequenas variações na sua condição analítica (MANSUR *et al.*, 2021).

Em síntese, validar um sistema de análise novo ou adaptado, é transformar o método analítico verdadeiro, comprovando sua legitimidade por documentos, incluindo todos os processos envolvidos em sua produção, controle de qualidade, insumos, condições ambientais e matérias-primas que fazem parte de sua composição.

Portanto na validação de um novo método analítico os parâmetros mencionados devem ser aplicados de acordo com as legislações que os regem (AGRAWAL *et al.*, 2021; CUADROZ RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

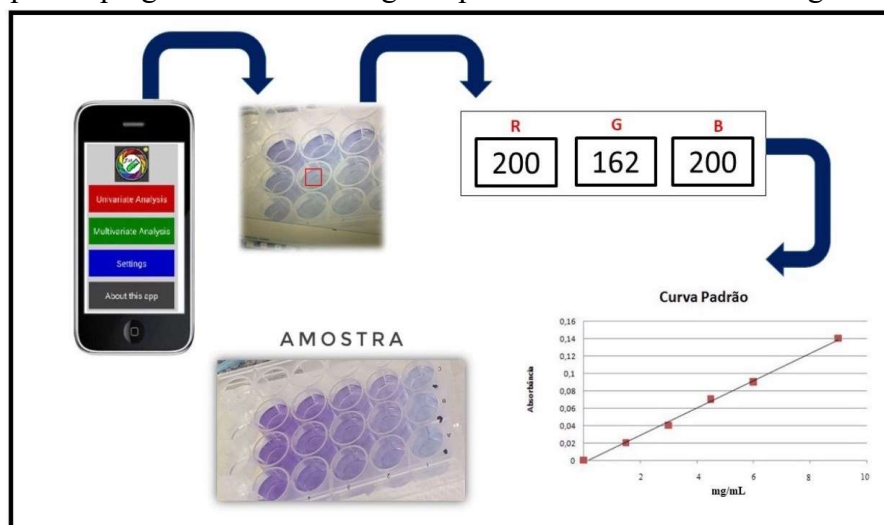
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Descrição geral

Nesta seção será descrito o método analítico empregando colorimetria associado a imagens digitais. Esse método analítico permite quantificar proteínas em suplementos à base de soro de leite, mediante a captura de imagens digitais por uma câmera de smartphone, originando sinais analíticos (Figura 2).

As análises colorimétricas ocorreram por meio do método de Biureto e as medidas quantitativas com a aquisição do sinal analítico foram realizadas a partir do aplicativo PhotoMetrixPRO, disponível gratuitamente na loja de aplicativos *Google Play Store* para smartphones *Android* e *Windows Phone*. A seguir será apresentada a metodologia de forma detalhada.

Figura 2 - Etapas empregadas na metodologia experimental baseada em imagens digitais.



Fonte: da autora (2021).

#### 3.2 Amostras de suplementos à base de soro de leite

Foram utilizadas 14 amostras de suplementos formulados à base de soro do leite, representados por 3 classes distintas, na devida ordem:

- Classe I - representado por 3 amostras de suplementos isolados e 3 amostras de suplementos isolados/hidrolisados. Esses produtos passaram por uma junção de duas

etapas de filtração industrial, formulando um suplemento com grau de pureza elevado, contendo na formulação altas concentrações de aminoácidos essenciais, isenção de carboidratos, gorduras saturadas, lactose e baixos teores de sódio.

- Classe II - representado por 4 amostras “blends 3W”, apontando na formulação a junção das 3 classes de proteínas, com as seguintes frações: Concentrado, isolado e hidrolisado. Essas amostras indicaram na rotulagem a presença de outros constituintes, como carboidratos, gorduras saturadas, lactose, minerais e vitaminas.
- Classe III - representado por 4 amostras contendo a fração proteica concentrada. Essa categoria passa por um único processo filtração industrial, preservando todos os constituintes presentes no soro do leite, elaborando um produto hipercalórico, com a presença de carboidratos, gorduras saturadas, minerais, vitaminas, lactose e baixos teores de sódio.

As 14 amostras foram adquiridas no comércio varejista online da cidade de São Paulo-SP, oriundas de diferentes fabricantes e sabores heterogêneos (Tabela 2). As amostras foram escolhidas de modo que diversificassem ao máximo sua composição nutricional. Após suas aquisições, as mesmas foram armazenadas em temperatura ambiente, seguindo as recomendações da rotulagem até o momento das análises.

Tabela 2 - Descrição das amostras de suplementos à base de soro de leite e composição de proteínas por porção.

	<b>Descrição dos suplementos</b>	<b>Proteína / Porção</b>	<b>Percentual de proteína</b>
1.	Suplemento isolado sabor morango	26 g / 30 g	86,66
2.	Suplemento isolado natural (sem sabor)	14 g / 15 g	93,33
3.	Suplemento isolado sabor néctar de laranja e pêssego	23 g / 27 g	85,18
4.	Suplemento isolado e hidrolisado sabor morango	25 g / 35 g	71,42
5.	Suplemento isolado e hidrolisado sabor café	23 g / 32 g	71,87
6.	Suplemento isolado e hidrolisado sabor coco	22 g / 33 g	66,66

(continua)

(Continuação)

7.	Suplemento 3w sabor leite	26 g / 40 g	65,00
8.	Suplemento 3w sabor mousse de maracujá	26 g / 40 g	65,00
9.	Suplemento 3w sabor morango	24 g / 40 g	60,00
10.	Suplemento 3w vegano sabor muffin, morango e banana	20 g / 35 g	57,14
11.	Suplemento concentrado sabor chocolate	30 g / 120 g	25,00
12.	Suplemento concentrado sabor morango	30 g / 120 g	25,00
13.	Suplemento concentrado sabor chocolate (Lote: 19079)	23 g / 33 g	69,69
14.	Suplemento concentrado sabor chocolate (Lote: 19372)	23 g / 33 g	69,69

Fonte: da autora (2021).

### 3.3 Instrumentação

As amostras de suplementos à base de soro de leite foram pesadas em balança analítica Shimadzu, modelo AY200. A homogeneização das amostras foi realizada por ultrassom no equipamento Unique (Ultra Cleaner).

Em seguida, as amostras passaram por filtração simples, o procedimento foi executado com papel filtro de laboratório, dobrado ao meio duas vezes.

A homogeneização dos compostos químicos usados para a preparação do reagente de Biureto aconteceu por intermédio de um agitador magnético Vortex, modelo QL - 901.

O espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV-1800 (220v) foi o método analítico convencional empregado para comparação dos resultados obtidos pelo método analítico proposto.

O purificador de água Milli-Q®UV foi utilizado na produção de água usada no preparo de todas as soluções.

As micropipetas Monocanal Labmate® Pro automáticas, foram usadas em todas as etapas do desenvolvimento do método analítico proposto, garantindo a transferência das quantidades exatas dos reagentes químicos e amostras.

### 3.4 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados eram de alto grau de pureza. Para o preparo do Reagente de Biureto foi usado Sulfato de Cobre Pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Tártaro duplo de Sódio e Potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e Hidróxido de Sódio aquoso a 10% ( $\text{NaOH}10\%$ ). Todos os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da empresa Dinâmica® Química Contemporânea LTDA.

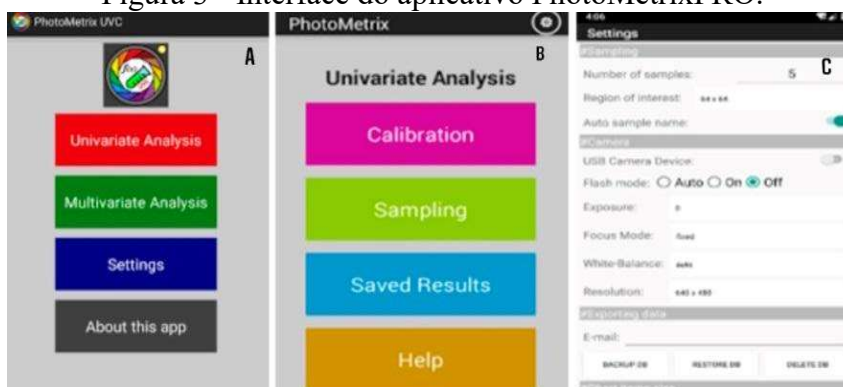
Soluções padrão de *Bovine Serum Albumin* (BSA) em diferentes concentrações foram preparadas a partir de BSA pó liofilizado (lote SLBM 5216V), com grau de pureza  $\geq 96\%$ , adquirida comercialmente do Laboratório SIGMA-ALDRICH (Brasil, BR).

### 3.5 Aplicativo PhotoMetrixPRO

A análise de dados se deu mediante ao aplicativo PhotoMetrixPRO, disponível na loja de aplicativos Google Play Store para smartphones *Android*. As imagens digitais foram capturadas por um smartphone Motorola G6 que dispõe de câmera traseira com resolução de 13 megapixels (COSTA *et al.*, 2020).

O funcionamento básico do PhotoMetrixPRO é estabelecido na interface principal do aplicativo, conforme demonstrado na Figura 3A, abrangendo as opções de análise univariada e multivariada, configurações e informações sobre o software. No presente estudo foi empregada análise univariada com a opção de calibração (Figura 3B), seguida da etapa onde é estipulado o número de padrões pretendido para a criação da curva analítica (Figura 3C) (DE JESUS *et al.*, 2019, KALINOWSKA *et al.*, 2021; FAN *et al.*, 2021).

Figura 3 - Interface do aplicativo PhotoMetrixPRO.



Fonte: da autora (2021).

### 3.6 Aparato para realização de medidas analíticas

Foi utilizada uma caixa de madeira, nas dimensões 25cm x 20cm (largura x altura) (Figura 4), com um ambiente de luz controlada. A caixa foi confeccionada em madeira escura na parte interior visando minimizar a entrada de luz externa, de modo que o compartimento da amostra fosse exclusivamente iluminado por um painel de LED 6.000K (branca), da marca Ecoforce®, com LED 16W.

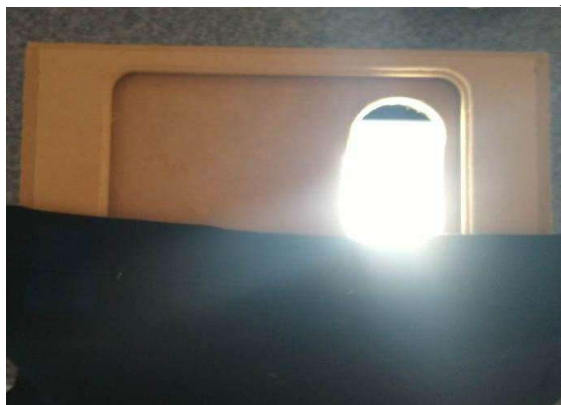
Além disso, no interior da caixa, foi posicionado um suporte móvel com 10cm de altura, para acomodar a placa de análise e na parte superior foi feita uma abertura circular para posicionar a câmera do smartphone para a captura da imagem (Figura 5).

Figura 4 - Caixa confeccionada para criar o ambiente de luz controlada.



Fonte: da autora, (2021).

Figura 5 - Caixa confeccionada com abertura circular na parte superior.



Fonte: da autora (2021).

### 3.7 Preparação do reagente de Biureto e protocolo de análise das amostras

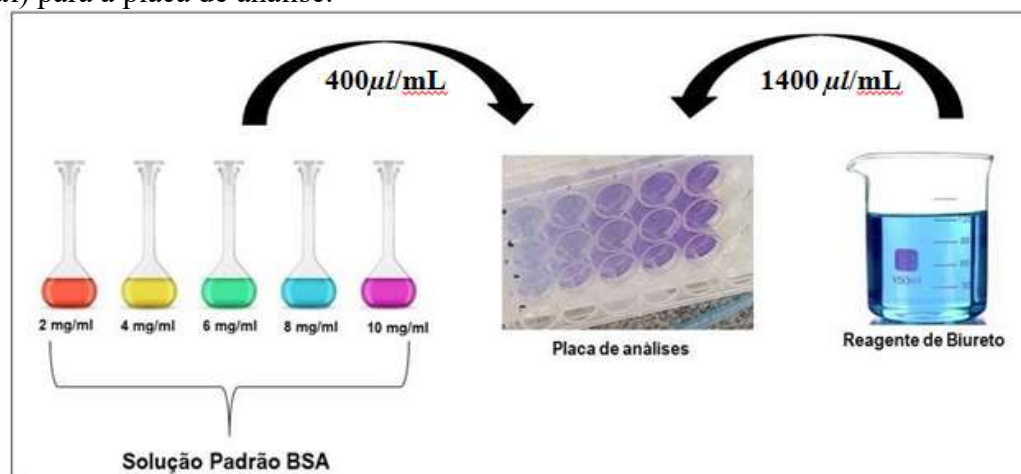
O preparo do reagente de Biureto consistiu na pesagem em balança analítica de 1,5g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 6g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Após a pesagem, os reagentes foram transferidos para um béquer e adicionados 500mL de água ultrapura, esses compostos foram submetidos a constante agitação em agitador magnético com adição gradual de 300mL de NaOH10%.

O volume final foi completado com água ultrapura até perfazer 1L sob constante agitação. Após a preparação o reagente de Biureto foi guardado em um frasco de vidro com prazo de validade indeterminado (LIU *et al.*, 2017).

Uma solução estoque foi preparada em Laboratório para a elaboração das curvas de calibração. O preparo se deu pela pesagem em balança analítica de 1g de solução padrão de BSA, com auxílio de um balão volumétrico a mesma foi diluída em 50mL de água ultrapura, em seguida ocorreu a homogeneização da solução em ultrassom.

A construção das curvas de calibração foi realizada nas concentrações de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  com auxílio de balões volumétricos. A partir das concentrações das soluções padrão de BSA (2 a 10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foi pipetado  $400\mu\text{L}/\text{mL}$  nos poços da placa de análise, acrescidos de  $1400\mu\text{L}/\text{mL}$  do reagente de Biureto, conforme a ilustração da Figura 6.

Figura 6 - Transferência das soluções padrão de BSA ( $400\mu\text{L}$ ) e o reagente de Biureto ( $1400\mu\text{L}$ ) para a placa de análise.



Fonte: da autora (2021).

As soluções das amostras de suplementos à base de soro de leite foram preparadas segundo os valores teóricos de proteína por porção declarada no rótulo do produto, conforme a descrição da Tabela 2. As soluções foram preparadas em balões volumétricos e submetidas à

homogeneização em ultrassom para a realização das análises. Em paralelo, as amostras foram analisadas por metodologia convencional por espectrometria no UV-Vis.

### **3.8 Quantificação de proteínas em suplementos à base de soro de leite mediante ao método convencional: Espectrometria no UV-Vis**

A espectrometria na região do UV-Vis, em um comprimento de onda de 540 nanômetros, foi utilizada como o método convencional para fins de comparação com o método analítico proposto na quantificação de proteínas nas amostras de suplementos à base de soro de leite (MAPA, 2019).

As soluções padrão de BSA nas concentrações de 2 a 10 mg.mL<sup>-1</sup> e as 14 amostras de suplementos à base de soro de leite preparadas e utilizadas para as análises do método analítico proposto foram as mesmas utilizadas para a leitura no espectrofotômetro no UV-Vis.

O procedimento ocorreu mediante a transferência das soluções para a cubeta de quartzo do equipamento individualmente e realizada a leitura em triplicata no comprimento de onda selecionado. A curva analítica foi obtida plotando a absorbância *versus* concentração de soluções padrão de BSA de 2 a 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

### **3.9 Otimização dos parâmetros instrumentais e domínio de robustez**

Testes preliminares foram conduzidos com o objetivo de analisar quais parâmetros demonstravam a melhor resposta instrumental, garantindo resultados reprodutíveis e confiáveis. Nessa avaliação preliminar, a iluminação da parte interna da caixa com a lâmpada de LED 6.000K (branca), da marca Ecoforce® proporcionou um sinal reprodutível, dispensando o uso do flash da câmera do smartphone.

Logo após, foi realizado um planejamento do estudo do tipo *Central Composite Design* (CCD), a melhor condição foi fornecida por meio de gráficos de superfície de resposta. Os experimentos objetivaram avaliar a influência do volume do poço, % do reagente no poço e a distância da câmera do smartphone a placa de análises.

O delineamento CCD gerou 20 experimentos que foram realizados em ordem aleatória, com variáveis independentes codificadas, os ensaios realizados para o planejamento experimental CCD estão apresentados na Tabela 3, o objetivo principal foi avaliar as condições experimentais que poderiam interferir na análise.



Tabela 3 - Variáveis independentes codificadas.

<b>Variáveis</b>	<b>-1,68</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,68</b>
Altura (cm)	4,64	6	8	10	11,36
Volume (mL)	1,0	1,2	1,5	1,8	2,0
% reagente no poço	40,2	50	65	70	80,2

Fonte: da autora (2021). Legenda: cm\*: Centímetro; mL\*: Mililitro.

Para avaliação do domínio da robustez foi empregue o mesmo desenho experimental da otimização por CCD, que forneceu gráficos de superfície de resposta e as avaliações realizadas mediante ao menor desvio padrão (DPR) gerado nos gráficos. Os experimentos foram realizados em triplicata e a análise estatística elaborada pelo software Design-Expert.

### **3.10 Validação do método analítico proposto empregando colorimetria e imagens digitais**

Objetivando assegurar a confiabilidade dos resultados, o método analítico proposto foi devidamente validado, por meio de estimativas das figuras de mérito descritas a seguir: Linearidade, efeito matriz/seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), conforme as orientações do documento DOQ-CGCRE-008 do Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2020) e da Resolução n° 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017). O tratamento dos dados foi realizado no programa Microsoft Excel ® (Microsoft Corporation, EUA).

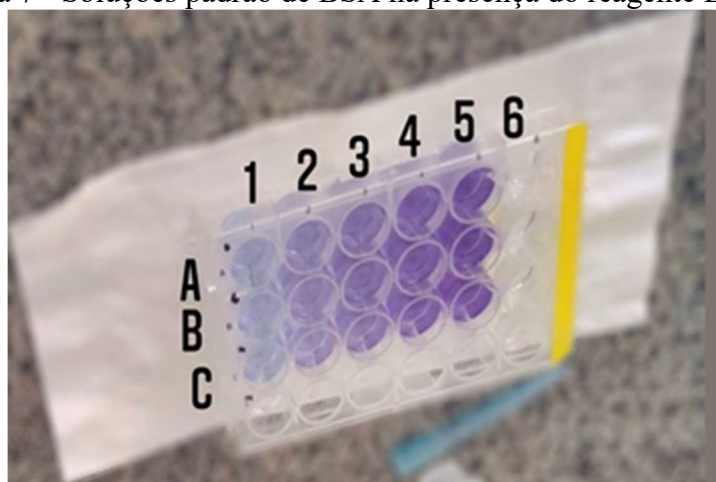
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção do canal RGB

Soluções padrão de BSA nas concentrações de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  a  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram analisadas nos 3 canais R, G e B com o objetivo de verificar a intensidade do sinal analítico produzido, bem como a sensibilidade das curvas.

A Figura 7 mostra os poços com numeração de 1 a 5 apresentando a solução padrão de BSA em concentrações crescentes e as letras A, B e C representam as triplicatas. O último poço (representado pelo número 6) refere-se a amostra “branco”, ou seja, quando há ausência do analito. Na figura é perceptível a mudança da intensidade da coloração violeta à medida que o analito reage com o cobre presente no reagente Biureto.

Figura 7 - Soluções padrão de BSA na presença do reagente Biureto.



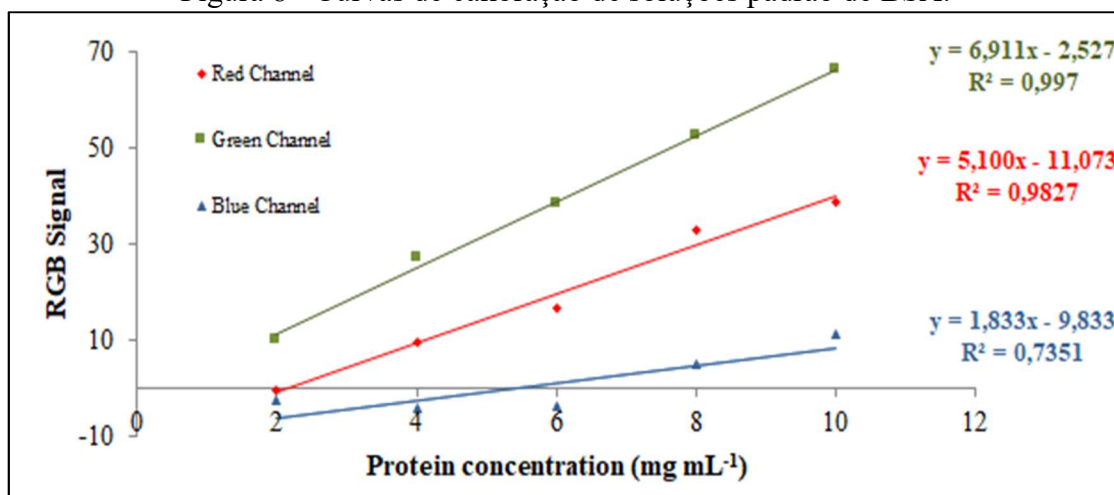
Fonte: da autora (2021).

Essa reação colorimétrica está fundamentada na formação de um composto colorido onde a concentração é diretamente proporcional ao desenvolvimento da cor, após a adição de determinado volume de reagente. Dessa forma, inicialmente foi monitorado o sinal analítico nos 3 canais (R, G, B), analisando qual iria responder linearmente de acordo com a variação das concentrações das soluções padrão de BSA.

Uma curva analítica para cada canal foi obtida, calculando-se o eixo x, referente à concentração de proteína ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e o eixo y, denominado sinal (s) conforme demonstrado na Figura 8. O sinal (s) é alcançado pela subtração da intensidade da cor registrada nos canais de R, G ou B, em um nível máximo de intensidade dos canais RGB (255 - sinal obtido).

O canal G representado pela linha verde tracejada apresentou a maior sensibilidade, devido a isso, esse canal foi utilizado em todas as análises. Além disso, de acordo com as concentrações estudadas, o canal em questão mostrou uma excelente correlação linear, apresentando um coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,997. Já os canais R e B não se mostraram adequados em relação aos valores de coeficiente angular e coeficiente de correlação.

Figura 8 - Curvas de calibração de soluções padrão de BSA.



Fonte: da autora (2021), com o aplicativo PhotoMetrixPRO por meio da captura de imagens com o smartphone Motorola G6.

De acordo com o método analítico proposto envolvendo o reagente Biureto, a reação química de proteínas em suplementos de soro de leite gera um composto de coloração violeta. Devido à complementaridade do canal G com a cor violeta do composto originado, isto é, a solução apresenta absorção na radiação correspondente à cor violeta sendo a cor complementar o verde, aproximadamente 70% da variação total do sinal (soma dos canais R, G e B), estava relacionada ao canal G.

#### 4.2 Otimização do ambiente de captura de imagens digitais por smartphone

Compreendendo que o aplicativo PhotoMetrixPRO realiza análise a partir de imagens digitais obtidas por meio de parâmetros como a luminosidade, distância da câmera do smartphone em relação ao poço e a resolução da imagem, é necessário a obtenção de uma instrumentação onde a aquisição da imagem apresente a menor quantidade de interferentes, produzindo resultados reprodutíveis e confiáveis (URIARTE *et al.*, 2021).

A realização de medições fotométricas confiáveis por smartphone necessita de distanciamento focal adequado, assim como circunstâncias de luminosidade favoráveis. A fim

de atender essas condições um suporte portátil foi utilizado para acomodar a placa de acrílico na parte interior da caixa de análise. A distância ideal da câmera do smartphone a cada poço da placa contendo a amostra foi otimizada por superfície de resposta em 10 cm e a iluminação constante foi fornecida pela lâmpada de LED acoplada à caixa de madeira (CERRATO–ANVAREZ *et al.*, 2021).

A iluminação é um fator que tem forte influência na cor das soluções, pois as mesmas podem vir a apresentar alterações significativas na decomposição da cor pelo sistema RGB, quando submetidos ou não a fontes de iluminação (LI *et al.*, 2020). Em vista disso, uma caixa com sistema de iluminação fria com painel de LED de 16W foi utilizado neste trabalho. A importância da iluminação bem como da distância entre a superfície do poço e a câmera do smartphone foram avaliadas por Maroubó *et al.* (2021). Neste estudo foi realizada a determinação de sulfonamidas totais em leite bovino por imagens de smartphone, uma caixa de isopor foi adaptada para adicionar tubos Falcon® de 15 mL, a base foi de 10,5 cm de distância do tubo de análise. Para a iluminação uma lâmpada com 30 LEDs 1,5 W e 3,7 V, foi fixada na parte inferior da caixa, dispensando o uso de flash.

Ao capturar as imagens, se o ambiente de captura não possuir condições ajustadas e adequadas, um grande impacto sobre as medições fotométricas poderia causar desvio de resultados de análise. Para solucionar esse problema, foram aprimoradas as condições mencionadas, garantindo imagens de alta qualidade, assegurando a precisão do resultado final.

### 4.3 Otimização das condições experimentais

Na otimização dos parâmetros instrumentais foram analisadas variáveis, tais como, distância do smartphone à superfície do poço (4,6 a 11,4 cm), volume final do poço (1,0 a 2,0 mL) e proporção do reagente Biureto (em volume) em relação ao volume final (40 a 60%).

A otimização ocorreu por Delineamento de experimento do tipo CCD (*Central Composite Design*) de dois fatores, os dados coletados na execução do experimento possibilitam a obtenção de gráficos de superfície de resposta. O CCD fornece condições ideais, analisando as variáveis no modelo multivariado. A análise estatística foi realizada pelo software Design Expert®.

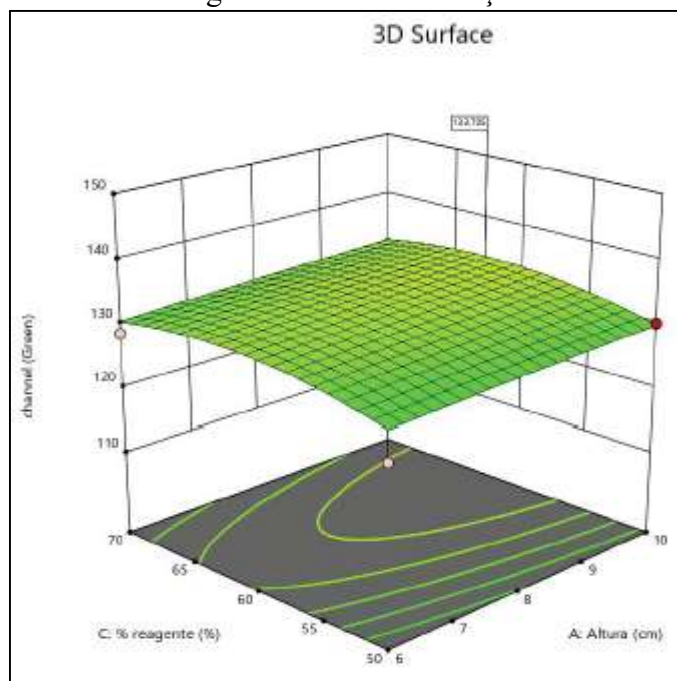
As superfícies de resposta foram geradas modelando os dados obtidos a partir dos pontos máximos. O cálculo das coordenadas do ponto máximo é adequado para a

identificação de condições ótimas, pois é neste ponto é observado o sinal máximo. Os pontos críticos foram calculados usando a equação de regressão do modelo, que foi parcialmente derivada sobre cada fator.

Esse procedimento gerou uma equação final com três variáveis. A equação final com os coeficientes para cada variável do modelo foi:  $+124,97 + 1,11A + 7,11B + 1,47C - 0,3250AB + 0,0750AC - 0,4250BC - 0,1585A^2 + 0,8668B^2 - 2,53C^2$ . Nessa equação as letras A, B e C são as variáveis independentes codificadas (A = distância do smartphone à superfície do poço, B = volume final no poço e C = % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço, respectivamente).

A Figura 9 apresenta o gráfico de superfície de resposta para a avaliação de dois fatores: distância do smartphone *versus* % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço. Neste gráfico não foi observada influência dos fatores, já que o sinal analítico permaneceu constante.

Figura 9 - Influência de dois fatores: distância (cm) do smartphone à superfície do poço *versus* % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço

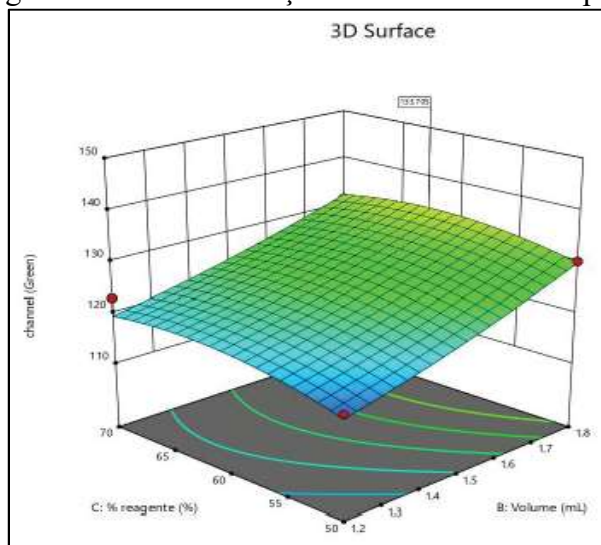


Fonte: da autora (2021).

A Figura 10 apresenta a interação de dois fatores: volume (mL) final do poço *versus* % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço. Neste caso, o sinal analítico permaneceu constante tanto para o aumento quanto para a diminuição do % do

reagente. Em relação ao volume (mL) final do poço, o sinal analítico aumentou significativamente à medida que este volume foi alterado. Essa característica indica a influência desta variável no sinal analítico e, conseqüentemente, na formação da reação colorimétrica e aquisição do sinal.

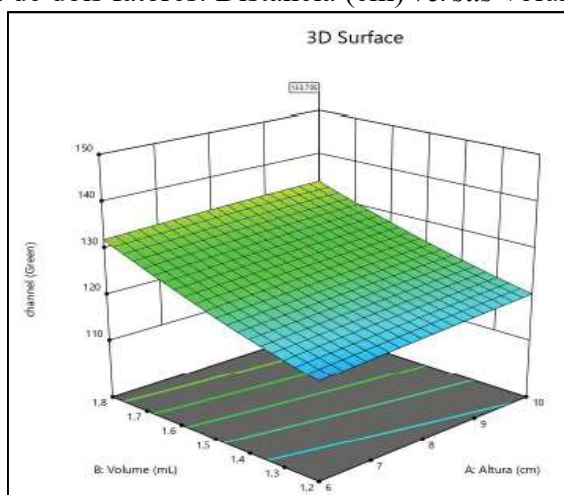
Figura 10 - Influência de dois fatores: Volume (mL) final do poço *versus* % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço.



Fonte: da autora (2021).

A Figura 11 apresenta a influência dos fatores: distância (cm) *versus* % em volume do reagente Biureto em relação ao volume final do poço. Nesta condição, o sinal analítico aumentou consideravelmente à medida que o volume do poço aumentou, indicando a influência desta variável.

Figura 11 - Influência de dois fatores: Distância (cm) *versus* volume final do poço (mL).



Fonte: da autora (2021).

Segundo o modelo matemático de regressão obtido, as condições otimizadas propostas foram: 60:40 de proporção entre o reagente de Biureto e a solução em análise contendo a proteína, 1,8 mL de volume total no poço, com uma distância de 10 cm do smartphone até a placa de análise. De acordo com Barreto *et al.* (2020) quando a distância de leitura é inferior a 5 cm ou superior a 35 cm, a legibilidade utilizando um smartphone é significativamente menor do que empregando 10 cm (BARRETO *et al.*, 2020).

#### 4.4 Validação do Método Analítico

A validação do método analítico foi realizada para os parâmetros efeito matriz, linearidade, efeito matriz/seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), de acordo com as recomendações do documento DOQ-CGCRE-008 do Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2020) e da Resolução nº 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017).

##### 4.4.1 Efeito Matriz e Seletividade

A avaliação do efeito de matriz é um teste exigido durante a validação de uma metodologia analítica e tem por objetivo principal garantir que outros componentes não causem interferência na quantificação do analito estudado. O efeito matriz estuda a seletividade verificando prováveis interferências geradas por diversas substâncias que fazem parte da composição da matriz da amostra, ocasionando diminuição ou aumento da resposta instrumental (BRASIL, 2018).

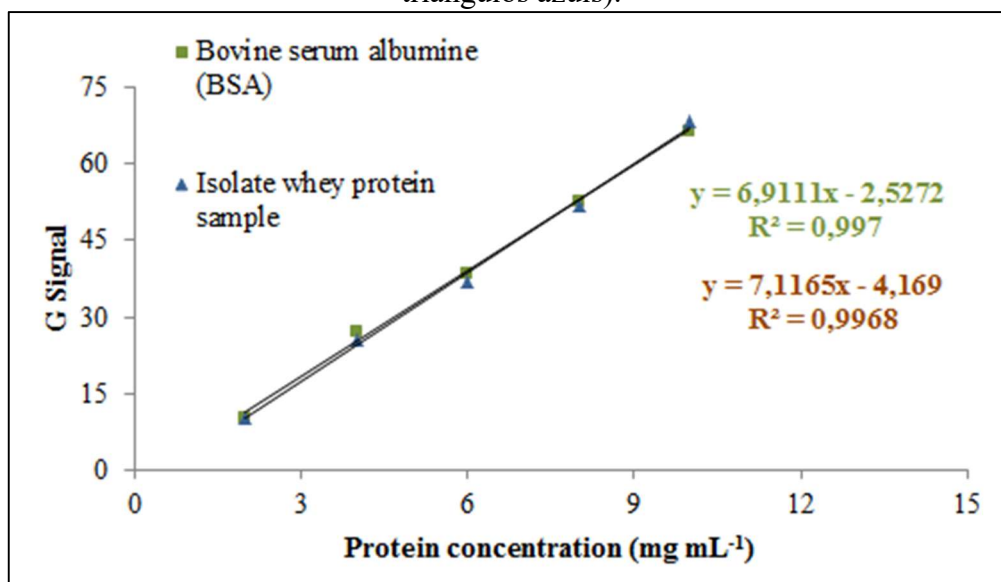
A análise do efeito de matriz ocorreu através da comparação do gráfico de curvas de calibração preparado com padrões de BSA, com aquela empregando a amostra de suplementos à base de soro de leite. As curvas obtidas através da amostra de suplementos isolados à base de soro de leite e solução padrão de BSA foram avaliadas de acordo com as inclinações das curvas por meio do Teste *t*.

A Figura 12 apresenta as inclinações avaliadas por meio dos coeficientes *s* angulares da solução padrão de BSA e amostra. Nesse caso as inclinações das duas curvas não divergiram significativamente, ou seja, não ocorreu a ocorrência de efeito matriz, podendo ser visualizado graficamente comprovando o paralelismo das curvas (INMETRO, 2020).

A medida dos coeficientes angulares avaliados foi de 2,88%, comprovando os resultados mostrados anteriormente, onde os constituintes presentes na amostra de suplemento

isolado e hidrolizado não interferiram na determinação de proteínas, gerando resultados confiáveis nessas análises.

Figura 12 - Curvas de calibração preparadas com soluções de padrão de BSA (representados por quadrados verdes) e amostras de suplementos à base de soro de leite (representados por triângulos azuis).



Fonte: da autora (2021).

#### 4.4.2 Linearidade

O desempenho da metodologia proposta foi avaliado em termos de linearidade nas condições otimizadas através da construção de uma curva analítica nas concentrações de 2 a 10 mg.mL<sup>-1</sup> de solução padrão de BSA *versus* o sinal analítico obtido no tratamento das imagens. Para cada concentração, uma média de três repetições independentes foi utilizada, o objetivo foi avaliar a presença de regressão linear adequada e ausência do desvio de linearidade (BRASIL, 2018a).

O *r* assegura uma estimativa da qualidade da curva obtida, visto que, quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do grupo de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados. As retas de regressão linear são representadas por meio da seguinte equação:  $y = ax + b$ . A ANVISA recomenda um  $r \geq 0,99$  (BRASIL, 2017).



#### 4.4.3 Limite de detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção é representado pela menor quantidade do analito, presente em uma amostra que é capaz de ser detectado, todavia não necessariamente quantificado.

Em contrapartida, o limite de quantificação caracteriza-se pela menor quantidade de analito presente em uma amostra, podendo ser estabelecido com precisão e exatidão aceitáveis em condições experimentais determinadas (BRASIL, 2017).

O limite de detecção (LOD) foi estimado através dos sinais analíticos obtidos em 10 determinações de branco. A seguinte equação foi utilizada para o cálculo: (INMETRO, 2020):

$$\text{LOD} = 3,3 s / b$$

O valor encontrado foi de  $0,51 \text{ mg.mL}^{-1}$ , representando a menor quantidade de proteína que pode ser detectada nas amostras de suplemento de soro de leite analisadas. Para a avaliação do limite de quantificação (LOQ), foi empregada a seguinte equação:

$$\text{LOQ} = 10 s / b$$

O valor encontrado foi de  $1,55 \text{ mg.mL}^{-1}$ , representando a menor quantidade de proteína que pode ser quantificada nas amostras de suplemento de soro de leite analisadas.

Os resultados apresentados asseguram que o método analítico proposto detectou e quantificou concentrações baixas de proteína com segurança, podendo ser aplicado com confiabilidade na determinação e quantificação do analito em questão em suplementos formulados à base de soro de leite.

#### 4.4.4 Precisão

Normalmente a precisão é determinada para condições específicas de medição, as três formas mais gerais de expressá-las são através da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, expressas por meio do desvio padrão e o coeficiente de variação. O desvio padrão relativo (DPR) é expresso em %, sendo calculado através da seguinte equação:  $\text{DPR} = (\text{DP} / \text{CMD}) \times 100$ , onde DP é representado pelo desvio padrão e CMD é caracterizado pela concentração média determinada (INMETRO, 2020).

Para avaliar a repetibilidade de medição deve ser seguido um conjunto de medições, incluindo o mesmo procedimento de medidas, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local (INMETRO, 2020).

Já as determinações de precisão intermediária devem expressar proximidade entre os resultados da análise da mesma amostra, em pelo menos dois dias diferentes por operadores distintos e abranger as mesmas concentrações e o mesmo número empregado para a repetibilidade (BRASIL, 2017).

Nesse estudo a precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária. Inicialmente foram preparadas soluções de suplemento de soro de leite utilizando 6 réplicas independentes, avaliadas sob a mesma condição de operação. Em seguida, avaliada a precisão intermediária analisada em inter-dia (2 dias) e repetibilidade avaliada intra-dia ( $n = 6$ ), cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.

Para repetibilidade, as amostras contendo 5,86 mg de proteínas apresentaram um RSD de 2,32%. Na precisão intermediária foi realizado um segundo estudo sob as mesmas condições anteriores, empregando 5,84 mg de amostras de suplemento de soro de leite, apresentando um RSD de 2,37%. Em ambos os parâmetros avaliados as amostras demonstraram um RSD acima de 2%. As agências reguladoras recomendam um  $RSD \leq 2\%$  como critério de aceitação, entretanto esses valores foram considerados adequados pelo fato de ser um método colorimétrico sujeito a variações e pelo uso de smartphone na aquisição do sinal analítico, esses valores podem apresentar uma dispersão um pouco maior, e, portanto, acima do preconizado pela ANVISA.

Os valores apresentados na Tabela 4 apresentaram acordo entre os dois experimentos, independente do analista e do dia da análise em condições semelhantes, pois existe proximidade entre os resultados avaliados na precisão. Dessa forma, os critérios avaliados estão de acordo com as diretrizes brasileiras, ou seja, de acordo com o valor recomendado pelo INMETRO (2020) e ANVISA (2017) quando empregados em métodos colorimétricos associados a imagens digitais. Em suma, pode-se afirmar que o método proposto é preciso na faixa estudada.

Tabela 4 - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária.

<b>Repetibilidade e precisão intermediária</b>	<b>Teor (%) <math>\pm</math>DP</b>	<b>DPR (%)</b>
Analista 1	5,86 $\pm$ 0,13	2,32
Analista 2	5,84 $\pm$ 0,13	2,37

Fonte: da autora (2021).

#### 4.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida através do grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

Neste caso a exatidão foi analisada por meio de 9 determinações, englobando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas em cada nível. As amostras para a avaliação da exatidão foram separadas de maneira independente, empregando soluções diluídas da solução padrão de BSA acrescidas à amostra de suplemento de soro de leite, apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Ensaio de recuperação em suplementos à base de soro de leite.

Amostra	Concentração final total (mg)	Concentração da Amostra adicionada (mg mL <sup>-1</sup> )	Adição do padrão BSA (mg mL <sup>-1</sup> )	% Recuperação
R1	5,22	3,08	2,05	103,41
R2	6,13	3,08	3,02	100,33
R3	7,13	3,08	4,0	100,75

Fonte: da autora (2021).

A partir da média dos resultados de cada um dos 3 níveis de concentração analisados, alcançado por meio do ensaio de recuperação, foram obtidas as recuperações apresentadas na tabela 5. Os resultados apresentados demonstram que os ensaios estão na faixa adequada considerando a amostra em estudo e o método analítico envolvendo imagem digital. Cabe ressaltar que o desvio padrão relativo observado em todos os casos foi menor que 10%.

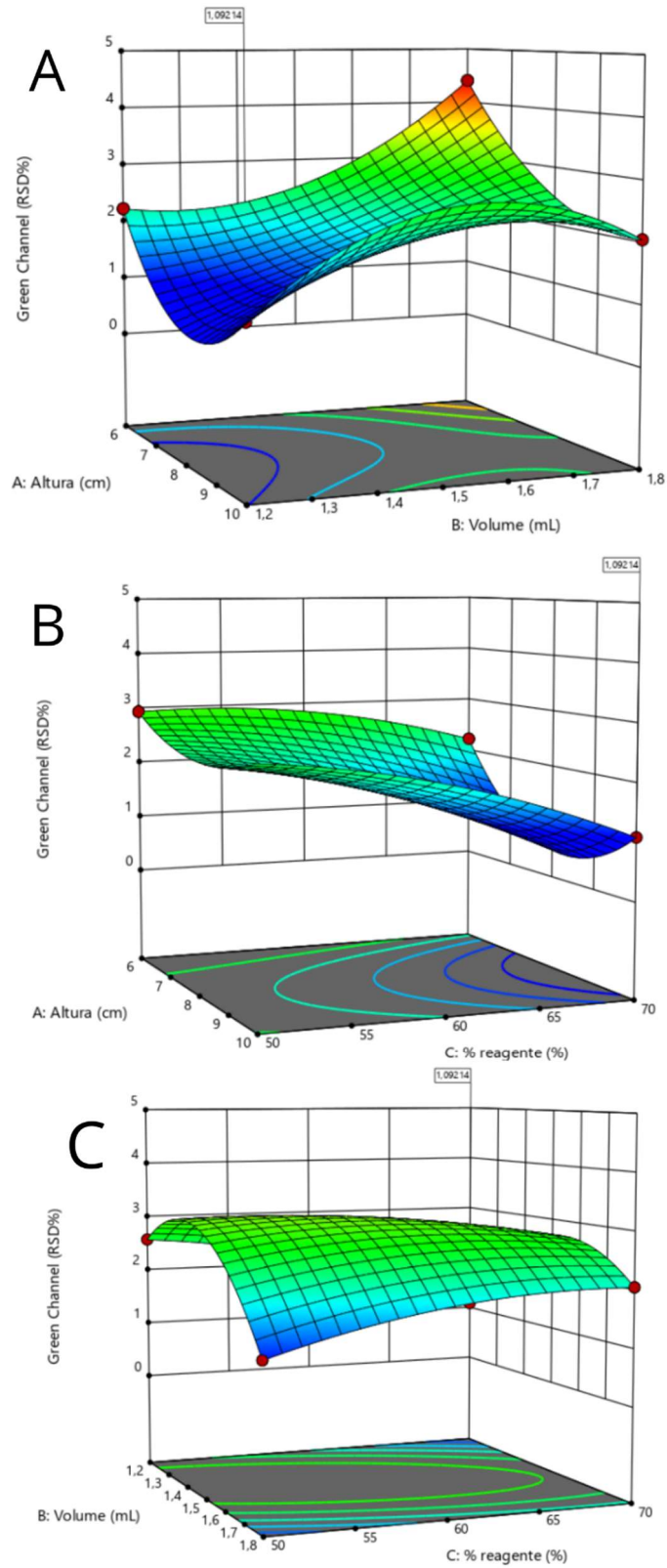
#### 4.4.6 Robustez

A robustez é um parâmetro que indica a sua capacidade de suportar pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas (BRASIL, 2017). O desenho experimental foi o mesmo utilizado na otimização, sendo construída a superfície de resposta a partir do RSD das medidas. No momento de gerar a superfície de resposta foi solicitado que a

mesma apresentasse a condição ideal a partir dos dados de menor desvio padrão relativo (RSD).

A Figura 14 apresenta as variações dos parâmetros avaliados e o RSD obtido nos gráficos de superfície de resposta. Os valores de RSD obtidos não ultrapassaram 0,60% nas condições estudadas e o modelo matemático obtido forneceu as informações necessárias para avaliação do domínio da robustez. Dessa maneira, os resultados indicaram que o método é robusto nas faixas avaliadas: distância 9-10 cm (Fig. 14A), % do reagente 55-65 (Fig 14B) e volume 1,6 – 2,0 mL (Fig 14C).

Figura 13 - Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento experimental para estudar a influência de dois fatores nos parâmetros avaliados.



Fonte: da autora (2021).

## 5. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS COM A METODOLOGIA CONVENCIONAL: ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS

Para fins de comprovação da exatidão e concordância dos resultados obtidos pelo método analítico proposto, as amostras foram avaliadas através da metodologia convencional para a quantificação de proteínas empregando espectrofotometria no UV-Vis.

No método convencional foram utilizadas soluções nas mesmas concentrações empregadas no método analítico proposto. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no UV-Vis em um comprimento de onda de 540 nm. Na totalidade foram avaliadas 14 amostras de suplementos à base de soro de leite, de abrangência nacional com sabores diversificados, conforme descrito na Tabela 2 da seção 3.2. Na Tabela 6 estão apresentados a concentração de suplementos a base de soro de leite, expressos em mg/mL, empregando o método analítico proposto comparando os resultados obtidos através do método convencional por espectrofotometria no UV-Vis e os respectivos erros relativos das amostras analisadas.

Tabela 6- Resultados da determinação de proteínas em suplementos alimentares formulados à base de soro de leite (n = 14).

Amostras	Tipo*	Sinal G	Concentração método proposto (mg.mL <sup>-1</sup> )	Teor método proposto (%)	Teor método de referência (%)	Erro relativo (%)
1	I	40,80	6,05	101,93	102,90	1,94
2	I	42,06	6,23	103,89	102,90	-0,95
3	I	39,73	5,90	98,47	99,18	0,75
4	IH	40,73	6,04	100,78	101,33	0,55
5	IH	45,23	6,67	111,29	104,07	-6,48
6	IH	43,23	6,39	106,62	103,68	-2,75
7	CIH	68,56	9,94	165,81	180,17*	-8,65
8	CIH	64,23	9,34	155,69	171,56*	-10,19
9	CIH	33,56	5,04	84,03	82,16*	-2,22
10	V	41,90	6,21	103,51	103,29	-0,20
11	C	33,56	5,04	84,03	69,06*	-17,82

(continua)

(continuação)

12	C	33,73	5,06	84,42	101,14	19,79
13	C	42,40	6,28	104,67	116,79*	11,57
14	C	43,56	6,44	107,40	116,00*	8,01

I = Isolado, H = Hidrolisado, C = concentrado, V = proteína vegetal.

\* Amostras com teor em desacordo com a faixa recomendada.

Fonte: da autora (2021).

Como visto na Tabela 6, os valores encontrados no método proposto para as amostras contendo proteína isolada e isolada/hidrolisada (amostras 1-6) são concordantes com o método de referência e os erros relativos estão dentro dos limites aceitáveis. Estas amostras encontram-se com proporções proteicas adequadas e autorizadas para a comercialização, sustentadas pela Resolução nº 243 da ANVISA (BRASIL, 2018). As amostras 4, 5 e 6 apresentam na sua formulação, além da proteína isolada, a proteína hidrolisada, ou seja, a composição está acima de 90% de proteínas de alto grau de pureza, não apresentando outros constituintes na matriz que poderiam causar erros na análise. Uma exceção corresponde a amostra 5, apresentando um erro de análise superior ao aceitável (6,48%), esse fato pode ser atribuído a interferência em relação a aquisição da imagem digital, devido à coloração marrom do suplemento.

Os resultados obtidos indicam que o método analítico proposto baseado em imagens digitais demonstrou resposta adequada na análise de suplementos proteicos formulados com proteína isolada ou isolada/hidrolisada. Além disso, em comparativo com o método por espectrometria no UV Visível, o método proposto demonstrou confiabilidade de resultados, utilizando uma ampla faixa de trabalho, com linearidade adequada e elevada sensibilidade.

No que tange às recomendações proteicas do produto, as amostras em questão estão de acordo com a legislação brasileira. A norma técnica preconiza como critério que fabricantes devem garantir os limites de proteínas apresentados na tabela nutricional dos rótulos. Esses requisitos devem ser garantidos através de estudos científicos de controle de qualidade (BRASIL, 2018b).

Em relação às amostras contendo “Blends 3W” (amostras 7, 8 e 9) ou seja, contendo proteína concentrada, hidrolisada e isolada, houve dificuldade na homogeneização e interferência na determinação pelo método oficial para as amostras 7 e 8. Essa problemática se deve à presença de constituintes insolúveis na matriz, o que causou a dificuldade de homogeneização e aderência de grumos nas paredes do frasco. A amostra 9 mostrou resultado

satisfatório e as características relatadas de insolubilidade da matriz não interferiram na quantificação.

A amostra 10 tem como característica principal conter em sua formulação exclusivamente proteína vegetal, além disso não apresentou insolubilidade e coloração após reconstituição em água, não havendo interferência na determinação da proteína pelo método proposto e pelo método oficial.

Em relação às amostras contendo proteína concentrada, os resultados não foram satisfatórios apresentando discordância entre os achados. De acordo com os erros relativos demonstrados na Tabela 6, houve uma diferença nos resultados encontrados para o método baseado em imagens digitais em relação ao método convencional, sendo que para as amostras contendo proteína concentrada associada à coloração marrom (amostras 11, 13 e 14), o método convencional apresentou valores acima do declarado no rótulo do produto.

Os constituintes existentes na matriz dessas amostras podem ser os responsáveis pelas alterações mencionadas, sendo eles, lipídios, lactose, amido e carboidratos, além de corantes e flavorizantes com coloração marrom, os quais podem levar a um aumento da absorção espectrofotométrica pelo método de Biureto e/ou alteração no canal G, levando a resultados em desacordo com o expresso no rótulo do produto.

Desta forma, sugere-se a realização de pesquisas adicionais comparativas utilizando outras metodologias para determinação de proteínas em amostras que apresentam na sua composição carboidratos, lactose, lipídios e componentes que atribuam cor à solução.

Entretando, o método proposto se mostrou uma excelente ferramenta promissora para quantificação de proteínas em suplementos de soro de leite isolado e isolado/hidrolisado e uma excelente alternativa para análises de rotina, podendo colaborar positivamente no controle de qualidade desses produtos. Além disso, apresenta baixo custo, análise rápida de adequação aos princípios da química verde.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma nova metodologia para a determinação de proteínas em amostras de suplementos isolados e isolado/hidrolisado formulados à base de soro de leite foi desenvolvida. O método pode ser aplicado com sucesso para a quantificação do analito na matriz selecionada. Esse método analítico emprega baixas quantidades de amostra e reagentes químicos, quando comparado a outras metodologias descritas na literatura. Além disso, evita a contaminação do meio ambiente com rotinas de Laboratórios de Pesquisa, que muitas vezes realizam descartes inadequados de solventes químicos. As vantagens desse método colorimétrico empregando imagens digitais incluem a simplicidade operacional e baixo custo analítico. Essa metodologia validada é ambientalmente adequada com os princípios da Química Verde, apresentando baixo consumo de reagentes nas amostras, produzindo assim, baixa adição de reagentes nas amostras, conseqüentemente produzindo diminuição formação de resíduos durante as avaliações. Outras características importantes do método proposto estão relacionadas ao fato de não necessitar de nenhum tipo instrumentação com alto custo de aquisição e operação e não requer pré-tratamentos de amostra demorados, sendo confinado apenas em filtração e homogeneização das soluções.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, O. et al. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. **Food chemistry**, v. 246, p. 6-17, 2018.

AGRAWAL, A. et al. Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116383, 2021.

AGUIRRE, M. Á. et al. Point-of-use detection of ascorbic acid using a spectrometric smartphone-based system. **Food chemistry**, v. 272, p. 141-147, 2019.

AHMAD, T. et al. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 361-372, 2019.

AIT-ERRAYESS, S.; IDRISSE, L.; AMINE, A. Smartphone-based colorimetric determination of sulfadiazine and sulfasalazine in pharmaceutical and veterinary formulations. **Instrumentation Science & Technology**, v. 46, n. 6, p. 656-675, 2018.

ALAEDINI, S. et al. Survey of protein-based sport supplements for illegally added anabolic steroids methyltestosterone and 4-androstenedione by UPLC-MS/MS. **Steroids**, v. 165, p. 108758, 2021.

ANDRADE, J. et al. FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 166-172, 2019.

BERGIA III, R. E.; HUDSON, J. L.; CAMPBELL, W. W. Effect of whey protein supplementation on body composition changes in women: A systematic review and meta-analysis. **Nutrition reviews**, v. 76, n. 7, p. 539-551, 2018.

BARRETO, J. A. et al. Pressure variation in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction associated with digital image colorimetry: Determination of cobalt in food samples. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105064, 2020.

BERNARDO, W. L.C. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles and extracts of *Syzygium cumini* flowers and seeds: Periodontal, cariogenic and opportunistic pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 125, p. 105101, 2021.

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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, **RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Diário Oficial da União [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde 2017. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412). Acesso em: 12 ago.2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, **RDC nº 243**, de 26 de julho de 2018a. Diário Oficial da União [Internet]. Brasília, DF: Ministério

da Saúde, 2018. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917). Acesso em: 12 ago.2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, **RDC nº 37**, de 06 de julho de 2009. Diário Oficial da União [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009, Seção 1. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0037\\_06\\_07\\_2009.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0037_06_07_2009.html). Acesso em: 12 ago.2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. 2018b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/arquivos-metodos-da-area-poa-ia/ManualdeMtodosOficiaisparaAnlisedeAlimentosdeOrigemAnimal2ed.pdf>

BRESTRICH, N. et al. Selective protein quantification for preparative chromatography using variable pathlength UV/Vis spectroscopy and partial least squares regression. **Chemical Engineering Science**, v. 176, p. 157-164, 2018.

BURKE, N. et al. A comparison of analytical test methods in dairy processing. **Food Control**, v. 121, p. 107637, 2021.

CAMARGO, L. R.; DONEDA, D.; OLIVEIRA, V. R. Whey protein ingestion in elderly diet and the association with physical, performance and clinical outcomes. **Experimental gerontology**, v. 137, p. 110936, 2020.

CARMO, A. C. M.; PEREIRA, R. S.; GRATIERI, T. Brazilian requirements for stability indicating methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 58-63, 2018.

CARTER, B. G. et al. Invited review: Microfiltration-derived casein and whey proteins from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, 2021.

CASTRO, L. H. et al. Comparative meta-analysis of the effect of concentrated, hydrolyzed, and isolated whey protein supplementation on body composition of physical activity practitioners. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2047, 2019.

CENCI, I. de O. et al. Comparison between barley malt protein quantification methods. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, 2020.

CERRATO-ALVAREZ, M. et al. A portable, low-cost, smartphone assisted methodology for on-site measurement of NO<sub>2</sub> levels in ambient air by selective chemical reactivity and digital image analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 338, p. 129867, 2021.

CHEIBUB, A. M. de S. S. et al. Development and validation of a multipurpose and multicomponent method for the simultaneous determination of six synthetic dyes in different foodstuffs by HPLC-UV-DAD. **Food chemistry**, v. 323, p. 126811, 2020.

CHEN, W. et al. Application of smartphone-based spectroscopy to biosample analysis: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 112788, 2020.

CID-BARRIO, L. et al. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 104, p. 148-159, 2018.

COSTA, R. A. et al. Quantification of milk adulterants (starch, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and NaClO) using colorimetric assays coupled to smartphone image analysis. **Microchemical Journal**, v. 156, p. 104968, 2020.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. et al. Validation requirements of screening analytical methods based on scenario-specified applicability indicators. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 122, p. 115705, 2020.

CUI, P. et al. Non-invasive detection of medicines and edible products by direct measurement through vials using near-infrared spectroscopy: A review. **Infrared Physics & Technology**, p. 103687, 2021.

DASHTI, H. S. et al. Genome-wide association study of breakfast skipping links clock regulation with food timing. **The American journal of clinical nutrition**, v. 110, n. 2, p. 473-484, 2019.

DAVIES, R. W.; CARSON, B. P.; JAKEMAN, P. M. The effect of whey protein supplementation on the temporal recovery of muscle function following resistance training: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 221, 2018.

DE JESUS, J. R.; GUIMARÃES, I. C.; ARRUDA, M. A. Z. Quantifying proteins at microgram levels integrating gel electrophoresis and smartphone technology. **Journal of proteomics**, v. 198, p. 45-49, 2019.

DENHOLM, K. et al. Comparison of tests for failure of passive transfer in neonatal calf serum using total protein refractometry and the biuret method. **Preventive Veterinary Medicine**, p. 105290, 2021

DWYER, J. T.; COATES, P. M.; SMITH, M. J. Dietary supplements: regulatory challenges and research resources. **Nutrients**, v. 10, n. 1, p. 41, 2018.

FALLER, A. C. et al. Investigating appropriate molecular and chemical methods for ingredient identity testing of plant-based protein powder dietary supplements. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

FAN, Y. et al. Digital Image Colorimetry on Smartphone for Chemical Analysis: A Review. **Measurement**, p. 108829, 2020.

FELZ, S. et al. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). **Water research**, v. 157, p. 201-208, 2019.

FERNANDES, G. M. et al. Novel approaches to colorimetric measurements in analytical chemistry—A review. **Analytica Chimica Acta**, 2020.

FERRARIS, Q. et al. Phospholipid analysis in whey protein products using hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection in an industry setting. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 11079-11085, 2020.

FU, L. et al. Application of consumer RGB-D cameras for fruit detection and localization in field: A critical review. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 177, p. 105687, 2020.

GARNEAU, B. et al. A comprehensive analytical process, from NPS threat identification to systematic screening: Method validation and one-year prevalence study. **Forensic science international**, v. 318, p. 110595, 2021.

GARRIDO, B. C. et al. Proteomics in quality control: whey protein-based supplements. **Journal of proteomics**, v. 147, p. 48-55, 2016.

GARTHE, I.; MAUGHAN, R. J. Athletes and supplements: prevalence and perspectives. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 28, n. 2, p. 126-138, 2018.

GOVINDASAMY, B. et al. Evaluation of Salmonella bongori derived biosurfactants and its extracellular protein separation by SDS-PAGE using petridishes: A simply modified approach. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 156-167, 2019.

GUO, Z. et al. Intelligent evaluation of taste constituents and polyphenols-to-amino acids ratio in matcha tea powder using near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 353, p. 129372, 2021.

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, n. 2, p. 751-766, 1949.

HALLAK, J. Protein supplements for physical enhancement and male reproductive health: Are there potential reasons for concern in an uncontrolled, unregulated, and widespread abuse scenario?. **Fertility and Sterility**, v. 114, n. 1, p. 61-62, 2020.

HAMEDPOUR, V. et al. Chemometric challenges in development of paper-based analytical devices: Optimization and image processing. **Analytica chimica acta**, v. 1101, p. 1-8, 2020.

HELFER, G. A. et al. PhotoMetrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 2, p. 328-335, 2017.

HESPANHOL, M. C.; SOUZA, J. C.; PASQUINI, C. Feasibility of a portable, low-cost near-infrared spectrophotometer for the quality screening of omega-3 dietary supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 189, p. 113436, 2020.

HINNENKAMP, C.; ISMAIL, B. P. A Proteomics Approach to Characterizing Limited Hydrolysis of Whey Protein Concentrate. **Food Chemistry**, p. 129235, 2021.

HOLKEM, A. P. et al. A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. **Fuel**, v. 289, p. 119941, 2021.

HONG, F. W.; CHIA, K. S. A review on recent near infrared spectroscopic measurement setups and their challenges. **Measurement**, p. 108732, 2020.

ICASIO-HERNÁNDEZ, O. et al. Validation of the network method for evaluating uncertainty and improvement of geometry error parameters of a laser tracker. **Precision Engineering**, v. 72, p. 664-679, 2021.

ILTCHENCO, S. et al. Whey protein concentration by ultrafiltration and study of functional properties. **Ciência Rural**, v. 48, n. 5, 2018.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, **Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2020. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa\\_link.asp?seq\\_tipo\\_documento=5&cod\\_uo\\_numeracao=00774&num\\_documento=008](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008). Acesso em: 14 set. 2021.

JIA, M. et al. Identification of Chinese teas by a colorimetric sensor array based on tea polyphenol induced indicator displacement assay. **Food Chemistry**, v. 335, p. 127566, 2021.

KADIAN, N. et al. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 126, p. 83-97, 2016.

KALINOWSKA, K.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. Smartphones as tools for equitable food quality assessment. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

KANCHI, S. et al. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 136-149, 2018.

KARPIK, A.; MACHNIAK, M.; CHWAŁCZYNSKA, A. Evaluation of Protein Content in the Diet of Amateur Male Bodybuilder. **American Journal of Men's Health**, v. 14, n. 6, p. 1557988320970267, 2020.

LECH, M. Optimisation of protein-free waste whey supplementation used for the industrial microbiological production of lactic acid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 157, p. 107531, 2020.

LI, J.; ZHAO, Y.; JIANG, X. Quantitative analysis of protein in thermosensitive hydroxypropyl chitin for biomedical applications. **Analytical biochemistry**, v. 599, p. 113745, 2020.

LIMA, M. J. A. et al. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105042, 2020.

LIMA, J. C. et al. Techno-Economic assessment of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin fractionation from whey protein isolated solution using supercritical carbon dioxide in a continuous reactor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 118, p. 87-96, 2021.

LIU, Z.; PAN, J. A practical method for extending the biuret assay to protein determination of corn-based products. **Food chemistry**, v. 224, p. 289-293, 2017.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUO, W. et al. A smartphone-based multi-wavelength photometer for on-site detection of the liquid colorimetric assays for clinical biochemical analyses. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 329, p. 129266, 2021.

MANN, A. S. B.; POTHURAJU, R. R.; BAJAJ, R. K. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: an alternative approach for chemical iron fortification. **Food Research International**, p. 110133, 2021.

MANSUR, A. R. et al. Determination of ethanol in foods and beverages by magnetic stirring-assisted aqueous extraction coupled with GC-FID: A validated method for halal verification. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130526, 2021.

MAROUBO, L. A.; PEDRINA, G.; MELCHERT, W. R. Total sulfonamides determination in bovine milk using smartphone-based digital images. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106657, 2021.

MARTÍNEZ, I. et al. Protein in marine plankton: a comparison of spectrophotometric methods. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 526, p. 151357, 2020.

MARX, M.; BERNAUER, S.; KULOZIK, U. Manufacturing of reverse osmosis whey concentrates with extended shelf life and high protein nativity. **International Dairy Journal**, v. 86, p. 57-64, 2018.

MARX, M. et al. Manufacturing of demineralized whey concentrates with extended shelf life: Impact of the degree of demineralization on functional and microbial quality criteria. **Food and bioproducts processing**, v. 114, p. 1-11, 2019.

MEDINA, D. A. V. et al. Current role of modern chromatography and mass spectrometry in the analysis of mycotoxins in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116156, 2020.

MENA-GARCÍA, A. et al. A multi-analytical strategy for evaluation of quality and authenticity of artichoke food supplements for overweight control. **Journal of Chromatography A**, v. 1647, p. 462102, 2021.

MENDES, N. S. et al. Bioanalytical method validation for the quantification of the chlorogenic acid in *Capsicum baccatum* through High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD). **Food chemistry**, v. 325, p. 126929, 2020.

MERLI, D. et al. From smart drugs to smartphone: A colorimetric spot test for the analysis of the synthetic cannabinoid AB-001. **Forensic Chemistry**, v. 14, p. 100167, 2019.

MOLIN, T. R. D. et al. Marco regulatório dos suplementos alimentares e o desafio à saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 53, 2019.

MORTON, R. W. et al. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. **British journal of sports medicine**, v. 52, n. 6, p. 376-384, 2018.

NOWAK, P. M. et al. Overview of the three multicriteria approaches applied to a global assessment of analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116065, 2020.

NOWAK, P. M.; WIETECHEA-POSŁUSZNY, R.; PAWLISZYN, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116223, 2021.

NUNES, L.; TAVARES, G. M. Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. **Trends in food science & technology**, v. 90, p. 88-99, 2019.

NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. **Food chemistry**, v. 270, p. 25-31, 2019.

OLIVEIRA, K. A. et al. Rapid and Inexpensive Colorimetric Detection of Total Serum Protein Using Microzone Plates Wax-Printed on Polyester Films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 2, p. 311-319, 2021.

OSTERTAG, F. et al. Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128176, 2021.

PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. **Measurement**, v. 135, p. 896-904, 2019.

PEI, Y. et al. Impact of whey protein complexation with phytic acid on its emulsification and stabilization properties. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 90-96, 2019.

PEREIRA, C. G. et al. Characterization and detection of adulterated whey protein supplements using stationary and time-resolved fluorescence spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 180-186, 2018.

POMERANTSEV, A. L.; RODIONOVA, O. Y. New Trends in Qualitative Analysis: Performance, Optimization, and Validation of Multi-Class and Soft Models. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116372, 2021.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, p. 115913, 2020.

RAPOSO, F.; BARCELÓ, D. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: an overview from research versus regulatory viewpoints. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116068, 2020.



REZAZADEH, M. et al. The modern role of smartphones in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 548-555, 2019.

RIGANO, F. et al. High-performance liquid chromatography combined with electron ionization mass spectrometry: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 112-122, 2019.

ROBERTS, B. M. et al. Nutritional recommendations for physique athletes. **Journal of human kinetics**, v. 71, n. 1, p. 79-108, 2020.

ROPELEWSKA, E.; MIESZCZAKOWSKA-FRĄC, M.; KRUCZYŃSKA, D. The evaluation of the usefulness of textures from cross-section images obtained using a digital camera and a flatbed scanner for cultivar discrimination of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). **Food Control**, v. 131, p. 108447, 2021.

SAFDARIAN, M.; HASHEMI, P.; GHIASVAND, A. A fast and simple method for determination of  $\beta$ -carotene in commercial fruit juice by cloud point extraction-cold column trapping combined with UV-Vis spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128481, 2021.

SÁNCHEZ-OLIVER, A. J. et al. Quality analysis of commercial protein powder supplements and relation to characteristics declared by manufacturer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 100-108, 2018.

SÁNCHEZ-OLIVER, A. J.; GRIMALDI-PUYANA, M.; DOMÍNGUEZ, R. Evaluation and behavior of spanish bodybuilders: Doping and sports supplements. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, p. 122, 2019.

SANGSIN, S.; SRIVILAI, P.; TONGRAUNG, P. Colorimetric detection of Cr<sup>3+</sup> in dietary supplements using a smartphone based on EDTA and tannic acid-modified silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 246, p. 119050, 2021.

SHENDE, P.; PRABHAKAR, B.; PATIL, A. Color changing sensors: a multimodal system for integrated screening. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 121, p. 115687, 2019.

SHEROVSKI, P.; STOJKOVIĆ, G.; RISTOVSKA, N. Development, validation and application of first derivative spectroscopy ratio method for estimation of Bradford assay. **Analytical biochemistry**, v. 558, p. 35-40, 2018.

SILVA, A. F. S.; GONÇALVES, I. C.; ROCHA, F. R. P. Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. **Food Control**, p. 107956, 2021.

SILVA, A. F. S.; ROCHA, F. R. P. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. **Food Control**, v. 115, p. 107299, 2020.

SINGH, G. et al. Analytical Challenges and Recent Advances in the Identification and Quantitation of Extractables and Leachables in Pharmaceutical and Medical Products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116286, 2021.

SLABI, S. A. et al. A new SE-HPLC method for simultaneous quantification of proteins and main phenolic compounds from sunflower meal aqueous extracts. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 411, n. 10, p. 2089-2099, 2019.

SMITH, G. I. et al. Effect of protein supplementation during diet-induced weight loss on muscle mass and strength: a randomized controlled study. **Obesity**, v. 26, n. 5, p. 854-861, 2018.

SOARES, S.; LIMA, M. J. A.; ROCHA, F. R. P. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 195-199, 2017.

SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Spot test for determination of uric acid in saliva by smartphone-based digital images: A new proposal for detecting kidney dysfunctions. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105862, 2021.

SOUZA, R. C. Z. et al. Validation of an analytical method for the determination of the main ayahuasca active compounds and application to real ayahuasca samples from Brazil. **Journal of Chromatography B**, v. 1124, p. 197-203, 2019.

STANLEY, E. H. et al. Comparison of total nitrogen data from direct and Kjeldahl-based approaches in integrated data sets. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 17, n. 12, p. 639-649, 2019.

SVEČNJAK, L. et al. Validation of analytical methods for the detection of beeswax adulteration with a focus on paraffin. **Food Control**, v. 120, p. 107503, 2021.

TAO, D. et al. Facile high-performance liquid chromatography mass spectrometry method for analysis of cyclocreatine and phosphocyclocreatine in complex mixtures of amino acids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 25, p. 7190-7196, 2019.

TIUFTIAKOV, N. Y. et al. Digital color analysis for colorimetric signal processing: towards an analytically justified choice of acquisition technique and color space. **Sensors and Actuators B: Chemical**, p. 130274, 2021.

TORIBIO, L. et al. Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry: A valuable tool in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116350, 2021.

URIARTE, D. et al. Simple-to-use and portable device for free chlorine determination based on microwave-assisted synthesized carbon dots and smartphone images. **Talanta**, v. 229, p. 122298, 2021.

VEIGA, M. C. et al. Magnetic fields: biomass potential of *Spirulina* sp. for food supplement. **Bioprocess and biosystems engineering**, p. 1-10, 2020.

VS, A. P. et al. Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1231-1245, 2017.

WANG, Y. et al. Rapid in situ analysis of l-histidine and  $\alpha$ -lactose in dietary supplements by fingerprint peaks using terahertz frequency-domain spectroscopy. **Talanta**, v. 208, p. 120469, 2020.

WANG, Y. et al. Development and application of several fluorescent probes in near infrared region. **Dyes and Pigments**, p. 109284, 2021.

WU, G. et al. Functionalization of bovine whey proteins by dietary phenolics from molecular-level fabrications and mixture-level combinations. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

XUE, C. et al. Effects of amides from pungent spices on the free and protein-bound heterocyclic amine profiles of roast beef patties by UPLC–MS/MS and multivariate statistical analysis. **Food Research International**, v. 135, p. 109299, 2020.

YUSUFU, D.; MILLS, A. Spectrophotometric and Digital Colour Colourimetric (DCC) analysis of colour-based indicators. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 273, p. 1187-1194, 2018.

ZAHRA, AL-T. A comparative study of determination the spectral characteristics of serum total protein among laser system and spectrophotometric: advantage and limitation of suggested methods. **Current Analytical Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 583-590, 2019.

ZHENG, K. et al. Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. **Measurement**, v. 112, p. 16-21, 2017.

ZOU, Y. C. et al. Interactions of grape seed procyanidins with soy protein isolate: Contributing antioxidant and stability properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, p. 108465, 2019.