

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

DAIANE DANIEL

**Proteínas: uma revisão e estudo de caso**

SÃO CARLOS  
2023

Daiane Daniel

## **Proteínas: uma revisão e estudo de caso**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado em Química da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dra. Roberta Cerasi Urban

SÃO CARLOS  
2023

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma com a minha jornada dentro da UFSCar.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Osmar e Elisa, que são minha base para tudo na vida, que fizeram o possível e o impossível para que eu tivesse sempre a melhor educação, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim e nunca mediram esforços para realizarem os meus sonhos. Amo vocês imensamente.

À minha Vó Lidia e meus tios Leny e Jeff, que sempre cuidaram de mim como se eu fosse única, que torceram por mim na minha jornada, que se preocuparam comigo sempre, amo vocês imensamente.

À minha orientadora Roberta Cerasi Urban, um exemplo de pessoa e profissional, que sempre se mostrou extremamente presente e atenciosa, me ajudando com todas as dúvidas. Além de todos os ensinamentos que me ajudaram a crescer profissionalmente.

À minha gatinha Nina que passou junto comigo todos os momentos felizes e tristes dentro da universidade e na vida, que desde que a adotei, ela se tornou o meu maior suporte emocional para sempre seguir em frente.

À minha irmã de consideração Beatrice, que mesmo sabendo de todos os meus defeitos permaneceu ao meu lado até os dias de hoje, vivemos intensamente esses anos maravilhosos na graduação, passamos juntas por altos e baixos, mas conseguimos superar as adversidades da vida. Levarei sempre você para minha vida toda.

À família que São Carlos me deu, em especial Fran, Mari, Diego, Gabriel, Edson, Ticiane, Carlos e Lívia por compartilharem comigo toda a vida nesses anos de graduação, passando juntos por altos e baixos, e por todos os momentos incríveis que vivemos. Levarei vocês para vida toda.

Ao meu time de Voleibol, em especial Vanessa, Maria, Bruna, Ludmilla, Ana, Marina e a ambos os meus técnicos Lucas e Labaki, que me proporcionaram os melhores momentos dentro e fora de quadra, e me ensinaram que somos mais que um time, somos uma grande família.

Aos amigos do laboratório LBFE onde realizei minha IC, em especial minha orientadora Dulce e a Bruna por todas as trocas, ensinamentos e por terem me ensinado a ser a profissional, que sou hoje.

Agradeço por cada pessoa que contribuiu em meu caminho ajudando na conquista do meu sonho.

E por fim, à UFSCar, que me proporcionou os melhores anos da minha vida. Nunca vou esquecer o que vivi e todo aprendizado que carrego comigo nos dias de hoje.

## RESUMO

Neste trabalho de conclusão de curso foi realizada uma revisão sobre proteínas e suas funções, e metodologias de análise de identificação e quantificação. As proteínas, biomoléculas essenciais, são formadas por aminoácidos conectados por ligações peptídicas, organizados em polipeptídeos com estruturas complexas. Embora a ingestão alimentar seja crucial e uma das fontes para a obtenção de proteínas, alguns organismos não conseguem produzir nove proteínas essenciais. Além disso, as ingestões podem ser insuficientes para suprir as necessidades dos organismos, e, portanto, muitas dietas requerem suplementação. Para tal, é importante avaliar as concentrações de proteínas nos alimentos, assim como nos organismos. As metodologias para estas determinações envolvem extração, isolamento e análise, preservando as proteínas de interações em subcompartimentos celulares específicos. Este estudo investiga os desafios de isolamento e análise de proteínas. Métodos de determinação da concentração total de proteínas, como abordagens espectrofotométricas UV-Vis (biureto, Lowry, Bradford e BCA), são discutidos, enfatizando sua aplicação em diversos ambientes, como plasma sanguíneo e produtos alimentícios. O método Bradford, empregando o azul brilhante Coomassie G-250, destaca-se por sua versatilidade em diversos meios, inclusive no estudo de caso em suplementos esportivos. A evolução da espectrometria de massa e técnicas como ionização por *eletrospray* e MALDI também são exploradas, mostrando seu papel fundamental nos avanços na análise de proteínas. A eletroforese bidimensional em gel de poli(acrilamida) (2D-PAGE) também é considerada uma ferramenta valiosa em análises proteômicas. Este estudo introduziu ainda um novo protocolo utilizando o método colorimétrico de Bradford e aquisição de imagem digital através de uma câmera de telefone celular para determinar proteínas solúveis totais em amostras de suplementos esportivos. A utilização do aplicativo PhotoMetrix para processamento de imagens resultou em um método com exatidão e precisão satisfatórias. O limite de quantificação (LOQ) usando imagens digitais ( $\text{LOQ}=0,0007 \text{ mg mL}^{-1}$  ou  $0,07 \text{ g kg}^{-1}$  de proteínas solúveis totais) demonstrou uma melhoria de 15 vezes em relação aos resultados do espectrofotômetro ( $\text{LOQ}=0,0103 \text{ mg mL}^{-1}$  ou  $1,03 \text{ g kg}^{-1}$ ). Experimentos de recuperação apresentaram resultados satisfatórios (82-112%), indicando precisão comparável ao do método espectrofotométrico de referência. O método proposto provou ser portátil, sensível, exato e preciso oferecendo uma ferramenta valiosa para avaliar a qualidade dos suplementos esportivos e garantir a segurança alimentar dos consumidores, sendo o potencial da aplicação PhotoMetrix no desenvolvimento de métodos (bio)analíticos destacado.

**Palavras-chaves:** Proteínas; Aminoácidos; Suplementos; PhotoMetrix.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Formação de uma ligação peptídica.....	10
<b>Figura 2</b> - Estrutura molecular das proteínas.....	11
<b>Figura 3</b> - Aminoácidos essenciais e não essenciais.....	13
<b>Figura 4</b> - Espectrofotômetro UV-VIS.....	15
<b>Figura 5</b> - Espectrometria de massas principais componentes.....	19
<b>Figura 6</b> - Método de Bradford: Ligação e Coloração.....	21
<b>Figura 7</b> - Soluções de calibração contendo proteínas solúveis (BSA) e o reagente Bradford usadas para obter acurva analítica.....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Trabalhos publicados na literatura científica que utilizaram o aplicativo PhotoMetrix no processamento das imagens digitais em suas metodologias.....	25
<b>Tabela 2</b> - Curvas analíticas obtidos para os diferentes canais avaliados.....	29
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros analíticos obtidos para o método proposto PhotoMetrix e para o método de referência espectrofotométrico.....	30
<b>Tabela 4</b> - Valores obtidos de proteínas solúveis totais das nove amostras de suplementos esportivos pelo método proposto e pelo método de referência.....	31

## SUMÁRIO

1. OBJETIVOS.....	09
2. PROTEÍNAS DEFINIÇÕES E FUNÇÕES.....	10
3. ANÁLISE DE PROTEÍNA .....	14
4. ANÁLISE DE PROTEÍNA OU QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA EM SUPLEMENTOS ESPORTIVOS.....	20
5. ANÁLISE DE PROTEÍNA UTILIZANDO O PHOTOMETRIX: UM ESTUDO DE CASO EM SUPLEMENTOS ESPORTIVOS <i>WHEY PROTEIN</i> .....	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

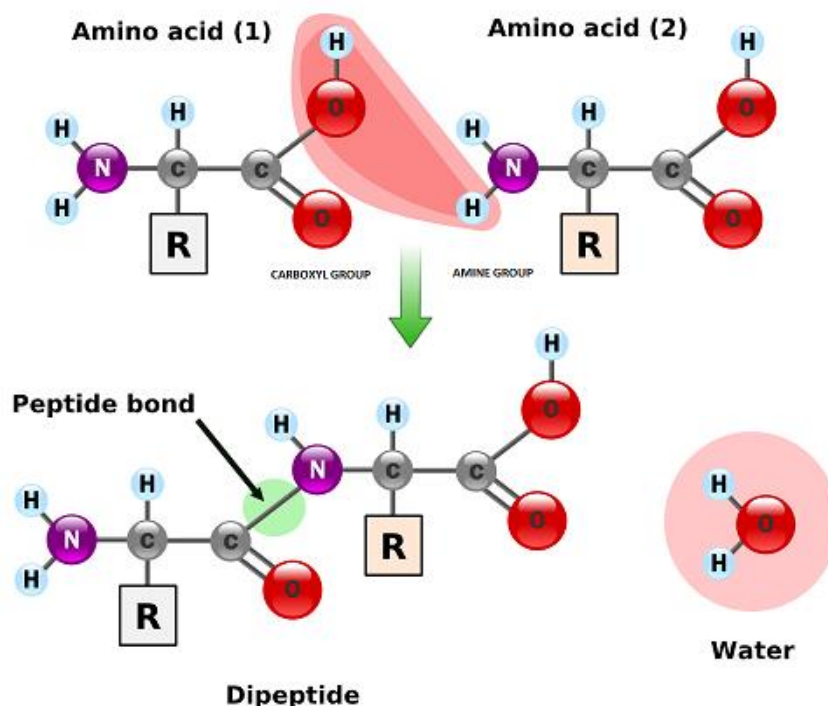
## **1. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi revisar conceitos relacionados às proteínas, apresentando suas definições, funções, classificações e interações, além dos métodos de análise e quantificação de proteínas, principalmente àqueles utilizados em suplementos esportivos. Ademais, como um estudo de caso, foi proposto um novo protocolo de análise de proteínas através do aplicativo de celular PhotoMetrix, o que pode auxiliar para análises mais rápidas, baratas, e acessíveis ao público.

## 2. Proteínas: definições e funções

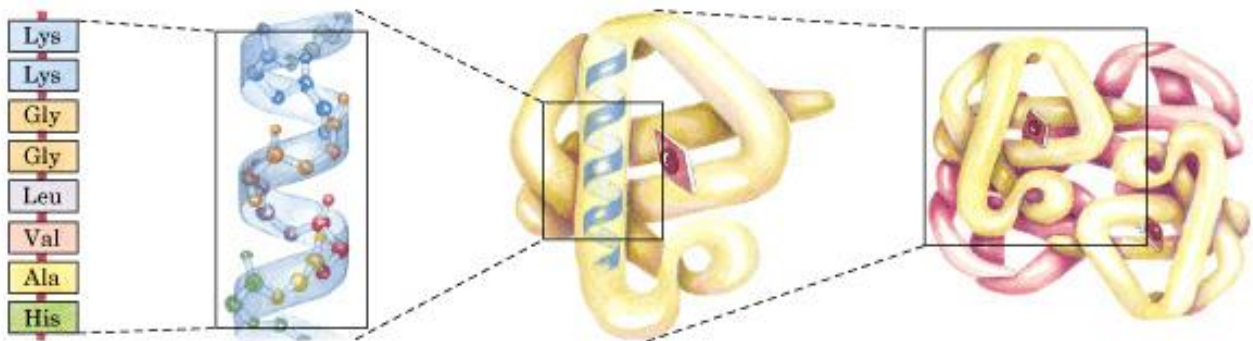
As proteínas são compostas por aminoácidos conectados por ligações peptídicas. Já os aminoácidos são compostos orgânicos constituídos por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, contendo um grupo amina ( $-NH_2$ ) e um grupo carboxila ( $-COOH$ ). Existem 20 aminoácidos distintos que podem ser combinados de várias maneiras para criar diversas proteínas. Os aminoácidos são unidos por ligações peptídicas para formar proteínas. A ligação (Figura 1) ocorre entre a extremidade que possui o grupo funcional amina ( $-NH_2$ ) de um aminoácido e a extremidade que contém o grupo funcional carboxila ( $-COOH$ ) de outro aminoácido. Essa união resulta na formação de uma ligação peptídica, fundamental para a criação de cadeias polipeptídicas e, conseqüentemente, na estruturação das proteínas. Durante esse processo, uma molécula de água é liberada por meio de uma reação de condensação ou desidratação. Uma sequência de aminoácidos ligados entre si forma um peptídeo, e as proteínas consistem em uma ou múltiplas cadeias desses polipeptídeos (JOHNSON, ROHLFS e SILVERMAN, 1999).

Figura 1 - Formação de uma ligação peptídica.



A intrincada estrutura molecular das proteínas (Figura 2) acarreta diferentes níveis de organização. A estrutura primária refere-se ao tipo específico e à sequência linear de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Quando uma proteína se enrola em forma de hélice ou forma estruturas planares em forma de folhas, ou seja, os padrões de dobras locais determinam a estrutura secundária. A estrutura terciária refere-se à conformação tridimensional global com interações entre aminoácidos distantes na cadeia. Por último, a estrutura quaternária descreve proteínas com duas ou mais cadeias polipeptídicas que se entrelaçam e se organizam dentro de uma estrutura tridimensional (HASELKORN, R.; ROTHMAN-DENES, L. B, 1973).

Figura 2 - Estrutura molecular das proteínas.

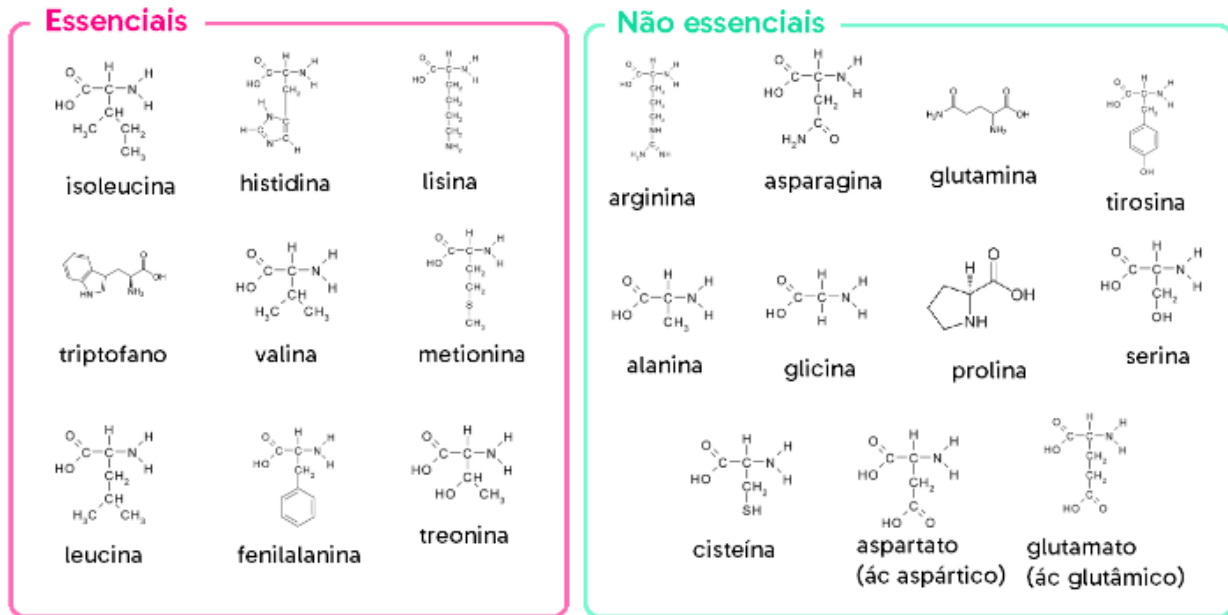


O processo de enovelamento de proteínas é inerentemente complexo. As proteínas passam por inúmeras mudanças conformacionais para atingir estruturas tridimensionais específicas. Cada mudança conformacional é um evento complexo influenciado pelo solvente circundante. Portanto, uma compreensão detalhada dos mecanismos de dobramento de proteínas exige a consideração de uma rede complexa de reações elementares (ONUCHIC e WOLYNES, 2004).

Dadas às complexidades estruturais, as proteínas podem ser categorizadas considerando diversos fatores, como forma, composição e função. Quanto à forma, são classificadas em proteínas fibrosas e globulares. Nas proteínas fibrosas, as cadeias polipeptídicas se entrelaçam como uma corda, como observado na queratina presente no cabelo e nas unhas. Já as proteínas globulares adotam uma configuração mais ou menos esférica, como no caso de anticorpos e enzimas. Em termos de composição, podem ser simples, liberando apenas aminoácidos durante a hidrólise, ou conjugadas, liberando aminoácidos e um radical não peptídico, conhecido como grupo prostético. Quanto à função no organismo, as proteínas se dividem em dois grandes grupos: as dinâmicas, responsáveis por funções como defesa do organismo, transporte de substâncias, catálise de reações e controle do metabolismo; e as estruturais, cuja principal função é a organização das células e tecidos no corpo humano, exemplificadas pelo colágeno e elastina (ONUCHIC e WOLYNES, 2004).

As proteínas desempenham uma ampla gama de funções no corpo, incluindo a composição celular, e são essenciais em todos os processos biológicos. Entre suas funções mais relevantes estão incluídos o transporte de oxigênio (hemoglobina), a defesa contra patógenos (anticorpos), a catálise de reações químicas (enzimas), a atuação como receptores de membrana, a facilitação da contração muscular (actina e miosina) e o desempenho de um papel crucial no crescimento hormonal e formação. Devido a sua importância, a obtenção de proteínas por meio de uma alimentação ou dieta adequada é essencial. No entanto, é importante notar que dentre os 20 aminoácidos conhecidos, o nosso organismo humano não é capaz produzir nove deles que são conhecidos como aminoácidos essenciais: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (HASELKORN e ROTHMANN-DENES, 1973).

Figura 3 – Aminoácidos essenciais e não essenciais.



As proteínas desempenham um papel crucial em uma complexa rede de interações biomoleculares que governam sua função e localização celular. Sendo assim o desenvolvimento de metodologias para determinar proteínas tem, cada vez mais, se tornado fundamental para várias áreas do conhecimento. Neste processo, extrair, isolar e analisar proteínas de subcompartimentos celulares específicos, preservando-as de interações químicas e físicas com outras biomoléculas, tornou-se um requisito essencial (ZHANG et al., 2013).

### 3. Análise de Proteína

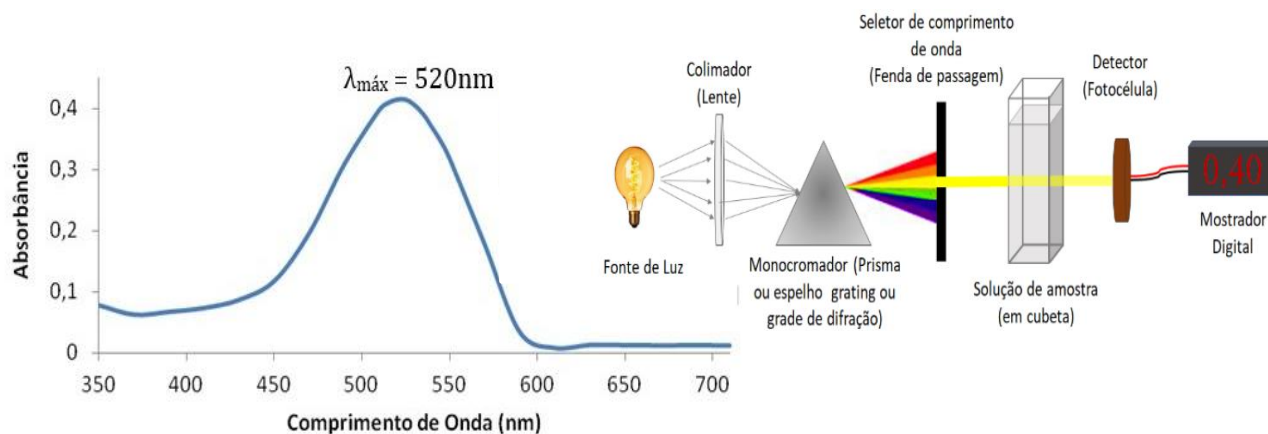
As interações físicas e químicas podem dificultar o isolamento e/ou a análise das proteínas de interesse. Por exemplo, a análise de proteínas incorporadas à membrana não é um processo trivial. O isolamento, a solubilização e a digestão proteolítica de proteínas ligadas a lipídios provaram ser etapas essenciais na sua análise proteômica shotgun, uma técnica de espectrometria de massa de alta definição conhecida como *shotgun proteomics*, na qual as proteínas são digeridas em partes menores, os peptídeos. Cabe destacar que a análise sistemática de todas as proteínas em um tecido ou célula foi popularizada sob o nome de proteômica. Proteínas também foram isoladas de estruturas mais rígidas, como tecido ósseo, utilizando ácido clorídrico, e permitindo a identificação de aproximadamente 2.500 proteínas por meio de proteômica shotgun. A aplicação de técnicas tradicionais de isolamento subcelular, principalmente sedimentação gradiente de sacarose e metodologias semelhantes, em diferentes tipos de células e tecidos também permitiram análises globais de proteínas dentro de compartimentos subcelulares. (ZHANG et al., 2013).

Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais também são muito variados. No entanto, as metodologias espectrofotométricas no ultravioleta e no visível (UV-Vis) do biureto, de Lowry, do “Coomassie brilliant blue” BG-250 ou reagente de Bradford, e do BCA ou reagente de Smith estão entre os mais frequentemente utilizados. (ZAIA et al., 1998).

A espectrofotometria ultravioleta e visível é uma técnica analítica amplamente utilizada em diversos setores laboratoriais para a análise qualitativa e/ou quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos. Especificamente aplicada em áreas como a identificação do princípio ativo em formulações farmacêuticas, a Espectrofotometria UV-VIS baseia-se na medição da absorção/transmissão de radiação eletromagnética nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético (ZHANG et al., 2013; ZAIA et al., 1998).

Os espectrofotômetros UV-VIS são instrumentos que registram dados de absorvância ou transmitância em relação ao comprimento de onda emitido pelo elemento analisado, gerando um "espectro de absorção" ou "espectro de transmissão". Cada espécie química possui uma capacidade única de absorção em comprimentos de onda específicos, permitindo a identificação de compostos por meio de seus espectros de absorção. Esses instrumentos exigem componentes ópticos de quartzo e detectores altamente sensíveis para abranger a ampla faixa espectral de 190 a 1200 nm. Os espectrofotômetros (Figura 3) geralmente consistem em cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para as soluções, detectores e indicadores de sinal. A capacidade de selecionar radiações monocromáticas possibilita determinações quantitativas, seguindo a Lei de Beer-Lambert (ZHANG et al., 2013; ZAIA et al., 1998).

Figura 4 - Espectrofotômetro UV-VIS.



O método do biureto tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios, tais como soro ou plasma sanguíneo (DOUMAS et al., 1981), para líquido cerebral espinhal (FINLEY e WILLIAMS, 1983) e em alimentos como foi descrito por REICHARDT, 1991. O método de Lowry também tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em plasma sanguíneo (SCHLABACH, 1984) e em produtos alimentícios (ŠEBEČIĆ, 1987), além de plantas (MARKS, et al., 1985).

O método proposto por Smith, também conhecido por método BCA se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com o BCA. O BCAA é uma sigla para *Branched-Chain Amino Acids*, que significa aminoácidos de cadeia ramificada, este suplemento esportivo funciona como uma fonte de aminoácidos, especificamente a leucina, isoleucina e valina. Este foi aplicado na determinação da concentração de proteínas totais em células (GOLDSCHMIDT e KIMELBERG, 1989); em leite humano (KELLER e NEVILLE, 1986), além de ser aplicado na determinação de grupos funcionais como demonstrou TYLLIANAKIS, 1994.

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” G-250. Este método é baseado na interação entre o corante G-250 e as macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. Algumas das aplicações de destaque deste método são a determinação de proteínas totais em diversos meios como plasma ou soro sanguíneo (GREER e HUNN, 1990); leite humano (BERGQVIST, FOHLIN e KARLSSON, 1989); em tecidos de plantas (MATTOO, ISHAQ e SALEEMUDDIN, 1987); na urina (WIMSATT e LOTT, 1987); em detergentes (VOGEL et al., 1974) e em suplementos esportivos, o objeto de estudo deste trabalho.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica fundamental empregada para detectar e identificar moléculas de interesse, ao medir suas massas e caracterizar suas estruturas químicas. O princípio essencial de um espectrômetro de massa compreende a geração de íons moleculares, sua separação com base na relação massa/carga ( $m/z$ ) e a subsequente detecção qualitativa e quantitativa, considerando as taxas  $m/z$  e abundância. Essa abordagem viabiliza a identificação de compostos desconhecidos, a quantificação de compostos conhecidos, a elucidação das propriedades químicas e estruturais de uma molécula, a medição da massa molecular

de determinados compostos e a determinação de modificações pós-traducionais em proteínas. Ao longo das últimas décadas, a espectrometria de massa (MS) consolidou-se como uma técnica analítica central na pesquisa de proteínas e biomoléculas em geral. Um amplo leque de novas plataformas analíticas e estratégias experimentais foi desenvolvido, impulsionado pela demanda de caracterização e quantificação de proteínas com alta sensibilidade em amostras complexas. Essa crescente adoção foi acelerada pelo projeto genoma, que exigia a caracterização completa das sequências genômicas, possibilitada pela identificação de peptídeos nas amostras, estabelecendo correlações robustas com bancos de dados de sequência. Vale ressaltar que a técnica também é amplamente utilizada em análises proteômicas (AEBERSOLD e DOMON, 2006).

Sistemas de espectrometria de massas podem ser integrados a diferentes plataformas, como cromatografia líquida, cromatografia gasosa, espectrômetros de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente, entre outros. O LC-MS, conhecido como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, é um dispositivo em que a separação dos compostos ocorre inicialmente em um sistema de cromatografia líquida. Posteriormente, esses compostos são analisados por um detector de massas. A nomenclatura dessa técnica pode variar dependendo do tipo de analisador de massas acoplado ao sistema HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Por exemplo, LC-MS refere-se a HPLC com um detector MS de quadrupolo simples, enquanto LC-MS/MS refere-se a HPLC com um detector MS do tipo triploquádrupolo (tandem) (AEBERSOLD e DOMON, 2006).

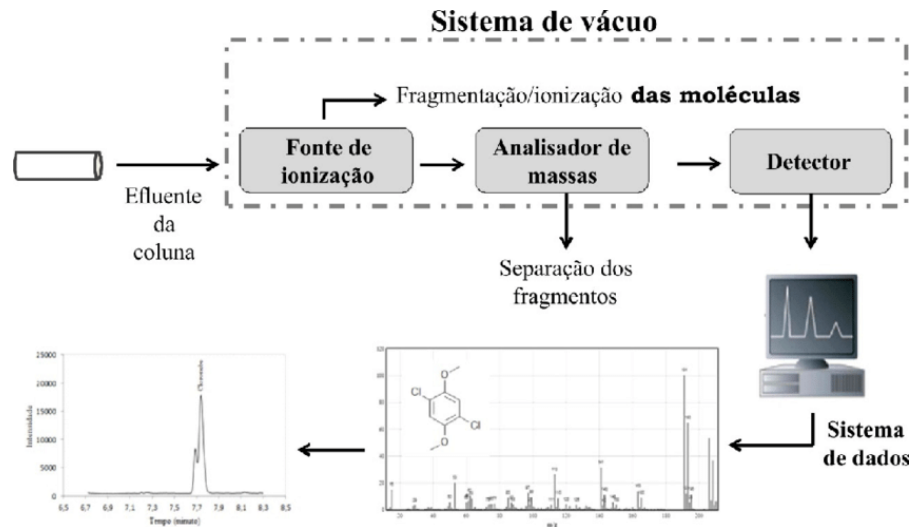
Os principais componentes de um sistema LC-MS incluem o HPLC, responsável pela separação dos componentes da amostra antes da análise pelo detector de massas. A fonte de íons é crucial para a geração de íons moleculares, utilizando métodos como ionização em fase gasosa, dessorção ou evaporação. O analisador de massas desempenha o papel de separar os íons moleculares gerados na fonte de ionização com base nas diferentes relações massa/carga. O detector, por sua vez, identifica os sinais elétricos produzidos durante a análise, utilizando dispositivos como

fotomultiplicadores, multiplicadores de diodo contínuo e placas de micro canais. O sistema de dados é responsável por interpretar esses sinais elétricos, transformando-os em picos cromatográficos e relatórios diversos. Diversos softwares no mercado são projetados para aplicações específicas, como análise de traços, metabolômica e proteômica, oferecendo uma abordagem abrangente para análise de amostras complexas em diversas áreas da pesquisa científica (AEBERSOLD e DOMON, 2006).

A ionização por matriz assistida por laser (MALDI) é uma técnica na espectrometria de massas que se destaca por suas características particulares. Esse método, amplamente utilizado em análises proteômicas, apresenta um processo de ionização suave, preservando a integridade das biomoléculas. Sua eficácia é notável em biomoléculas de elevado peso molecular, sendo aplicado rotineiramente em análises proteômicas. No processo MALDI, um pulso de laser incide sobre uma amostra co-cristalizada com uma matriz apropriada. Essa abordagem se destaca por sua aplicação em análises de polipeptídios, permitindo a formação de íons biomoleculares intactos. As vantagens dessa fonte de ionização incluem a capacidade de lidar com baixas concentrações de analito, rapidez na execução das análises e a habilidade de analisar polímeros e macromoléculas, sejam polares ou não polares, com massa superior a 50.000 kDa (AEBERSOLD e DOMON, 2006).

O desenvolvimento crucial ocorrido no final da década de 1980 introduziu duas técnicas fundamentais: a ionização por eletropulverização e a dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI). Essas inovações foram essenciais para avanços significativos na aplicação da espectrometria de massas em análises de proteínas. No mesmo período, surgiram novos analisadores de massas e instrumentos complexos, como os instrumentos de tempo de voo, projetados para superar desafios nas análises de proteínas e proteoma. Esses equipamentos modernos possibilitam a determinação das massas moleculares dos polipeptídeos, revelando suas características estruturais, incluindo sequência de aminoácidos, locais de ligação e tipos de modificações pós-traducionais (AEBERSOLD e DOMON, 2006).

Figura 5 - Espectrometria de massas principais componentes.



A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) é outra técnica utilizada em análises proteômicas, neste caso para a separação de misturas de proteínas. Este método baseia-se na massa molecular e na carga, e permite a separação de proteínas intactas em um único gel. Após a separação em 2D-PAGE, as proteínas podem ser detectadas por coloração utilizando Coomassie Brilliant Blue ou Silver, e/ou identificadas como proteínas intactas ou peptídeos usando MALDI-MS ou LC-MS após uma digestão em gel. Apesar da maior sensibilidade, a coloração com prata não apresenta linearidade de sinal e é menos compatível com o MS, portanto, o Coomassie Brilliant Blue é mais comumente utilizado (ZHANG et al., 2013).

Embora as separações baseadas em gel 2D sejam utilizadas, com o desenvolvimento das metodologias por LC-MS/MS, esta vem substituindo a anteriormente citada, porém a 1D-SDS-PAGE continua a ser um método de separação padrão para misturas complexas de proteínas com base em seus pesos moleculares. Estas duas podem ainda serem utilizadas em conjunto o que permite a diferenciação de isoformas de proteínas degradadas e a remoção de impurezas com baixo peso molecular como detergentes e componentes tampões, que são prejudiciais para a análises por MS. No entanto, a perda de amostra no gel e SDS residual, podem limitar a sensibilidade e a robustez (ZHANG et al., 2013).

#### **4. Análise de Proteína ou Quantificação de Proteína em Suplementos Esportivos**

Suplementos alimentares são utilizados para complementar uma dieta com o intuito de fornecer: aminoácidos, vitaminas, minerais, fibras, ácidos graxos, entre outros, que não são consumidos em quantidades suficientes na dieta diária do indivíduo (MAUGHAN et al., 2018). *Whey Protein* é um tipo de suplemento alimentar constituído de proteínas extraídas do leite, cuja demanda e utilização por atletas e praticantes de atividades físicas vem aumentando (BAILEY et al., 2012). Utiliza-se o soro do leite por conter altas concentrações de aminoácidos e outros compostos bioativos essenciais para a síntese proteica, o bom funcionamento dos órgãos e de combate de doenças (HSIEH et al., 2015; FRESTEDT et al., 2008; FEKETE et al., 2016; KADAR et al., 2000; WOLFE, 2006; MIGNONE, 2015; KERKSICK et al., 2018).

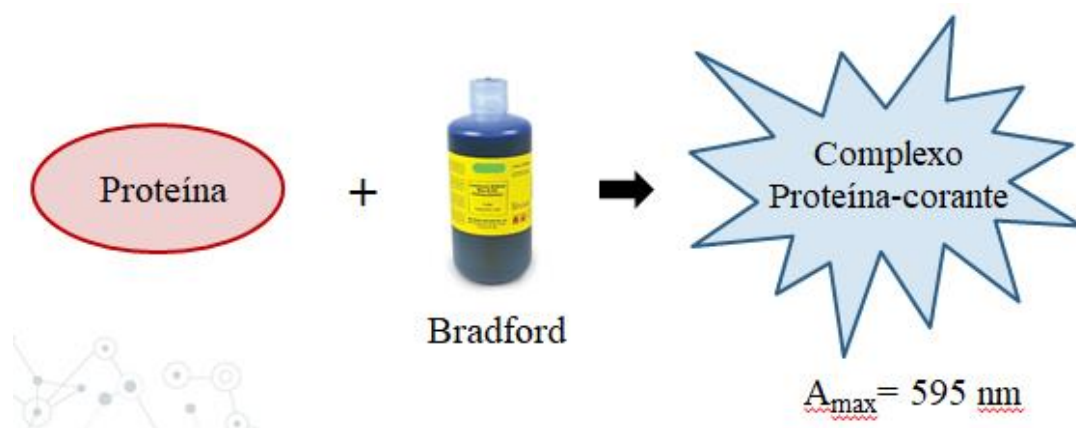
O aumento da síntese proteica está diretamente relacionada aos aminoácidos de cadeia ramificada como valina, leucina, isoleucina, e proteínas solúveis presentes nesses suplementos esportivos, conseqüentemente acarretam aumento da massa muscular, além de contribuir para um perfil hormonal anticatabólico (KERKSICK et al., 2018; SOUSA et al., 2012; BECKER et al., 2016). Este aumento e conservação da massa muscular, a otimização da força corporal, do metabolismo basal e da força óssea, são alguns dos principais motivos para que os atletas e praticantes de atividades físicas façam uso destes suplementos (FRESTEDT et al., 2008; WOLFE, 2006; KRIEGER et al., 2006). Além disso, há uma melhora na composição corporal, no desempenho físico em atividades, na perda de gordura e redução de sintomas de over training (BECKER et al., 2016 ; TAYLOR et al., 2016).

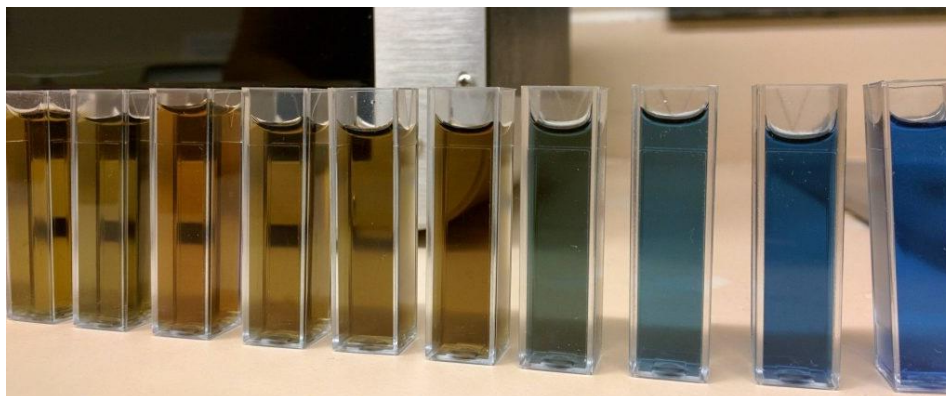
Entretanto, mesmo com todos os benefícios de uma dieta associada à suplementação alimentar, vale ressaltar que a quantidade necessária a ser ingerida por cada indivíduo para que bons resultados sejam obtidos varia (GUEST et al., 2019).

Assim, a exatidão nas concentrações e demais informações contidas nos rótulos dos suplementos comercializados, asseguram ao atleta segurança e confiabilidade no consumo desses suplementos. Além disso, o custo comercial desses suplementos pode estar diretamente relacionado com a concentração das proteínas solúveis totais e por esse motivo é necessário assegurar o teor de proteínas (controle de qualidade) nas formulações. Desse modo, o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e de baixo custo são necessários para quantificar a concentração de proteínas totais em amostras de *whey protein* com precisão e exatidão e proporcionar uma segurança alimentar.

Um dos métodos utilizados para a determinação de proteínas solúveis totais, em diferentes tipos de amostras, é o consolidado método de Bradford, devido a sua reprodutibilidade e alta sensibilidade. Neste método, os resíduos básicos de aminoácidos nas proteínas solúveis totais reagem com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A coloração vermelha-marrom do corante é convertida em uma coloração azul após a ligação, a qual se dá de forma muito rápida. A ligação dos resíduos de aminoácidos ao corante leva a formação de um complexo proteína-corante de coloração azul, o qual possui um alto coeficiente de extinção proporcionando alta sensibilidade (BRADFORD, 1976; SHEROVSKI, STOJKOVIĆ e RISTOVSKA, 2018).

Figura 6 - Método de Bradford: Ligação e Coloração.





Posteriormente, determinações de absorbância do complexo formado são realizadas utilizando espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis (comprimento de onda 595 nm), as quais são proporcionais ao teor proteico das amostras (SHEROVSKI, STOJKOVIĆ e RISTOVSKA, 2018).

Embora os espectrofotômetros possuam um custo relativamente baixo quando comparado a outros equipamentos de espectrometria ótica, este pode ser o limitante para monitoramento rotineiro. Ademais, algumas análises colorimétricas demandam considerável volume de reagente. Nesse contexto, o emprego de dispositivos eletrônicos para detecção colorimétrica tais como câmeras de celulares e fotográficas, scanners e softwares de análise de imagens digitais têm sido empregados no desenvolvimento de métodos qualitativos e quantitativos que sejam de baixo custo, sustentáveis e de fácil acesso, substituindo o uso de equipamentos tradicionais como, por exemplo, o espectrofotômetro (BÖCK et al., 2020; HELFER et al., 2017; SOARES LIMA ROCHA, 2017; COSTA, NEIVA e PEREIRA-FILHO, 2019; HELFER et al., 2018; DIONIZIO et al., 2019).

## **5. Análise de Proteína utilizando o Photometrix: um estudo de caso em suplementos esportivos *Whey Protein***

O PhotoMetrix é um aplicativo de celular desenvolvido para realizar análises de dados através de imagens digitais capturadas pela câmera de smartphones. Estas imagens digitais fornecem dados chamados de pixels, os quais são caracterizados como os menores pontos que formam uma imagem digital, e cada um é composto pelo conjunto de três canais: verde, vermelho e azul. No aplicativo é possível processar as imagens digitais obtidas utilizando vários canais de cores, sendo os principais e mais utilizados: R (vermelho), G (verde) e B (azul) além do vetor RGB (BÖCK et al., 2020; HELFER et al., 2017). O uso de aplicativos como este tem proporcionado alta frequência analítica com aquisição de informações rápidas, portabilidade, detecções com alta resolução e sensibilidade, além de ser uma tecnologia bastante acessível em diversos locais incluindo países com poucos recursos financeiros para o desenvolvimento e emprego de outros métodos analíticos (BÖCK et al., 2020).

O aplicativo PhotoMetrix desenvolvido em 2015 (BÖCK et al., 2020), tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de métodos analíticos colorimétricos para a análise de diferentes tipos de amostras como couro (COSTA, NEIVA e PEREIRA-FILHO, 2019), combustíveis (SOARES; LIMA; ROCHA, 2017), enzimas (DIONIZIO et al., 2019; DE JESUS, GUIMARÃES e ARRUDA, 2019; GUEDES et al., 2020) leite (COSTA et al., 2020), entre outras. O trabalho pioneiro de HELFER et al., 2017, para análises quantitativas, propôs a determinação de ferro em amostras de vitamina, obtendo satisfatórias precisão e exatidão. O rápido processamento das imagens digitais (adquiridas pela câmera do celular) por diferentes canais de cores, aliado aos tratamentos univariado e multivariado, tornam esse aplicativo uma excelente e acessível alternativa para o desenvolvimento de métodos portáteis, e de simples, rápido e automático processamento de dados (BÖCK et al., 2020).

Vários outros analitos foram determinados com exatidão e precisão satisfatórias utilizando esse aplicativo após reação com reagentes cromogênicos. Por exemplo, DE JESUS, GUIMARÃES e ARRUDA, 2019 e DIONIZIO et al., 2019, utilizaram o aplicativo Photometrix no desenvolvimento de métodos bioanalíticos para a determinação de enzimas tais como albumina, imunoglobulina e anidrase em amostras de soro humano e de lactase em formulações usadas por indivíduos com intolerância à lactose. Utilizando a eletroforese em gel com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) para separar e identificar as enzimas, esses métodos possibilitaram determinar essas enzimas com limites de quantificação em micrograma (aproximadamente 2 µg).

Além disso, análises de especiação química de cromo foram realizadas, por meio da reação do Cr VI com 1,5-Difenilcarbazida em amostras de couro (COSTA, NEIVA e PEREIRA-FILHO, 2019), e do Cr III com EDTA e nanopartículas de prata modificadas com ácido tânico em amostras de suplementos (SANGSIN; SRIVILAI; TONGRAUNG, 2021). Outros exemplos de aplicações de aquisição de imagens digitais e o processamento de dados pelo PhotoMetrix incluem análises para verificar a qualidade de leite (COSTA et al., 2020), identificação de extratos de taninos comerciais utilizando análise de componentes principais (PCA) (GRASEL et al., 2016), determinação de etanol em aguardente de cana-de-açúcar usando calibração multivariada (regressão PLS de mínimos quadrados parciais) (BÖCK et al., 2018).

Na tabela 1, pode-se observar um breve resumo destas análises citadas e como os resultados foram obtidos. Esses trabalhos demonstram que a partir de reagentes cromogênicos clássicos e de novas abordagens (como o uso de nanopartículas como reagentes cromogênicos), as análises de proteínas podem ser realizadas com exatidão e precisão, baixo custo e sem demandar analistas altamente qualificados. Portanto, contribuem para o desenvolvimento e a acessibilidade da química analítica e de informações acerca de produtos alimentares.

Tabela 1 - Trabalhos publicados na literatura científica que utilizaram o aplicativo PhotoMetrix no processamento das imagens digitais em suas metodologias.

Amostra	Analito	Reagente cromogênico	Canal	LOQ	Recuperação (%)	RSD (%)	Referências
Comprimidos de vitamina	Fe	1,10-Fenantrolina	H	0.23 mg mL <sup>-1</sup>	-	-	Helfer, G. A. et al. 2107
Biodiesel	Iodo	Descoloração de iodo causada pela halogenação	R	-	-	4.9	Soares, S. et al. 2017
Couro	Cr VI	1,5-Difenilcarbazida	B	2 mg kg <sup>-1</sup>	98 a124	7.5	Costa, V. C. et al. 2018
Soro humano	Albumina, imunoglobulina	Coomassie brilliant blue	RGB	1.9 a 2.4 µg	-	-	Jesus, J. R. et al. 2018
Formulações farmacêuticas	Lactase	Coomassie brilliant blue	B	0,002 mg	78 a104	3 a13	Dionizio, B.S. et al 2019
Enzimas celulase de fungos	Endoglucanase	Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico	RGB	-	-	-	Guedes, W. N. et al. 2020
Leite	amido H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , e NaClO	KI e lugol	RGB	-	-	-	Costa, R. A. et al. 2020
Suplementos dietético	Cr III	Nanopartículas de prata modificadas	R	-	-	0.83 a 2.32	Sangsin, S. et al., 2021
Suplementos esportivos de proteína de soro de leite	Proteína solúvel total	Método Bradford	R	0.0007 mg mL <sup>-1</sup>	82 a 120	1 a 13	Este trabalho

Neste contexto, o objetivo deste estudo de caso foi avaliar o emprego do aplicativo PhotoMetrix com aquisição de imagens digitais para a quantificação de proteínas em suplementos esportivos *Whey Protein* utilizando o reagente cromogênico de Bradford. As imagens digitais foram obtidas através de um celular Samsung J500-M, com uma câmera de 13 megapixels, e processadas utilizando o aplicativo PhotoMetrix PRO, disponível gratuitamente no site <http://www.photometrix.com.br> (BÖCK et al., 2020; HELFER et al., 2017). Utilizou-se uma caixa de madeira com um orifício na parte superior, para adaptar a câmera do celular, para minimizar a interferência da luz externa na aquisição das imagens digitais. Para validação do método, comparou-se os resultados obtidos com a metodologia desenvolvida com aquelas obtidas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Beckman Coulter, modelo DU-800. As quantificações das absorvâncias foram realizadas monitorando o comprimento de onda de 595 nm.

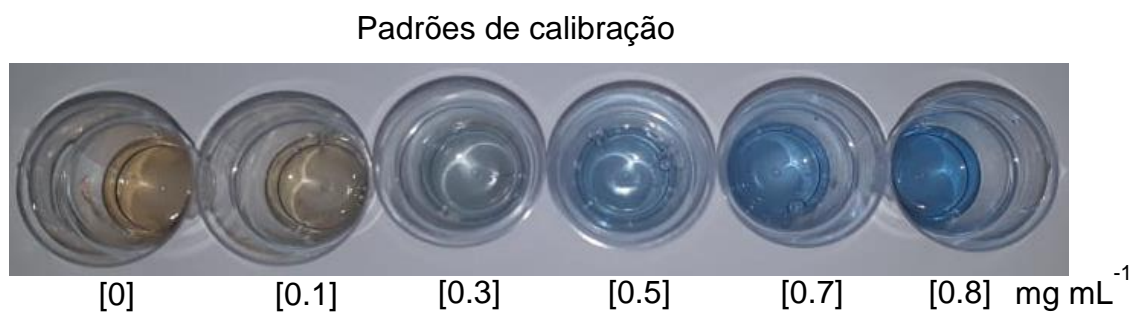
Todas as soluções utilizadas foram preparadas usando água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ cm) obtida em um sistema Milli-Q® Plus Total Water System. A albumina do soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão de proteínas solúveis no preparo das soluções para a obtenção da curva de calibração e para avaliar a exatidão do método através de experimentos de adição-recuperação. O reagente Bradford contendo o corante: Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, California, USA) foi utilizado como reagente cromogênico para a determinação das proteínas solúveis (BRADFORD, 1976).

Nove amostras de suplementos esportivos *Whey Protein* foram disponibilizadas por praticantes de atividade física da cidade de São Carlos (São Paulo - Brasil) para a realização deste estudo. Segundo as informações dos rótulos destes suplementos, estes continham entre 34 e 77 % de proteínas totais, 8 a 45 % de carboidratos e as porcentagens de gorduras nas amostras analisadas variaram entre 2 e 7 %. A curva de calibração foi preparada com diferentes concentrações de BSA (0,0 – 0,8 mg mL<sup>-1</sup>).

Já para o preparo das amostras, pesou-se aproximadamente 100 mg de cada uma das nove amostras de suplemento, as quais foram solubilizadas em 10 mL de água ultrapura e, em seguida, as soluções foram centrifugadas em 10.000 rpm por 3 minutos. A cada uma destas soluções (20  $\mu$ L) foi adicionado o reagente de Bradford (1.000  $\mu$ L), e após 5 minutos de reação foram realizadas as determinações. As análises dos padrões e das amostras foram realizadas em triplicata (n=3) por ambos os métodos, e para o método proposto utilizando o aplicativo PhotoMetrix PRO, foram adquiridas 5 imagens digitais para cada réplica.

Ademais, utilizou-se um spot de 64 x 64 pixels e resolução de 640 x 480 pixels. Os multicanais vermelho (red R), verde (green G), azul (blue B), matriz (hue H), intensidade (intensity I), valor (value V), saturação (saturation S) e luminosidade (lightness L) foram avaliados para a quantificação de proteínas totais. Com o aumento da concentração de padrão de proteína solúvel (BSA), a coloração azul da solução ficou mais intensa devido à formação do complexo proteína-corante na reação (Figura 7).

Figura 7 - Soluções de calibração contendo proteínas solúveis (BSA) e o reagente Bradford usadas para obter acurva analítica.



Para avaliar a exatidão e precisão do método proposto, experimentos de adição-recuperação foram feitos em três amostras de suplementos analisadas (#S1, #S4 e #S5), para isso, 10 µL de uma solução contendo 1 mg mL<sup>-1</sup> de BSA e 10 µL de amostra, foram adicionados a 1000 µL de Bradford. Os cálculos foram realizados de acordo com a equação 1:

$$Trueness = \frac{j \times 100}{j_{ref}}$$

Onde  $j$  é a concentração de BSA determinada pelo método proposto e  $j_{ref}$  é a concentração de BSA adicionada. Para verificar a precisão, foi calculado o desvio padrão relativo (RSD) para as nove amostras analisadas ( $n=3$ ).

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados segundo as normas da IUPAC. O LOD é  $3 \times SD_{blank} / slope$  e LOQ,  $10 \times SD_{blank} / slope$ ; onde  $SD_{blank}$  é o desvio padrão da medida de dez brancos analíticos e o  $slope$  é o declive obtido pela curva analítica. As soluções dos brancos analíticos foram preparadas utilizando 20 µL H<sub>2</sub>O e 1000 µL do reagente de Bradford.

Para a validação do método proposto e comparação de ambos os métodos os principais parâmetros de desempenho analítico foram calculados (Tabela 3), sendo estes o coeficiente de determinação, o coeficiente de correlação linear, os limites de detecção e quantificação, o desvio padrão relativo (RSD) e a porcentagem de recuperação (obtida pelos experimentos de adição e recuperação).

O Canal Red ( $R^2= 0,992$ ) permitiu obter o melhor coeficiente de determinação (Tabela 2) e, portanto, foi utilizado nas demais análises. As curvas de calibração obtidas por ambos os métodos apresentaram coeficientes de correlação satisfatórios, assim como limites de detecção ( $LOD = 0,0002 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e quantificação ( $LOQ = 0,0007 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e precisão (desvio padrão relativo - RSD - entre 1 e 13 %).

Cabe destacar que o método proposto apresentou maior sensibilidade analítica que o método de referência (Tabela 3). O emprego da caixa de madeira com um orifício na parte superior pode ter contribuído para minimizar a interferência da luz externa na aquisição das imagens digitais e proporcionar estes resultados.

Tabela 2 - Curvas analíticas obtidos para os diferentes canais avaliados.

<b>Canal</b>	<b>Equação da curva de calibração</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>R (Vermelho)</b>	$y = 137x + 106$	0.992
<b>G (Verde)</b>	$y = - 62x + 162$	- 0.982
<b>B (Azul)</b>	$y = 40x + 116$	0.988
<b>V (Valor)</b>	$y = 0,26x + 0,6$	0.888
<b>L (Luminosidade)</b>	$y = 0,151x + 0,52$	0.988
<b>I (Intensidade)</b>	$y = 0,15x + 0,5$	0.984

Tabela 3 - Parâmetros analíticos obtidos para o método proposto (PhotoMetrix) e para o método de referência (espectrofotométrico).

Parâmetro	PhotoMetrix PRO (imagem digital)	UV-Vis Espectrofotômetro
Canal ou comprimento de onda	R (vermelho)	595 nm
Faixa de linearidade (mg mL <sup>-1</sup> )	0 – 0.8	0 – 0.8
Equação curva de calibração	$y = 137x + 106$	$y = 1.23x + 0.0011$
Coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	0.992	0.998
Coeficiente de correlação linear (r)	0.996	0.999
Limite de detecção (mg mL <sup>-1</sup> )	0.0002	0.0031
Limite de quantificação (mg mL <sup>-1</sup> )	0.0007	0.0103
Desvio padrão relativo (%)	1 – 13	1 – 11
Recuperação (%)	82 – 112	84 – 106

É notório que o uso das imagens digitais possibilitou obter maior sensibilidade analítica (menores valores de LOD e LOQ, sendo o LOQ obtido pelo método proposto 14,7 vez menor que o LOQ do método de referência), quando comparado com os valores obtidos utilizando como sinal analítico a absorbância medida pelo espectrofotômetro. Indicando assim que o método proposto é excelente para a determinação de baixas concentrações de proteínas solúveis totais em amostras de suplementos *whey protein* (nível microgramas), e demonstrando grande potencial de emprego do método para a determinação de proteínas solúveis em outras amostras biológicas.

A exatidão do método analítico desenvolvido (usando imagens digitais) foi avaliada por experimentos de adição e recuperação usando as amostras de suplemento #S1, #S4 e #S5 (n=3) e analisadas pelos dois métodos. Recuperações de 112%, 97% e 82% foram obtidas para essas amostras utilizando o método proposto.

Recuperações nos valores de 84% a 106% foram obtidas pelo o método de referência (espectrofotômetro), ressaltando que ambos os valores são próximos, e que a exatidão do método proposto é satisfatória; apesar de serem técnicas de análises distintas. Já precisão dos métodos (proposto e referência) são equivalentes com valores de RSD  $\leq$  13%, indicando satisfatória precisão nas determinações.

Os resultados obtidos nas análises das nove amostras de suplementos esportivos *Whey Protein*, são mostrados na Tabela 4, além dos experimentos de adição e recuperação. Recuperações no intervalo de 82% a 120% foram obtidas, indicando satisfatória exatidão nas determinações.

Tabela 4 - Valores obtidos de proteínas solúveis totais nas nove amostras de suplementos esportivos pelo método proposto e pelo método de referência.

Suplementos	Proteínas Totais (g kg <sup>-1</sup> )	Proteínas Solúveis Totais (g kg <sup>-1</sup> )		Taxa de Recuperação (%)
	Informações do rótulo	PhotoMetrix PRO (imagem digital)	UV-Vis Espectrofotômetro	
S1	500	14 ± 1	17 ± 1	82
S2	714	304 ± 33	253 ± 12	120
S3	625	139 ± 6	144 ± 4	97
S4	341	63 ± 4	66 ± 5	95
S5	714	177 ± 1	201 ± 5	88
S6	500	115 ± 7	113 ± 12	102
S7	706	242 ± 13	232 ± 9	104
S8	750	246 ± 25	212 ± 12	116
S9	769	200 ± 6	185 ± 3	108

Os teores de proteínas solúveis totais determinadas nas nove amostras estavam no intervalo de 14 a 304 g Kg<sup>-1</sup>. Esses valores demonstram alta variabilidade das concentrações determinadas de proteínas solúveis totais contidas nas formulações comercializadas de suplementos contendo *Whey Protein*. Apesar de algumas amostras conterem a mesma quantidade de proteínas totais descritas nos rótulos, e informarem a presença das mesmas proteínas em suas formulações (por exemplo, a  $\beta$ -lactoglobulina uma das principais proteínas do soro de leite) elas se diferem significativamente no teor de proteínas solúveis totais determinadas.

Além disso, considerando o teor de proteínas totais e de proteínas solúveis totais determinadas, as porcentagens de proteínas solúveis totais representam entre 3% (#S1) a 43% (#S2) da composição de proteínas totais nas formulações dos suplementos esportivos. Indicando e confirmando a alta variabilidade na composição de proteínas totais e que mais de 50% de proteínas totais dos suplementos não são solúveis (considerando o método de Bradford).

Todos os resultados demonstram que o método desenvolvido é viável e permite determinar as concentrações de proteínas solúveis totais em suplementos esportivos, auxiliando no controle de qualidade dessas formulações pelas indústrias produtoras e contribuindo na segurança alimentar dos consumidores e praticantes de atividades físicas (considerando os níveis diários recomendados de ingestão).

## **6. Considerações finais**

As proteínas são fundamentais para processos biológicos vitais, desde defesa até estruturação celular, e apresentam uma complexa estrutura. Estas podem ser classificadas com base nas formas, composição e/ou função, por exemplo, como proteínas fibrosas e globulares e simples ou conjugadas. A análise destas proteínas portanto não é trivial e requer métodos específicos. Para tal, a espectrometria de massa emergiu como uma técnica central, juntamente com métodos tradicionais, como os de Biureto, Lowry, Bradford e BCA. A proposta de um novo método, utilizando o PhotoMetrix, destaca a busca por alternativas inovadoras, rápidas e econômicas na análise de proteínas, especialmente em suplementos esportivos. Os resultados obtidos com a ferramenta demonstram que esta foi promissora para determinações quantitativas de proteínas em suplementos alimentares. Essa abordagem, ao empregar dispositivos eletrônicos para detecção colorimétrica, pode representar um avanço significativo na acessibilidade e eficácia da análise de proteínas, contribuindo para a segurança e confiabilidade dos produtos consumidos por atletas e entusiastas de atividades físicas. Em conclusão, este trabalho ressalta a importância das proteínas no contexto biológico, apresenta métodos tradicionais de análise e propõe uma alternativa inovadora e satisfatória para a análise de proteínas em suplementos esportivos.

## 7. Referências

1. HASELKORN, R.; ROTHMAN-DENES, L. B. Protein synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 397-438, 1973.
2. BAILEY, R. L. et al. Examination of Vitamin Intakes among US Adults by Dietary Supplement Use. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 5, 2012.
3. BÖCK, F. C. et al. Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1951–1957, 1 jul. 2018.
4. BÖCK, F. C. et al. **PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones**. **Journal of Chemometrics** John Wiley and Sons Ltd, , 1 dez. 2020.
5. BRADFORD, Marion 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.
6. BECKER, Lenice Kappes et al. Efeitos da suplementação nutricional sobre a composição corporal e o desempenho de atletas: uma revisão. **RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 10, n. 55, p. 93-111, 2016.
7. BERGQVIST, Y.; KARLSSON, L.; FOHLIN, L. Total protein determined in human breast milk by use of coomassie brilliant blue and centrifugal analysis. **Clinical chemistry**, v. 35, n. 10, p. 2127-2129, 1989.
8. 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, 1 jul. 2020.
9. COSTA, V.; NEIVA, A.; PEREIRA-FILHO, E. Chromium speciation in leather samples: An experiment using digital images, mobile phones and environmental concepts. **Eletica Quimica**, v. 44, p. 62–74, 2019.
10. 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, 30 abr. 2019.
11. DIONIZIO, B. S. et al. Evaluation of the quality of formulations containing lactase ( $\beta$ -galactosidase) employing gel electrophoresis and cell phone. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 24, p. 38–46, 2019.

12. DOMON, Bruno; AEBERSOLD, Ruedi. **Mass spectrometry and protein analysis. science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.
13. DOUMAS, Basil T. et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum. II. Test for transferability. **Clinical chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1651-1654, 1981.
14. FEKETE, A. A. et al. Whey protein lowers blood pressure and improves endothelial function and lipid biomarkers in adults with prehypertension and mild hypertension: Results from the chronic Whey2Go randomized controlled trial<sup>1,2</sup>. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 1534–1544, 1 dez. 2016.
15. FINLEY, Paul R.; WILLIAMS, R. Jane. **Assay of cerebrospinal fluid protein: a rate biuret method evaluated. Clinical chemistry**, v. 29, n. 1, p. 126-129, 1983.
16. FRESTEDT, J. L. et al. A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: A randomized human clinical study. **Nutrition and Metabolism**, v. 5, n. 1, 2008.
17. GOLDSCHMIDT, R. C.; KIMELBERG, H. K. Protein analysis of mammalian cells in monolayer culture using the bicinchoninic assay. **Analytical biochemistry**, v. 177, n. 1, p. 41-45, 1989.
18. GRASEL, F. S. et al. Principal component analysis of commercial tannin extracts using digital images on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 12, p. 2372–2377, 12 jan. 2016.
19. GUEDES, W. N. et al. **Easy estimation of endoglucanase activity using a free software app for mobile devices. Brazilian Journal of Analytical Chemistry** Visao Fokka Communication Agency, , 2020.
20. GUEST, N. S. et al. **Sport nutrigenomics: Personalized nutrition for athletic performance. Frontiers in Nutrition** Frontiers Media S.A., , 19 fev. 2019.
21. 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, 1 fev. 2017.
22. HELFER, G. A. et al. A New Tool for Interpretation of Thermal Stability of Raw Milk by Means of the Alizarol Test Using a PLS Model on a Mobile Device. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2022–2028, 1 jul. 2018.

23. HSIEH, C. C. et al. **Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: Effects against the 21st century disorders.** **BioMed Research International** Hindawi Publishing Corporation, 2015.
24. HUNN, J. B.; GREER, I. E. Colorimetric and refractometer estimates of total plasma protein in striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). **Journal of fish biology**, v. 36, n. 4, p. 617-618, 1990.
25. JOHNSON, A. M.; ROHLFS, E. M.; SILVERMAN, L. M. Protein. **Tietz textbook of clinical chemistry**, v. 3, p. 477-540, 1999.
26. KADAR, Lianna et al. The prognostic value of body protein in patients with lung cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 904, n. 1, p. 584-591, 2000.
27. KELLER, Ronald P.; NEVILLE, Margaret C. Determination of total protein in human milk: comparison of methods. **Clinical chemistry**, v. 32, n. 1, p. 120-123, 1986.
28. KERKSICK, C. M. et al. **ISSN exercise & sports nutrition review update: Research & recommendations.** **Journal of the International Society of Sports Nutrition** BioMed Central Ltd., , 1 ago. 2018.
29. KRIEGER, James W. et al. Effects of variation in protein and carbohydrate intake on body mass and composition during energy restriction: a meta-regression. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 260-274, 2006.
30. MARKS, David L.; BUCHSBAUM, Robert; SWAIN, Tony. Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. **Analytical Biochemistry**, v. 147, n. 1, p. 136-143, 1985.
31. MATTOO, Roshan L.; ISHAQ, Mohammad; SALEEMUDDIN, M. Protein assay by Coomassie brilliant blue G-250-binding method is unsuitable for plant tissues rich in phenols and phenolases. **Analytical biochemistry**, v. 163, n. 2, p. 376-384, 1987.
32. MAUGHAN, R. J. et al. **IOC consensus statement: Dietary supplements and the high-performance athlete.** **British Journal of Sports Medicine** BMJ Publishing Group, , 1 abr. 2018.
33. MIGNONE, L. E. Whey protein: The “whey” forward for treatment of type 2 diabetes? **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 14, p. 1274, 2015.
34. ONUCHIC, J. N.; WOLYNES, P. G. **Theory of protein folding.** **Current Opinion in Structural Biology** Elsevier Ltd, , 2004.

35. REICHARDT, W.; ECKERT, Bärbel. Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Milch, Käse und Fleisch mit Hilfe der Biuret-Reaktion. **Food/Nahrung**, v. 35, n. 7, p. 731-738, 1991.
36. 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, 5 fev. 2021.
37. SCHLABACH, Timothy D. Postcolumn detection of serum proteins with the biuret and Lowry reactions. **Analytical biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 309-315, 1984.
38. ŠEBEČIĆ, B. A new possibility of wheat protein content determination. **Food/Nahrung**, v. 31, n. 8, p. 817-823, 1987.
39. 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, 1 out. 2018.
40. 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, 1 jul. 2017.
41. SOUSA, G. T. et al. **Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: A review. Lipids in Health and Disease**, 2012.
42. TAYLOR, Lemuel W. et al. Eight weeks of pre-and postexercise whey protein supplementation increases lean body mass and improves performance in Division III collegiate female basketball players. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 41, n. 3, p. 249-254, 2016.
43. TYLLIANAKIS, Philemon E. et al. Direct colorimetric determination of solid-supported functional groups and ligands using bichinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 219, n. 2, p. 335-340, 1994.
44. VOGEL, Arthur I. Practical organic chemistry. **Long Man Group Ltd, London**, 1974.
45. WIMSATT, D. K.; LOTT, J. A. Improved measurement of urinary total protein (including light-chain proteins) with a Coomassie brilliant blue G-250-sodium dodecyl sulfate reagent. **Clinical chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2100-2106, 1987.
46. WOLFE, Robert R. The underappreciated role of muscle in health and disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 3, p. 475-482, 2006.

47. ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaís BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.
48. ZHANG, Y. et al. **Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics**. **Chemical Reviews**, 10 abr. 2013.