

Desenvolvimento de sistema para quantificação de proteína no soro de leite baseado em espectroscopia UV

Rodrigo Molina*, Maivone C. L. Pinto*, Giovanni Baiocchi*,
Renato K. Miyamoto**, Giancarlo M. G. Lopes**.

*Polo Alberto Benedetti, Universidade Anhanguera – UNIDERP,
Av. Doutor Alberto Benedetti, 444 - 09030-350, Santo André – SP, Brasil
(e-mail: rodrigomolina.rm74@gmail.com, maivone1210@gmail.com, giovanni_b7ba@hotmail.com)

**Núcleo de Educação a Distância, Universidade Anhanguera – UNIDERP,
Rua Tietê, 1208 - 86025-230, Londrina – PR, Brasil
(e-mail: renato.miyamoto@kroton.com.br, giancarlo.lobes@kroton.com.br)

Abstract: Whey is actually considered a by-product of cheese production and, even though it is mostly discarded, it can be a raw product for other manufacturing process. In order to determine the final product, it is necessary to quantify the whey protein percentage. The quantifying process can be, among others, the ultraviolet spectroscopy (UV), which offers a simple and no reagents needed solution. This work develops a low cost and high reliable whey protein quantification system able to operate at a specific UV spectrum where there is light absorption by proteins molecules. Additionally, the system's portability and compactness allow it to be directly coupled at line production processes. The system is basically made of sensor, microcontroller and signal conditioning circuitry that have been extensively tested and sealed to avoid external perturbances. Obtained results shows high reliability, with average reading error of $\pm 0.044\%$, average variance of 0.031% in relation to a calibration line with R^2 of 0.94 .

Resumo: O soro do leite é considerado um subproduto da produção de queijos e mesmo sendo descartado na maioria das vezes, pode ser utilizado como matéria prima para outros produtos. Para se determinar qual será esse produto, é necessário realizar a quantificação das proteínas presentes. Essa quantificação pode ser realizada a partir da técnica de espectroscopia ultravioleta (UV), sem a necessidade de reagentes ou de um preparo complexo das amostras a serem analisadas. Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um sistema de quantificação de proteína no soro do leite, configurado para operar em uma faixa UV específica onde ocorre a absorção de proteínas, como uma proposta de baixo custo e elevada confiabilidade. Adicionalmente, o fato de ser um equipamento portátil e compacto, pode permitir que seja acoplado diretamente em uma linha de produção. O sistema é fechado evitando perturbações externas e passou uma bateria de testes, sendo composto basicamente por um sensor, circuito de condicionamento e microcontrolador. Os resultados obtidos demonstraram uma elevada confiabilidade, apresentando um erro médio de leitura de $\pm 0,044\%$, aliado a uma variância média de $0,031\%$ em relação a reta de calibração que possui R^2 de $0,94$.

Keywords: whey; UV spectroscopy; electronic measuring system; protein quantification; conditioning circuit.

Palavras-chaves: soro do leite; espectroscopia UV; sistema eletrônico de medição; quantificação de proteína; circuito de condicionamento.

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que o soro de leite é considerado um subproduto lácteo da indústria de laticínios e é obtido principalmente a partir da coagulação do leite após a fabricação de queijos ou de caseína. No processo de fabricação de queijos, calcula-se que para cada quilo produzido, são necessários 10 litros de leite e, deste montante, 9 litros são descartados em forma de soro (Moreira et al., 2010; Teixeira; Fonseca, 2008).

No Brasil, a utilização do soro de leite para produção de novos produtos é insipiente, sendo que 40% do total é descartado de forma inadequada, sem tratamento nenhum (Marquardt et al., 2012). Em volume, o Brasil produz aproximadamente 1,72 milhões de toneladas de soro/ano, das quais 1,58 milhões de toneladas são descartadas. Isto significa uma perda de 11,7 mil toneladas de proteína/ano (Antunes, 2013).

Por muito tempo, o soro de leite foi considerado apenas um subproduto do processo fabril de queijos, fato que intrigou muitos pesquisadores. Hoje, já existem diversos estudos que comprovam o seu potencial, principalmente por conta de sua composição. Teixeira e Fonseca (2008), por exemplo, acreditam que, após processamento adequado, o soro é considerado e transformado em um produto de alto valor agregado. Outros autores ressaltam ainda que, de acordo com o tipo de soro (doce ou ácido), estes podem ser utilizados como substrato para geração de energia, biocombustível ou ainda, produção de queijos frescos (tipo ricota ou cottage), concentrados proteicos, isolados proteicos, entre outros. (Lin et al., 2014; Mirabella et al., 2014).

Porém, para que o soro do leite possa ser aproveitado como matéria-prima, é necessário que o seu perfil de qualidade microbiológica e físico-químico seja determinado. Isso é necessário, pois, a composição e o tipo do soro gerado na indústria leiteira variam conforme o produto produzido, o tipo de leite utilizado e os processos empregados na produção (Teixeira; Fonseca, 2008).

O principal componente a ser avaliado no perfil de qualidade do soro é a quantidade total de proteína presente, já que ela irá determinar qual será a sua aplicação. Tais proteínas presentes no soro de leite, apresentam uma estrutura globular ligadas através de pontes de dissulfeto. Estas são divididas em: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glico-macropéptídeos (GMP) (Haraguchi; Abreu; de Paula, 2006).

Portanto, fica claro que a quantificação das proteínas presentes no soro de forma rápida é desejável, uma vez que os métodos convencionais utilizados, são demorados e/ou caros. Um deles é o método imunológico ELISA, que utiliza anticorpos para detectar e quantificar as proteínas. Outro método é fundamentado na atividade enzimática do soro, no qual a quantidade de proteína é estimada baseado na quantidade de enzimas presentes. Uma terceira possibilidade é a quantificação via cromatografia líquida, o que exige um equipamento para análise com custo altamente elevado (Le; Zhao; Larsen, 2019).

Uma opção mais acessível para a quantificação de proteína no soro do leite é utilizando espectroscopia, que pode ser realizada a partir de uma análise em diferentes faixas do espectro. Conforme indica o trabalho de Kucheryavskiy e Lomborg (2014), é possível trabalhar na faixa do infravermelho próximo (NIR - *Near-Infrared Spectroscopy*), determinando além da quantidade de proteína, a gordura, lactose e sólidos totais. Porém, um equipamento que opera nessa faixa de espectro possui um custo mais elevado em comparação a um equipamento que trabalha na região do espectro ultravioleta e visível (UV-Vis). Portanto, a opção mais rentável para a quantificação de proteína é a UV-Vis, onde diferentes proteínas presentes no soro do leite possuem faixa de absorção (Schmid, 2001).

Na faixa do espectro UV-Vis, podem ser utilizados dois métodos para a quantificação de proteínas. No método básico, a determinação da concentração de proteínas é feita

com a medição da absorvância na região UV próxima a 280 nm, sem a necessidade de reagentes ou preparo complexo das amostras. No método alternativo, a região analisada é a visível e se faz necessária a utilização de um reagente para que a absorção aconteça em uma faixa específica do espectro (Simonian, 2002).

Devido as características apresentadas, nesse trabalho a quantificação das proteínas no soro do leite será feita com a análise somente da região UV do espectro. Um outro motivo dessa escolha, é a proposta do desenvolvimento de um equipamento seja capaz de operar dentro da linha de produção, onde a utilização de um reagente se torna complexa e traz limitantes a sua aplicabilidade.

A criação de equipamentos baseados em espectroscopia UV-Vis que permitem a análise de diferentes substâncias na própria linha de produção é uma tendência mundial, visando otimizar cada vez mais os processos produtivos, algo que pode ser visto em Liauw, Baylor, O' Rourke, 2010. A criação de um equipamento portátil e acessível que realize essa análise em uma linha de produção que processa o soro do leite é algo relevante, como indica o trabalho de Berg et al, 2017. No referido trabalho, a quantificação da proteína é realizada utilizando uma célula de medição ligada a um espectrofotômetro de bancada, algo que pode ser custoso. Isso mostra que o desenvolvimento de um sistema específico, que realize a quantificação da proteína de forma confiável e possa ser acoplado diretamente na linha de produção, atribui grandes vantagens ao setor.

Assim, esse trabalho apresenta o desenvolvimento de um sistema de quantificação das proteínas presentes no soro do leite. Esse sistema tem por característica analisar a faixa UV específica do espectro onde ocorre a absorção das proteínas, permitindo a sua quantificação de forma confiável.

Para o desenvolvimento do sistema, são utilizados materiais acessíveis com uma montagem compacta. Essa característica resulta na possibilidade de permitir a sua ligação a um processo produtivo posteriormente. O desenvolvimento do sistema está descrito nas Seções a seguir.

2. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

Para que haja uma validação e certificação de qualquer produto, de modo a garantir que ele seja fabricado com a mesma qualidade dentro dos critérios pré-estabelecidos pelo fabricante, deve-se empregar uma metodologia analítica confiável, e que apresente rapidez e baixo custo (Valentini; Sommer; Matioli, 2007).

Este trabalho utiliza a espectroscopia ultravioleta (UV), devido às suas características, torna-se efetiva e de baixo custo. Adicionalmente, há uma execução rápida com a possibilidade de aquisição de uma faixa ampla de espectros em um curto período. Sua aplicação é fundamentada em transições eletrônicas intra-atômicas ou moleculares, cuja capacidade de absorção de radiação luminosa do ultravioleta pode ser utilizada para sinais com faixas de comprimento de onda que alteram entre 200 a 400 nm (Madan; Dwivedi; Singh, 2005; Trevisan; Poppi, 2006).

A espectroscopia UV obedece a Lei de Lambert-Beer, de acordo com um modelo matemático para medidas de absorção de radiação em amostras em diferentes estados, que se encontram nas regiões ultravioleta, visível ou infravermelho do espectro eletromagnético (Baldissera, 2014 apud Rocha; Teixeira, 2004). As medidas de absorção de radiação podem ser determinadas de acordo com a equação (1):

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon bc \quad (1)$$

onde: A é a absorbância; I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra, e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. Adicionalmente, o termo ϵ é a absorvidade molar e refere-se às características da amostra em análise. O termo c refere-se à concentração da amostra e o termo b é a distância que o feixe percorre pela amostra (Rocha; Teixeira, 2004).

Os aspectos metodológicos utilizados para o sensoriamento e aquisições de dados para aplicação da técnica proposta com uma abordagem de baixo custo são descritos na Seção 3.

3. METODOLOGIA

A metodologia adotada para a implementação proposta neste trabalho é descrita nesta Seção. Para os ensaios experimentais, um circuito com um receptor e um emissor UV foi utilizado. O sinal lido pelo emissor UV foi condicionado para aquisição em um microcontrolador para validação dos ensaios. O receptor utilizado foi um fotodiodo sensível a UV-A e UV-B encapsulado em sensor comercial, o ML8511. O referido sensor é utilizado para mensurar a intensidade da incidência UV em ambientes internos ou externos. Ele é equipado com um amplificador interno, que converte foto-corrente em tensão de acordo com a variação da intensidade UV. Este sensor detecta a luz nas faixas de 280-390 nm com maior sensibilidade, conforme ilustra a Figura 1, que apresenta a sua responsividade espectral relativa.

Uma vez definido o circuito de leitura dos dados, foi definido o emissor apropriado, fundamentado na folha de dados do ML8511 e disponibilidade comercial de componentes. Como a responsividade do sensor é otimizada na faixa de 280-390 nm, optou-se por utilizar um LED UV com pico de emissão em 365 nm. O LED em questão possui 3 W de potência, e possui dissipador estrela soldado.

A Figura 2 ilustra o circuito de condicionamento e o circuito interno do ML8511 utilizado para os ensaios experimentais. O sensor em questão é alimentado com uma tensão de 3,3 V(CC) nos terminais 4 e 7. O terminal 9 é um pino de teste (não conectado), o terminal 10 trata-se de um terminal interno para referência de tensão, e o terminal 5 refere-se ao GND que deve ser equipotencializado com o circuito de condicionamento e o microcontrolador.

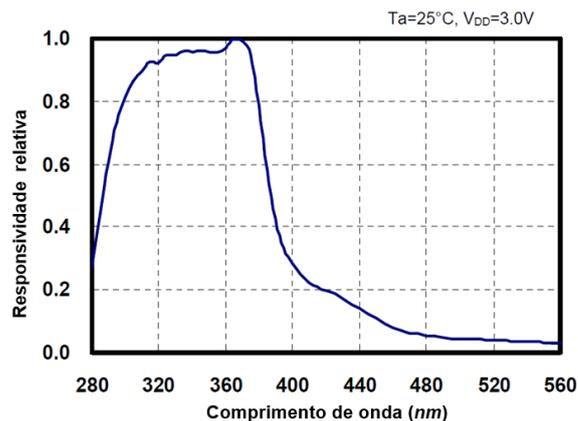


Fig. 1 Características de responsividade espectral do ML8511.

Fonte: <https://cdn.sparkfun.com/>

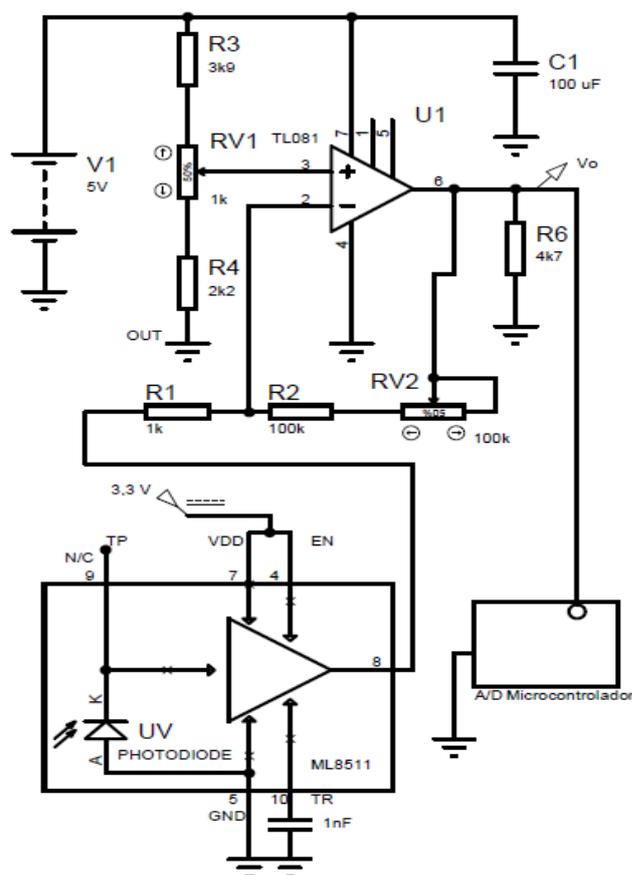


Fig. 2 Circuito de condicionamento.

Um circuito de condicionamento auxiliar foi montado para a aquisição dos sinais por meio do microcontrolador Atmel ATmega328P da plataforma Arduino. O referido circuito foi utilizado para calibração do sensor, gerando uma relação entre a concentração de proteína das amostras com a tensão de saída do circuito, lida pelo microcontrolador.

Ainda, observando a Figura 2, o sinal de tensão gerado pelo sensor é amplificado por meio de um amplificador operacional em configuração inversora com ajuste de *offset*. Um capacitor de 100 µF foi utilizado para mitigar as

possíveis oscilações da fonte de tensão. No circuito de condicionamento, os resistores R1 e R2 determinam a impedância de entrada do amplificador, aliado a configuração em série com o *trimpot* RV2, utilizado para ajustar o ganho do amplificador. Para aplicar um *offset* ao sinal, foram utilizados os resistores R3 e R4 em série com o *trimpot* RV1. A tensão de saída é amostrada sobre o resistor R6 (4,7 k Ω) que opera como carga.

Para os ensaios experimentais, a saída de tensão foi conectada em uma entrada analógica do Arduino. A referência de tensão do conversor A/D foi de 3,3 V(CC). A montagem experimental realizada pode ser observada na Figura 3.

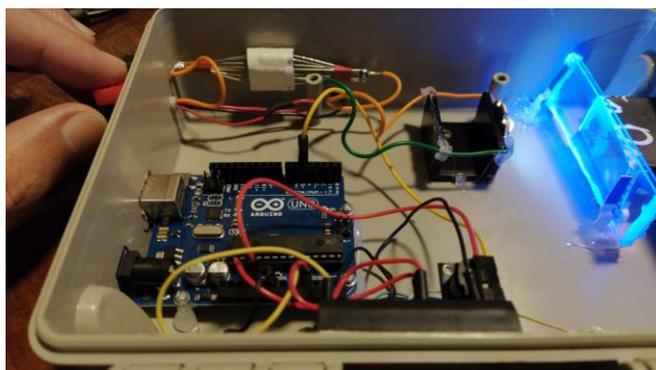


Fig. 3 Ensaios experimentais.

Na Figura 3 é possível identificar o LED UV utilizado. Ele foi alimentado diretamente por uma fonte CC de bancada, com uma tensão de 3,75 V e corrente limitada em 0,43 A, conforme indicado como ideal no *datasheet* do componente. Não foi utilizada uma tensão alimentação superior a essa, em conjunto com um resistor para limitar a corrente, pois em testes preliminares foi constatada uma variação na corrente do LED após o funcionamento do circuito por alguns instantes. Isso causava mudanças na intensidade da luz gerada pelo LED, o que consequentemente causava oscilações indesejadas nas medições. A ligação do LED diretamente na fonte se mostrou estável.

Ainda na Figura 3, se percebe o porta-amostra montado, iluminado pela luz UV gerada pelo LED. Foram fabricadas 15 unidades, uma para cada amostra. Todas elas foram feitas em vidro transparente de 3 mm de espessura com características iguais para se evitar distorções nas medidas.

O procedimento experimental se deu da seguinte forma:

- 1- Energização dos dispositivos e estabelecimento da comunicação do microcontrolador com um PC para o recebimento dos dados lidos.
- 2- Colocação da amostra dentro do porta amostras.
- 3- Fechamento da caixa com o sistema de medição, a fim de evitar a influência de luz externa.
- 4- Leitura de onze medidas pelo conversor A/D do microcontrolador. Dessas medidas, os três maiores e os três menores valores lidos foram descartados. A média dos cinco valores intermediários foi utilizada

como medida. Essa técnica foi utilizada para eliminar eventuais ruídos e oscilações da amostragem.

- 5- Envio do valor de tensão lido pelo sistema para o computador via comunicação USB.

Para a realização do ensaio experimental, foi utilizado *whey protein* isolado como fonte de proteína. As amostras foram dissolvidas em diferentes concentrações, baseadas na média de proteínas totais encontradas no soro do leite, que fica entre 4 e 10 mg/ml, variando conforme o produto originário (Haraguchi; Abreu; de Paula, 2006). Além disso, foram consideradas as limitações laboratoriais para o preparo.

Inicialmente, foram utilizados 10 gramas de *whey protein*, dissolvidas em 300 mililitros de água purificada. Considerando a concentração de proteína presente no *whey protein* utilizado, obtida nas informações nutricionais do produto, se obteve uma concentração de inicial de 0,02381 mg/ml de proteína por amostra conforme a Tabela 1. Essa solução inicial foi posteriormente diluída a fim gerar diversas amostras diferentes para a realização dos ensaios, como descrito na Seção 4.

Tabela 1. Dados de concentração da solução inicial.

Concentração de whey (g prot/g whey)	0,7142
Volume de água da amostra inicial (ml)	300
Quantidade de whey - amostra inicial (g)	10
Concentração prot. amostra inicial (mg/ml)	23,806

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos nos ensaios experimentais são descritos nesta Seção. A partir da solução inicial descrita anteriormente, foram retiradas 15 amostras com diferentes volumes, e realizadas novas diluições com água. Em posse destas 15 amostras com diferentes concentrações, foram realizadas as medições, que estão apresentadas na Tabela 2. Nessa tabela, VSI é o Volume da Solução Inicial utilizado para a geração da amostra em (ml), VAA é o Volume de Água Adicionada na amostra em (ml), CP é a Concentração de Proteína em (mg/ml) e V_0 é a tensão de saída em (V).

Tabela 2. Dados coletados das amostras

Amostra	VSI (ml)	VAA (ml)	CP (mg/ml)	V_0 (V)
1	1	9	2,380	2,000
2	2	8	4,761	1,910
3	3	7	7,142	1,798
4	4	6	9,522	1,602
5	5	5	11,903	1,422
6	5,5	4,5	13,093	1,346
7	6	4	14,284	1,326
8	6,5	3,5	15,474	1,290
9	7	3	16,664	1,242
10	7,5	2,5	17,855	1,230

11	8	2	19,045	1,194
12	8,5	1,5	20,235	1,172
13	9	1	21,426	1,156
14	9,6	0,4	22,616	1,128
15	10	0	23,806	1,074

A Figura 4 ilustra a resposta da variação da concentração de proteína das amostras pela tensão de saída.

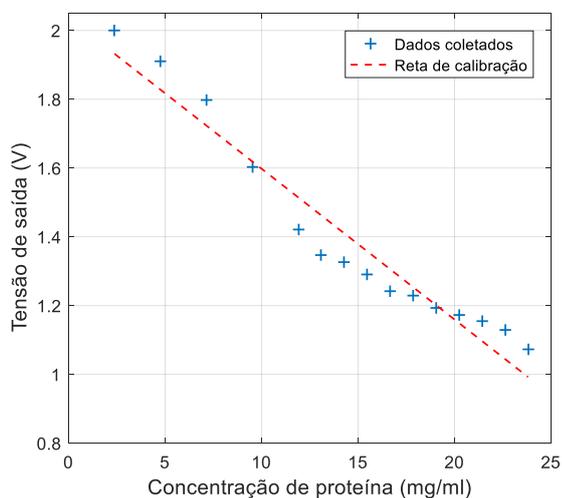


Fig. 4. Variação da concentração *versus* tensão de saída.

Percebe-se, pela análise da Figura 4, que há uma relação linear entre a luminosidade mensurada pelo receptor UV com a concentração de *whey protein* medida (obtida pelas tensões na saída do circuito), conforme há a variação das amostras. Adicionalmente, foi realizada a análise de regressão linear, onde a relação entre as variáveis dependentes (tensão de saída) e independentes (concentração de proteína) é representada por meio de um modelo matemático. O referido modelo pode ser obtido a partir do *script* a seguir, implementado em software computacional Matlab®, que está apresentado no gráfico da Figura 5 como reta de calibração.

```
clear all;
clc;

x=[(vetor dados de concentração)];
y=[(vetor dados de tensão de saída)];

pl=polyfit(x,y,1)
plot(x,y,'+')
hold on
plot(x,polyval(pl,x), 'r--')
yfit=pl(1)*x+pl(2);
yresid=y-yfit;
SQresid=sum(yresid.^2);
SQtotal=(length(y)-1)*var(y);
R2=1-SQresid/SQtotal
```

A equação que representa a resposta das aquisições é dada em (2) e, em (3), tem-se a o coeficiente de medida que determina a dependência linear entre as variáveis:

$$y = -0,0439.x + 2,0367 \quad (2)$$

$$R^2 = 0,9403 \quad (3)$$

onde y é a variável dependente, x é a variável independente e R^2 é o coeficiente de correlação linear. Para a validação dos ensaios experimentais, a Figura 6 apresenta a relação de variância e erro relativo das amostragens em relação a reta de calibração, de acordo com os dados apresentados na Tabela 3.

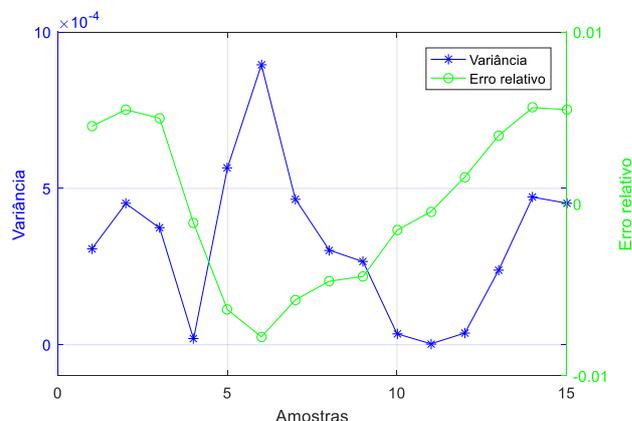


Fig. 5 Validação dos ensaios experimentais.

A partir da análise dos dados apresentados na Tabela 3, observa-se uma variância máxima de 0,057% na amostra que apresenta um erro de 0,77%. A variância média obtida nos ensaios experimentais foi de 0,031%, e o erro médio de leitura foi de $\pm 0,044\%$.

Tabela 3. Validação dos ensaios

Variância	Erro relativo
0,00030656	0,00452075
0,00045180	0,00548817
0,00037334	0,00498892
0,00001849	-0,00111033
0,00056603	-0,00614291
0,00089534	-0,00772587
0,00046629	-0,00557549
0,00030264	-0,00449178
0,00026562	-0,00420808
0,00003486	-0,00152437
0,00000291	-0,00044066
0,00003727	0,00157638
0,00023921	0,00399343
0,00047216	0,00561047
0,00045279	0,00549418

Com base na análise dos dados coletados, evidencia-se um resultado satisfatório para o sistema de medição de proteína proposto neste trabalho, atribuindo a aplicabilidade de um sensoriamento de baixo custo.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou uma proposta para medição quantitativa de proteína a partir de sensoriamento com emissores e receptores UV. O comprimento de onda do elemento emissor é de 365 nm, compatível na faixa de leitura de maior precisão do receptor UV. A proposta é fundamentada em um sensoriamento de baixo custo e a variação do comprimento de onda pode ocorrer na faixa de 280 a 390 nm.

Como já foi dito, o pico de absorção das proteínas presentes no soro do leite acontece no comprimento de onda de 280 nm. Contudo, percebe-se que o sensor utilizado nesse trabalho possui uma sensibilidade relativa de aproximadamente 0,3 para esse comprimento. Somado a isso, os LEDs UV encontrados comercialmente a preços acessíveis não possuem pico de emissão nesse comprimento de onda. Assim, foram tomadas duas medidas para permitir as medições de forma satisfatória se chegar aos resultados apresentados: a utilização de um LED com potência elevada e a aplicação de um circuito de condicionamento na saída do sensor. Sem esses dois artifícios, a quantificação de proteína não teria sido possível.

Amostras com diferentes concentrações foram testadas para aquisição do sinal de tensão de saída. Após os ensaios experimentais, um erro médio de $\pm 0,044\%$ foi observado, e a variância média foi de 0,031%. Diante dos fatos mencionados, a eficiência do método proposto pôde ser comprovada, mostrando-se linear e robusto, como uma alternativa às técnicas convencionais de espectrofotometria que utilizam espectrofotômetros comerciais que operam em ultravioleta.

Para os próximos trabalhos, é possível realizar a implementação de um algoritmo no microcontrolador para que ele gere como saída a concentração de proteína lida, utilizando a reta de calibração obtida nesse trabalho. Pode-se ainda realizar testes utilizando o soro do leite e uma mudança no sistema de leitura de amostras para que seja possível acoplar o sistema em uma linha de produção.

REFERÊNCIAS

- Antunes, A. J. (2003) *Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino*. Ed. Manole, São Paulo, p.142.
- Baldissera, D.B. Espectrofotometria aplicada na análise de nanocarreadores lipídicos contendo ativos para lipodistrofia ginoide. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Franciscana.
- Berg, T.H.A. et al. Inline UV-Vis spectroscopy to monitor and optimize cleaning-in-place (CIP) of whey filtration plants. *LWT*, v. 75, p. 164-170, 2017.
- Liauw, M.A.; Baylor L.C.; O'Rourke, P.E. (2010) *Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries*, Second Edition, Chapter 4 - UV-Visible Spectroscopy for On-Line Analysis. John Wiley & Sons, Wiltshire, Great Britain.
- Haraguchi, F.K.; Abreu, W.C. de; de Paula, H.. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*. [online]. v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- Kucheryavskiy, S.; Lomborg, C.J. Monitoring of whey quality with NIR spectroscopy—A feasibility study. *Food Chemistry*, v. 176, p. 271-277, 2015.
- Le, T.T.; Zhao, D.; Larsen L.B. (2019) *Whey Proteins: From Milk to Medicine*, Chapter 5 - Analytical Methods for Measuring or Detecting Whey Proteins. Academic Press. Online.
- Lin, C.S.K. et al. Current and future trends in food waste valorization for the production of chemicals, materials and fuels: a global perspective. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, v. 8, p. 686-715, 2014.
- Madan, J.; Dwivedi, A.K.; Singh, S. Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, v.538, p. 345-353, 2005.
- Marquardt, L. et al. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. *Tecno-Lógica*, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2012.
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, v. 65, p. 28-41, 2014.
- Moreira, R.W.M. et al. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. *Acta Scientiarum*, v. 32, n. 4, p. 435-438, 2010.
- Rocha, R. P. F.; Teixeira, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria uv-vis. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
- Schmid, F.-X. (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. eLS. American Cancer Society, [online].
- Simonian, M.H. Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, v. 4, n. 1, p. B1.3.1-B1.3.7, 2002.
- Teixeira, L.; Fonseca, L. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.
- Trevisan, M. G.; Poppi, R. J. Química analítica de processos. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1065 – 1071, 2006.
- Valentini, S.R.; Sommer, W.A.; Matioli, G. Validação de métodos analíticos. *Arq Mudi*, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.