



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - PPGAN

ANTÔNIO FRANCISCO VERAS DE CARVALHO

**SUPLEMENTOS PROTEICOS PARA ATLETAS (*WHEY PROTEIN*): ANÁLISE DE
ROTULAGEM, QUALIDADE HIGIÊNICA, MICROSCÓPICA E
MICOTOXICOLÓGICA**

TERESINA, PI, 2018

ANTONIO FRANCISCO VERAS DE CARVALHO

**SUPLEMENTOS PROTEICOS PARA ATLETAS (*WHEY PROTEIN*): ANÁLISE DE
ROTULAGEM, QUALIDADE HIGIÊNICA, MICROSCÓPICA E
MICOTOXICOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí-UFPI, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dr^a Maria Christina Sanches Muratori

Área: Química, Bioquímica e Qualidade de Alimentos

TERESINA, PI, 2018

Dedico este trabalho aos meus familiares, em especial ao meu pai, José Ferreira de Carvalho, minha mãe Raimunda Veras de Carvalho e minha filha, Flávia Cristina Rodrigues de Carvalho, pela confiança e apoio constante a todos os meus esforços.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e pela paz na vida.

A minha professora orientadora, Dra. Maria Christina Sanches Muratori, por todo acolhimento, ensinamentos, paciência, respeito e apoio incondicional.

Às minhas professoras da graduação em Nutrição: Dra. Betânia de Jesus e Silva de Almendra Freitas, Ma. Ivonete Moura Campelo, Dra. Maria do Socorro Silva Alencar, Ma. Martha Teresa Siqueira Marques Melo. Pela competência docente e excelente relação (professora-alunos).

Ao professor Dr. Francisco Leonardo Torres Leal, pela amizade, atenção e pela importante contribuição no início da pesquisa.

Ao funcionários, residentes e colaboradores do NUEPPA. Em especial: Ma. Lusmarina Rodrigues, Me. José Humberto Santos Filho, Me. Rafael Gomes Abreu Bacelar, Me. Eldo José Rodrigues dos Santos, Ma. Cristiane Evangelista Lima, Ma. Aline Marques Monte. Pela valiosa contribuição para este trabalho.

Ao (Laboratório de Geoquímica Orgânica da Universidade Federal do Piauí), LAGO, na pessoa do Dr. Márcio dos Santos Rocha, pela atenção e contribuição extremamente importante para esta pesquisa.

Aos meus colegas da turma de mestrado PPGAN (2016-2018) pela convivência maravilhosa durante todo tempo de “caminhada”. Em especial: Ma. Marilene Magalhães de Brito e Ma. Juliana Soares Severo, pela ajuda mais do que importante nos momentos que mais precisei.

“Elogie em público e corrija em particular. Um sábio orienta sem ofender e ensina sem humilhar”

(Mario Sergio Cortella)

RESUMO

CARVALHO, A. F. V. **Suplementos proteicos para atletas (*whey protein*): análise de rotulagem, qualidade higiênica, microscópica e micotoxicológica**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

O mercado de suplementos alimentares está em expansão mundial sendo o *whey protein* o mais consumido por praticantes de exercícios físicos, sua indicação na maioria das vezes não é realizada por nutricionistas. Com este trabalho objetivou-se: analisar a qualidade de suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados em embalagem individualizada ou sachês em Teresina, PI. Adquiram-se sachês de diferentes marcas em lojas de suplementos. As seguintes análises foram realizadas: elementos de rotulagem; contagens de: *Staphylococcus* coagulase positiva, bactérias heterotróficas mesófilas e fungos filamentosos e leveduriformes, atividade de água; isolamento e identificação destes fungos filamentosos; pesquisa de: sujidades, cafeína e aflatoxinas. As marcas de *whey protein* atendem parcialmente aos requisitos obrigatórios de rotulagem e omitem substâncias estimulantes do sistema nervoso (cafeína nas marcas sabor chocolate) e alérgenos (ovos e peixes). Não indicam responsável técnico nem informam sobre restrições quanto ao consumo excessivo de proteínas, necessidade de orientação de nutricionista e tipo de *whey*. As contagens máximas obtidas para os micro-organismos pesquisados foram: *Staphylococcus* coagulase positiva 2,73 UFC/g em log₁₀; bactérias heterotróficas mesófilas 1,21 UFC/g em log₁₀; fungos filamentosos e leveduriformes 1,64 UFC/g em log₁₀. Fungos como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *Aspergillus* agregados *niger* foram isolados das amostras analisadas, apesar dos resultados para atividade de água (entre 0,30 a 0,60) não favorecerem a multiplicação dos fungos e dos demais micro-organismos presentes na embalagem. Não foram encontrados fungos dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*. Os sachês possuíam as seguintes matérias estranhas indicativas de falhas das boas práticas: fragmentos, fezes e ovos de insetos; hifas; fios de plástico e fragmentos de madeira. As duas (100%) marcas de amostras sabor chocolate continham cafeína entre 329,0 a 851,8 µg por porção de 25 g. As amostras B2 e D4 apresentaram AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, sendo que a maior quantidade encontrada em B2 foi AFG2 com 177,6 µg/25g, na D4 AFG1 76,1 µg/25g. Consumidores de *whey protein* em sachês estão expostos a quantidades de aflatoxinas que os tornem susceptíveis a micotoxicoses, efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos.

Palavras-chave: aflatoxina, *Aspergillus*, cafeína, LCMS, *Staphylococcus*, sujidades.

ABSTRACT

CARVALHO, A. F. V. Protein Supplements for Athletes (Whey Protein): labeling analysis, hygienic, microscopic and mycotoxicological quality. 2018. 67 f. Essay (Master's Degree) - Postgraduate Program in Food and Nutrition, Health Science Center, Federal University of Piauí, Teresina, PI.

The market for dietary supplements is expanding worldwide being the whey the most consumed by physical exercise practitioners. Most of the time its prescription is not performed by nutritionists. This study aimed at to analyze the quality of protein supplements for athletes (whey protein) commercialized in individualized packaging or sachets in Teresina, PI. Sachets of different brands were bought at supplement stores. The following analyzes were carried out: labeling elements; bacterial count heterotrophic mesophylls, filamentous fungi and yeasts, and *Staphylococcus* positive coagulase; water activity; isolation and identification of fungi filamentous; research on soil, caffeine and aflatoxins. The whey protein brands partially meet the mandatory labeling requirements and omitting substances that stimulate the nervous system (caffeine in chocolate flavor) and allergens (eggs and fish). They do not indicate a technical responsible or information about restrictions on excessive protein consumption, need of nutritionist orientation and type of whey. The maximum counts obtained for the microorganisms studied were: Coagulase positive *Staphylococcus* 2.73 CFU / g in log₁₀; Mesophilic heterotrophic bacteria 1.21 CFU / g in log₁₀; filamentous and yeast fungi 1.64 CFU / g in log₁₀. Fungi such as *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *Aspergillus agregados niger* were isolated from the analyzed samples, although the results for water activity (between 0.30 and 0.60) did not favor the multiplication of the fungi and other microorganisms present in the packaging. No fungi of the genus *Penicillium* and *Fusarium* were found. The sachets had the following unfamiliar substances that denote the lack of good practice: fragments, faeces and insect eggs; hyphae; plastic wires and fragments of wood. The two (100%) brands of chocolate flavor samples contained caffeine between 329.0 to 851.8 µg per 25 g portion. Samples B2 and D4 presented AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, the highest amount found in B2 was AFG₂ with 177.6 µg / 25 g, in D4 AFG₁ 76.1 µg / 25 g. Consumers of whey protein in sachets are exposed to quantities of aflatoxins that make them susceptible to mycotoxicoses, teratogenic, mutagenic and carcinogenic effects.

Key words: Aflatoxin, *Aspergillus*, Caffeine, LCMS, *Staphylococcus*, Soil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas (25 e 37 °C) 31
- Figura 2.** Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37 °C) 32
- Figura 3.** Esquema de incubação das cepas de gênero *Fusarium* nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final..... 33
- Figura 4.** Esquema para obtenção de sujidades pelo método da digestão enzimática proposto por Wildman..... 35
- Figura 5.** Espécies de *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus* isoladas nas amostras das marcas A, B e D das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI nos meios MEA, CYA 25, CYA 37 e CYA05..... 49
- Figura 6.** Imagens de sujidades identificadas em 25g das amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos da marca B para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI..... 51
- Figura 7.** Cromatograma dos íons extraídos dos padrões para Cafeína e Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) por LCMS 53
- Figura 8.** Curva de calibração para Cafeína e aflatoxina B1, B2, G1, G2, M1..... 53
- Figura 9.** Cromatograma dos íons extraídos aflatoxina e cafeína do padrão injetado (A), comparados ao de aflatoxinas das amostras B2 (B) e D4 (C) e de cafeína nas amostras E1, E2, E3, E4, F1, F2, F3 e F4 (D) obtidos nas embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI resultados expressos em µg por porção de 25 g..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros analisados relativos a rotulagem nutricional obrigatória nas embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI.....	28
Tabela 2.	Limite de detecção e limite de quantificação das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e cafeína.....	39
Tabela 3.	Parâmetros analisados relativos a rotulagem nutricional obrigatória nas embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI.....	40
Tabela 4.	Informações complementares para o consumidor, verificadas na rotulagem das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI.....	41
Tabela 5.	Percentual de conformidade dos parâmetros analisados da rotulagem das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI.....	43
Tabela 6.	Resultados médios das análises microbiológicas e da atividade de água nas amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI.....	46
Tabela 7	Espécies de fungos filamentosos isolados e identificados nas amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI.....	48
Tabela 8	Sujidades identificadas em 25g das amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI.....	50
Tabela 9	Resultado do ensaio de recuperação de aflatoxinas (%)......	54

Tabela	Nível de contaminação de cafeína e de aflatoxinas M1, B1, B2,
10	G1, G2 das amostras das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (<i>whey protein</i>) comercializadas em Teresina, PI resultados expressos em µg por porção de 25 g..... 55

LISTA DE SIGLAS

NUEPPA - Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos

SAC - Serviço de assistência ao Consumidor

PCA - Agar Padrão para Contagem

UFC - Unidade Formadora de Colônia

BP - Baird-Parker

DRBC - Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol

MEA - Agar Extrato de Malte

SNA - Agar Spezieller Nalvistoffarmer

BDA - Agar Batata Dextrose

CYA - Agar Extrato de Levedura Czapek

CY20S - Agar Extrato de Levedura Czapek 20% Sacarose

G25N - Agar Nitrato de Glicerol 25%

BLA - Agar Folhas de Bananeira

CLA - Agar Folhas de Cravo

CLAE-EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas

ESI - Ionização por Eletronspray

CBH - Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas por grama em logaritmo de base 10

ECP - Contagem de estafilococos coagulase positiva por grama em logaritmo de base 10

CFL - Contagem de Fungos filamentosos e leveduriformes por grama em logaritmo de base 10.

BCAA - Aminoácidos de Cadeia Ramificada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Alimento proteico para atletas.....	17
2.1.1 Movimentação econômica.....	17
2.1.2 Soro do leite.....	18
2.1.3 <i>Whey Protein</i>	20
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Geral.....	25
3.2 Específico.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Amostras.....	26
4.2 Coleta das amostras e delineamento experimental.....	26
4.3 Análise da Rotulagem.....	27
4.4 Métodos Microbiológicos.....	29
4.4.1 Preparo das Amostras.....	29
4.4.2 Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas.....	29
4.4.3 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	29
4.4.4 Contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras.....	30
4.4.5 Isolamento e Identificação Fúngica.....	30
4.5 Determinação da Atividade de Água.....	33
4.6 Métodos de Microscopia.....	33
4.6.1 Solução de Pancreatina.....	34
4.6.2 Análise Microscópica.....	34
4.7 Detecção e Quantificação de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1) e Cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)	36

4.7.1 Preparo da Curva Analítica.....	36
4.7.2 Ensaio de Recuperação de Aflotoxinas (B1, B2, G1 e G2)	36
4.7.3 Extração e Purificação do Extrato.....	36
4.8 Métodos Cromatográficos.....	37
4.9 Análise Estatística.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Análise de Rotulagem.....	40
5.2 Contagem de Micro-organismos.....	45
5.3 Isolamento e Identificação Fúngica.....	47
5.4 Método de Microscopia	49
5.5 Curva Analítica.....	52
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

Na história da evolução humana ocorreram importantes transições desde que o homem primitivo usava apenas os recursos da natureza para a sua alimentação. As mudanças de hábitos ocorreram e associado a isso, sucederam-se alterações relativas ao corpo, pois as pessoas deixavam de ser nômades, o que favorecia as atividades físicas das mais variadas formas. Com o tempo, elas tornaram-se gradativamente mais sedentários e passaram a viver em comunidades. Por esse motivo, tornou-se habitual a prática de exercícios físicos como forma de entretenimento ou para treinamento militar visando a defesa dos seus territórios.

Devido as mudanças mencionadas, surgiu a necessidade de desenvolver a agricultura, a pecuária e a produção de alimentos derivados. Como consequência da manipulação dos gêneros alimentícios, surgiram diversas doenças transmitidas por micro-organismos, tornando necessário adequar os cuidados com a limpeza e higienização durante o manuseio, produção e armazenamento dos alimentos. Estas práticas construíram-se um fator importante para a adaptação do ser humano à novas condições de vida. Muito embora alguns procedimentos como: salgar carnes e peixes, utilizar a neve para conservação de frutos do mar e defumar carnes fossem utilizados para prolongar a “vida útil” dos alimentos para garantir a sobrevivência no período de entressafra e de variações climáticas impróprias para obtenção de alimentos.

Outra transição importante foi o deslocamento das pessoas do meio rural para o meio urbano, levando novamente a adaptações no estilo de vida em diversos sentidos, diminuindo bastante a prática de exercícios físicos em decorrência dos confortos da vida urbana e ainda pelo consumo muitas vezes excessivo de alimentos industrializados, não raro obsogênicos.

Esse somatório tem levado ao crescimento da população com sobrepeso e ou obesidade, além do crescimento de outros problemas de saúde, as chamadas doenças crônicas não transmissíveis como diabetes e hipertensão, por exemplo.

Essas mudanças no estilo de vida do ser humano parecem ter uma relação direta entre a prática de exercícios físicos (que são cada vez naturalmente menos frequente) e hábitos alimentares; pois as pessoas ficam expostas constantemente a alimentos produzidos com muita manipulação e/ou adição outras substâncias com o objetivo de manter o produto em condições de consumo (pelo menos aparentemente) por um período mais prolongado.

A manipulação e produção de alimentos pode proporcionar a agregação e ou crescimento de vários micro-organismo, que podem ser de grande importância para alimentos e seres humanos, pois os mesmos podem provocar alterações químicas prejudiciais, causando a deterioração do alimento, alterando a cor, odor, sabor, textura e aspecto do mesmo; como também podem apresentar riscos à saúde de homens e animais quando as condições de higiene, produção, armazenamento e manuseio não estão dentro dos padrões de recomendados pelas agências reguladoras; um tipo de micro-organismo de grande importância dentro desse contexto são os fungos que podem produzir micotoxinas mutagênicas. Existem ainda aqueles micro-organismos que são intencionalmente selecionados e adicionados ao alimento para que promova reações químicas capazes de modificar suas características básicas, transformando-o em um novo produto; como ocorre para a obtenção do iogurte por exemplo.

As fontes de contaminação são as mais variadas, vão desde a própria água, até as plantas que por vezes servem de meio para o desenvolvimento de bactérias e fungos; os utensílios como recipientes e moedores, que podem proporcionar uma contaminação cruzada; o trato intestinal de homens e animais, sendo a principal fonte de contaminação de alimentos com micro-organismos enteropatogênicos; a microbiota dos próprios manipuladores (fossas nasais, boca e pele), que em condições inadequadas de higiene pode contaminar o alimento; a ração animal pode conter micro-organismos indesejáveis; a pele dos animais, cabendo citar o leite, que pode conter os mesmos micro-organismos da biota do úbere da vaca quando ordenhada sem a higiene necessária. Diante da grande variedade de micro-organismos e meios de proliferação dos mesmos é possível achar que exista a presença destes ou de seus resíduos nos mais diversos ambientes e alimentos, inclusive nos suplementos alimentares, bastante consumidos por quem pratica exercícios físico.

Parte da população brasileira não pratica exercícios físicos de forma que proporcione benefícios à saúde. No entanto, entre aqueles que se exercitam, com diferentes finalidades, é comum o uso de suplementos alimentares para promover melhora no desempenho atlético nas atividades esportivas.

Entre os suplementos mais comercializados, o *whey protein* é o de maior aceitação entre os frequentadores de academias de musculação, por ser um produto que em geral é anunciado com um grande aporte proteico e níveis baixíssimos de gordura, sugestionando o indivíduo a crer que o consumo do mesmo fará com que os

resultados sejam potencializados principalmente quando o objetivo é hipertrofia muscular.

A maioria dos trabalhos publicados sobre a qualidade do *whey protein* abordam aspectos relativos a concentração proteica, composição de aminoácidos, utilização comercial e qualidade nutricional. Entretanto, é necessário abranger os diferentes aspectos de qualidade deste suplemento. Neste contexto, é necessário que sejam pesquisados no produto, aspectos inéditos referentes a: qualidade higiênico-sanitária, substâncias estranhas de qualquer natureza e micotoxicologia.

Diante do grande interesse das pessoas em consumir o *whey protein*, e por este ser um produto que passa por um longo processo de produção até chegar ao consumidor final, podendo, portanto, adquirir sujidades, micro-organismos e suas toxinas, surgiu o interesse em investigar as condições higiênicas e sanitárias desse produto exposto à venda na cidade de Teresina, PI. Para tanto, com este trabalho objetivou-se analisar a rotulagem, quantificar micro-organismos indicadores higiênico-sanitários (bactérias heterotróficas mesófilas; fungos filamentosos e leveduras e *Staphylococcus coagulase positiva*) isolar e identificar fungos filamentosos, pesquisar sujidades, aflatoxinas e cafeína em suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados em embalagem individualizada ou sachês com dose única.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Alimento Proteico para Atletas

Os alimentos proteicos para atletas, também denominados de *whey protein*, são suplementos alimentares que surgiram como uma solução encontrada pela indústria de alimentos para o reaproveitamento das proteínas do soro do leite, um subproduto da produção de queijos (LUZ, 2016). As diversas formulações de *whey protein* disponíveis no mercado foram especialmente desenvolvidas para atender as necessidades nutricionais específicas dos atletas e contribuir na melhora do desempenho na prática de exercícios físicos. São considerados como atletas os praticantes de exercícios físicos com especialização e desempenho máximos com o objetivo de participação em esporte com esforço muscular intenso (BRASIL, 2010).

2.1.1 Movimentação Econômica

O mercado de suplementos alimentares está em expansão mundial (LINHARES e DIAS, 2013), sendo importante destacar que a indústria de alimentação movimenta aproximadamente US\$ 100 bilhões, com um crescimento médio de 20%, ao ano. Nos Estados Unidos da América, mais de um terço dos jovens tomam suplementos objetivando desenvolver a massa muscular e no Brasil, os consumidores de suplementos têm interesse em aperfeiçoar seu desenvolvimento atlético, melhorar aspectos estéticos, hedônicos e ainda, promover a saúde. Entre 2012 e 2013 o crescimento do mercado de suplementos no Brasil foi aproximadamente 23%; com 60% destes produtos sendo a base de *whey protein*. (MIURA, 2014). Dessa forma, pode-se verificar que a produção brasileira de suplementos em 2015 foi 105.355.949 kg com faturamento de R\$ 1.421.982 (BRASIL, 2015).

Para atender ao exigente mercado consumidor de *whey protein*, anualmente são oferecidos novos produtos com sabores e formatos diferentes para satisfazer as necessidades dos atletas (INDUSTRIATIVIDADE, 2017). Os principais consumidores brasileiros de *whey protein* são homens entre 20 e 59 anos que frequentam academia diariamente, pertencentes a classe média com renda média entre três a cinco salários mínimos com nível superior (MIURA, 2014). Esses dados estão relacionados ao aumento da quantidade de praticantes de exercícios físicos em academias de

musculação e ginástica que fazem uso de suplementos alimentares nas mais diversas regiões do Brasil (ANDRADE et al, 2012).

Em São Paulo, o uso relatado de suplementos, tanto progresso quanto atual por frequentadores de academia foi de 61% (HIRSCHBRUCH et al 2008) em Belo Horizonte por 81% (HALLAK et al 2008), em João Pessoa por 34,2% (ESPÍNOLA et al 2008). Entre os praticantes de musculação em Campo Grande a prevalência atingiu 56%; e entre os educadores físicos de Florianópolis 44%, incluindo o consumo atual e passado. Dados semelhantes foram encontrados em Balneário Camboriú (SC) (SHNEIDER et al 2008) e Ribeirão Preto (SP) (GOMES et al 2008), no qual o *whey protein* estava entre os mais consumidos

De um modo geral, a maioria dos praticantes de exercício físico não possui conhecimento correto sobre: as especificidades, indicações de cada suplemento e da forma correta para utilizá-lo, levando na maioria das vezes a insatisfações quanto ao resultado desejado, devendo este, ser o fator que os motivaram a procurar o auxílio do profissional nutricionista (ANDRADE et al. 2012). Em Teresina, PI foram entrevistados 100 frequentadores de uma academia da cidade, destes 73% afirmaram usar algum tipo de suplemento. O *whey protein* era o principal suplemento utilizado distribuído assim: 88% por homens e 78% por mulheres, os demais suplementos como: vitaminas e minerais eram consumidos na seguinte proporção: 4% entre os homens e 16% entre as mulheres (FREITAS et al, 2013). Como visto a grande maioria das pesquisas apontam utilização do suplemento *whey protein* com objetivo esportivo ou estético, muito embora esse suplemento seja destinado a atletas.

2.1.2 Soro de Leite

O soro do leite surgiu com a produção de queijos há oito mil anos, quando durante o processamento foi observado uma separação entre coalho e soro (CRYAN, 2001). Para produzir 1,0 kg de queijo, são necessários 10 litros de leite, resultando 9,0 litros de soro residual (BALCIUNAS, 2013; PRADO, 2013). Historicamente o soro era considerado como um resíduo para a indústria queijeira que era descartado em rios, lagos, oceanos ou despejados diretamente em esgoto das cidades. Porém, essa prática favorece o desenvolvimento de bactérias e aumento da demanda bioquímica de oxigênio (PRADO, 2013), tornando-se um produto com grande potencial em contaminação ambiental (ROHLFES et al, 2011). Para não haver desperdício, as

propriedades rurais utilizavam o soro para alimentação de porcos e outros animais, podendo ser também usado como fertilizante, ou simplesmente descartado (CRYAN, 2001).

A indústria queijeira brasileira produz anualmente 540.000 toneladas/ano, gerando 5,4 milhões de toneladas de soro, parte deste provavelmente seja eliminado nos rios sem nenhum tratamento (BALCIUNAS, 2013). O que pode caracterizar um grave problema sanitário se for considerado que para cada 100 kg de soro despejados diariamente nos efluentes equivalem aos despejos produzidos por 45 pessoas por dia (HOHLFES et al, 2014).

No entanto, o soro do leite possui minerais e proteínas com propriedades funcionais que levaram a produção de diferentes produtos alimentícios a partir do seu processamento, entre eles o *whey protein*. Em 1920 registra-se as primeiras tentativas industriais de isolar os sólidos do soro do leite por concentração e secagem pelos seguintes métodos: rolos secadores quentes convencionais, aquecimento até obter um líquido concentrado, esfriamento e extrusão em um túnel, aquecimento a vapor em duas etapas; e uma combinação de secagem por pulverização e secagem rotativa em tambor (CRYAN, 2001).

A evolução desse processo levou aos primeiros estudos sobre suplementação, realizados por Hopkins e Funk em 1929, que comprovaram uma relação do crescimento e o desenvolvimento de ratos pela ingestão dos nutrientes presentes no leite. Christensen, na década de 30, fez um estudo usando suplementação alimentar em pessoas desnutridas, e verificou que a manipulação da dieta alterava o rendimento dessas pessoas induzidas à atividade física (BORGES, 2017).

Com o avançar das pesquisas foi possível identificar nos suplementos, um alto valor nutritivo e propriedades funcionais benéficas. As proteínas do soro de leite tornaram-se interessantes no final da década de 1980, quando identificou-se o desenvolvimento de técnicas de fracionamento de membrana, incluindo ultrafiltração, osmose reversa e microfiltração, possibilitando a produção de produtos derivados de proteína de soro de leite, como soro de leite em pó, entre eles, o concentrado de proteína de soro de leite (WPC), isolado de proteína de soro de leite (WPI), hidrolisado de proteína de soro de leite (WPH) e lactoglobulina pura e lactalbumina (MAĆEJ, 2005).

O concentrado proteico do soro passou a ser utilizado em larga escala pela indústria de alimentos, por ser um produto com proteínas de alto valor biológico,

apresentar propriedades funcionais, nutracêuticas, além da capacidade de formar espumas, emulsões e géis (LUZ, 2016). Essa larga produção industrial no Brasil e no mundo estimulada por um mercado consumidor exigente, envolve a criação de novos produtos que utilizam processos, equipamentos e tecnologias cada vez mais inovadoras para atender consumidores interessados tanto na melhoria da saúde, quanto na estética corporal. Neste sentido ocorrem os investimentos na fabricação de produtos diferenciados, obtidos pela extração das proteínas de soro de leite, ou *whey protein*, que estão entre os produtos que apresentam demandas crescentes (LUZ, 2016).

2.1.3. *Whey Protein*

O *whey protein* é um suplemento alimentar hiperprotéico que possibilita ao organismo humano a reposição proteica rápida e de fácil assimilação, com pouca ou nenhuma concentração de gorduras, evita condições catabólicas ou metabolismo destrutivo após o treinamento intenso (MIURA, 2014). Para a elaboração do suplemento proteico para atletas (*whey protein*) é utilizado o lactossoro com características físico-química, microbiológica e sensoriais em consonância com os padrões regulamentares.

O soro do leite é classificado de acordo com o tipo de obtenção podendo o mesmo ser caracterizado como soro de leite doce ou soro de leite este caracteriza-se por ser um produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos e pode ser apresentado na forma líquida, concentrada ou em pó, resultante da coagulação por ação enzimática, devendo apresentar pH entre 6,0 e 6,8. Já o soro de leite ácido ou soro ácido resulta da coagulação principalmente por acidificação, devendo apresentar pH inferior a 6,0 (BRASIL, 2013). O soro de leite pode apresentar sabor ligeiramente ácido ou doce (FLORENCIO 2013), conforme o conteúdo em ácido láctico, dessa forma é classificado pela sua acidez total (OLIVEIRA et al 2012).

A formulação da *whey protein* deve conter na sua composição no mínimo: 10g de proteína que corresponde a 50% do valor energético total. A composição proteica deve apresentar escore aminoacídico corrigido pela digestibilidade de proteínas (PDCAAS) de acima de 0,9. (LUZ, 2016) conforme a recomendação da RDC 18 de 27/04/10 sobre o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas (BRASIL, 2010).

Pode-se verificar na literatura outras características atribuídas ao *whey protein* são comuns na literatura científica (ALMEIDA et al. 2006). Este suplemento consiste em um produto à base da proteína do soro do leite, uma proteína de baixo peso molecular com alto valor biológico de proteína e grande capacidade de absorção. Ou seja, o *whey protein* é um suplemento alimentar hiperprotéico que possibilita ao organismo humano a reposição proteica rápida e de fácil assimilação, com pouca ou nenhuma concentração de gorduras, evita condições catabólicas ou metabolismo destrutivo após o treinamento intenso (MIURA, 2014).

As proteínas de origem animal (ovos, leite, carne, peixe e aves) fornecem nutrientes de alta qualidade, no entanto, elas podem trazer consigo grandes quantidades de gorduras saturadas e de colesterol, o que não impede o reconhecimento dos efeitos positivos delas em vários grupos populacionais (HOFFMAN e FALVO, 2004).

As pesquisas realizadas sobre as proteínas do soro indicam que os aminoácidos presentes nas mesmas superam as doses recomendadas para crianças de dois a cinco anos e aos adultos, aspecto que torna esta fonte proteica a mais concentrada em aminoácidos essenciais em detrimento às demais fontes (TERADA et al, 2012).

Nesse sentido, quando se compara o *whey protein* as demais proteínas alimentares, ela é equivalente ou pode ser superior aos seguintes aspectos: valor biológico, utilização líquida de proteína e de PDCAAS (HOFFMAN e FALVO, 2004). De forma que se avalia que sua suplementação resulta em uma maior síntese de aminoácidos e proteínas para os consumidores (FISCHBORN, 2012).

Neste contexto, verifica-se que os aspectos positivos apresentados por este produto tenham ajudado o *whey* a conquistar uma grande credibilidade entre atletas e demais consumidores que visam melhorar a saúde e a estética (MIURA, 2014). O *whey* é a proteína mais popular entre os consumidores e o suplemento mais consumido tanto por homens quanto por mulheres (ANDRADE et al, 2012); chegando a ser citada como o suplemento mais conhecido do mundo, a melhor entre todas as proteínas existentes (BRASIL, 2018).

Para a produção desse suplemento ocorre uma sequência de etapas na cadeia produtiva que vai desde a produção do leite até o consumidor final, como segue: pré-produção (alimentação do gado, extração do leite e separação do soro); produção (fermentação, ultrafiltração, extração do soro em pó, envasamento); distribuição (representantes e próprio fabricante); comercialização (lojas específicas, lojas de

produtos naturais, lojas de material esportivo, lojas virtuais e exportação); consumo (pessoas com déficit nutricional, atletas, praticantes de atividades físicas, eventos/patrocínios) (LINHARES e DIAS, 2013)

Na etapa de produção a técnica mais utilizada é a ultracentrifugação, favorecendo a remoção da água e outros produtos por membrana semipermeável de forma que purifica, separa e concentra um produto, resultando em 50 a 75% de base seca com concentrados proteicos que podem conter até 90% de proteínas. O processamento segue com a secagem que pode ser feita por *spray dryer* ou liofilização. O *spray dryer* é um método semelhante ao utilizado para a obtenção do leite em pó. Já a liofilização é a secagem por congelamento, pois a água passa do estado sólido para o gasoso utilizando câmeras herméticas à vácuo a -40°C (LUZ, 2016).

Existem ainda, outras técnicas, como a microfiltração que consiste na separação das proteínas por um filtro microscópico e ainda a troca iônica, onde as proteínas são extraídas pela sua carga elétrica (LINHARES e DIAS, 2013). Nessa técnica podem ser utilizadas duas substâncias químicas: ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Porém, devido a utilização destes produtos, algumas frações da proteína que são sensíveis a mudança de pH e alguns aminoácidos são danificados, dentre eles os glicomacropéptidos, imunoglobulinas e α -lactalbumina. Um dos benefícios da troca iônica é que este processo resulta num produto com maior quantidade de proteína e geralmente menos gordura e lactose (ALMEIDA et al., 2006).

Independente do processo utilizado, será obtido concentrado de proteínas ou isolado proteico. Estes produtos podem exibir diferenças na sua composição de micro e macronutrientes; nesse item o componente proteico com maior concentração nas extrações do soro do leite é a beta-lactoalbumina que dependendo da forma utilizada para sua extração 100g de *whey* concentrado pode possuir em média: 414 kcal; 80g de proteínas; 7,0g de gordura e 8,0g de carboidratos (ALMEIDA et al. 2016).

Estes suplementos estão disponíveis no mercado em diversas formas: cápsulas, líquido, gel, flocos, barras ou em pó. Esta última, a forma mais comum e mais consumida (BRASIL, 2018). Os suplementos a base de *whey* podem variar quanto as suas concentrações, misturas e valor biológico, nesse sentido a literatura aponta uma predominância considerável de três tipos de classificações comerciais para o produto com características e concentrações de proteínas coincidentes. São eles: concentrado, isolado e hidrolisado. Considera-se como “concentrado” os suplementos

que contenham entre 25 a 89% de proteínas (HOFFMAN; FALVO, 2004; TERADA et al. 2012; CARRILHO 2013).

Para sua obtenção, o soro do leite é submetido a filtrações que não eliminam completamente a gordura e lactose, preservando a estrutura proteica, faz com que a digestão se torne mais lenta (MIURA, 2014). Estes fatores favorecem que as formulações de *whey* concentrados tenham preços mais acessíveis para o consumidor, porém contenham lactose e gordura em teores mais elevados (ALMEIDA et al 2016).

No *whey* caracterizado comercialmente como “isolado” a concentração de proteína devem ser superior a 90% (HOFFMAN & FALVO 2004; TERADA et al. 2012; CARRILHO 2013; ZAMBÃO et al. 2015; BRASIL, 2018). Neste produto o soro do leite é submetido a um processo de filtração que quebra a estrutura das proteínas; reduz os teores de colesterol, de gordura e de lactose (MIURA, 2014); a redução dessas substâncias, pode chegar a quantidades inferiores a 1,0% (BRASIL, 2018). Por este motivo, pode ser recomendada para indivíduos intolerantes a lactose (HOFFMAN e FALVO, 2004).

O outro tipo de *whey* disponível comercialmente, “hidrolisado” é composto por fração de peptídeos de alto valor nutricional e apresenta boa digestibilidade e baixo potencial alergênico. Durante o processamento, as moléculas de proteína do soro do leite são hidrolisadas a dipeptídeos e tripeptídeos, podendo conter até 98% de peptídeos no produto pronto para consumo (TERADA et al, 2012; MIURA, 2014; ZAMBÃO; ROCCO; VONDER HEYDE, 2015). Em função de suas características o hidrolisado, também pode ser uma alternativa não apenas para os consumidores intolerantes à lactose, mas também aqueles que apresentam alergia às proteínas do leite.

O desenvolvimento do processo do *whey* isolado e hidrolisado garantem maior pureza aos suplementos de proteínas comercializados. Porém estes procedimentos são responsáveis por elevarem o preço do produto vendido com o nome de *whey protein*, pois quanto mais eficientes estes métodos, mais pura é a proteína extraída, com isso, maior valor agregado (LINHARES e DIAS, 2013).

Independentemente do método de processamento, o suplemento *whey protein* tem uma grande aceitação, com um elevado consumo tanto por mulheres como por homens (ANDRADE et al, 2012). Antigamente, a ingestão de proteínas e suplementação era uma prática focada em populações atléticas quase que exclusivamente (HOFFMAN e FALVO, 2004). Com o passar do tempo o uso da *whey*

protein ainda é comum entre atletas e praticantes de atividades físicas que procuram aumento de desempenho, como também por pessoas que buscam melhorar a forma física ou adotar um estilo de vida saudável. Podendo ser classificado como um produto tanto de uso extensivo, quanto intensivo (BRASIL, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a qualidade de suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados em embalagem individualizada ou sachês

3.2 Específicos

Avaliar os elementos de rotulagem de suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados em embalagem individualizada ou sachês

Quantificar as bactérias heterotróficas mesófilas; fungos filamentosos e leveduras e *Staphylococcus* coagulase positiva em suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados nas embalagens individualizadas ou sachês

Aferir os valores de atividade de água dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados nas embalagens individualizadas ou sachês

Isolar e identificar fungos filamentosos em suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados nas embalagens individualizadas ou sachês

Analisar sujidades em suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados nas embalagens individualizadas ou sachês

Pesquisar cafeína e aflatoxinas em suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados nas embalagens individualizadas ou sachês

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Inicialmente, lojas e distribuidores de suplementos alimentares localizados em Teresina, PI foram visitados para identificar as possíveis formas de apresentações comerciais e as principais marcas de *whey protein* disponíveis no mercado. Constatou-se que algumas marcas apresentavam o produto em duas formas: sachês com dose única (de até 50g) e potes contendo quantidades superiores (900g a 2.000 g). Os critérios utilizados para escolha das marcas foram: disponibilidade para o consumidor nas duas formas de apresentação (sachê e pote) e ampla distribuição no comércio local. Em seguida, optou-se por adquirir o produto disponível em forma de sachê por ser um produto de fácil acesso ao consumidor, e que sugere um consumo de forma indiscriminada e aleatória.

4.2 Coleta das Amostras e Delineamento Experimental

Em julho de 2017 foram adquiridas em três estabelecimentos selecionados aleatoriamente, seis marcas de *whey protein* na forma de sachê ou embalagem individualizada com os sabores disponíveis em Teresina, PI. Para efeito de pesquisa, as marcas foram denominadas da seguinte forma: A (caramelo); B, C e D (baunilha); E e F (chocolate). Desta forma, o experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 4 (seis marcas e quatro repetições), totalizando 24 amostras.

Após a compra os sachês foram transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Em seguida, os sachês foram armazenados em um depósito fechado no laboratório, até a aquisição de todas as amostras. Após a retirada das amostras para as análises microbiológicas e de microscopia, as embalagens eram lacradas e transferidas imediatamente para o Laboratório de Geoquímica Orgânica, do Departamento de Química, do Centro de Ciências da Natureza da UFPI para as análises cromatográficas.

4.3 Análise de Rotulagem

A legislação específica para suplementos proteicos para atletas (BRASIL 2010) estabelece parâmetros resumidos para rotulagem dos produtos e faculta a utilizar, por similaridade, a legislação para alimentos para complementar estas instruções. Desta forma, para avaliação da rotulagem das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) foram utilizados os critérios exigidos obrigatoriamente pela legislação vigente para rotulagem (BRASIL 2003, BRASIL 2005a; BRASIL 2005b, BRASIL 2006, BRASIL 2012), totalizando 22 itens analisados.

Após a aquisição das unidades amostrais (sachês), foram verificados os seguintes elementos oficiais de rotulagem nutricional (BRASIL 2005a; BRASIL 2005b) resumidos na tabela 1.

Utilizou-se ainda a legislação referente a rotulagem nutricional de alimentos embalados individualmente RDC Nº 163 que estabelece obrigatoriedade a informação nutricional por porção (BRASIL 2006) e, o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar (BRASIL 2012) referente as informações complementares para o consumidor: ingredientes, corantes e conservantes, informações e restrições de consumo; necessidade de recomendação de nutricionistas ou de médicos para consumo; peso líquido, validade e partida, ingredientes, sugestões de uso, modo de preparo, recomendações de armazenamento, endereço do fabricante.

Também foram avaliadas informações complementares para o consumidor (BRASIL 2006): presença de cafeína, corantes e conservantes, informações e restrições de consumo; responsabilidade técnica, serviço do SAC, necessidade de recomendação de nutricionistas ou de médicos para consumo. Outros elementos de rotulagem que também foram verificados: sabor, presença de cafeína tipo de *whey* (concentrado, hidrolisado ou isolado) responsabilidade técnica e serviço do Serviço de assistência ao Consumidor (SAC).

Tabela 1. Parâmetros de rotulagem analisados nas embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI.

Elementos de rotulagem analisados	Legislação
Informação nutricional que deve corresponder ao conteúdo líquido da embalagem, rotulagem de alergênicos;	BRASIL 2005a
Palavras ou qualquer representação gráfica que possa tornar a informação falsa, ou que possa induzir o consumidor ao erro;	BRASIL 2005 ^a
Demonstrar propriedades que não possuam ou não possam ser demonstradas;	BRASIL 2005 ^a
Destacar a presença ou ausência de componentes que sejam próprios ou impróprios de alimentos de igual natureza;	BRASIL 2005 ^a
Ressaltar nas marcas de <i>whey protein</i> pesquisadas), a presença de componentes que sejam adicionados como ingredientes em todos os alimentos com tecnologia de fabricação semelhante;	BRASIL 2005 ^a
Indicar que o alimento possui propriedades medicinais ou terapêuticas ou aconselhar o seu consumo como estimulante, para melhorar a saúde, para prevenir doenças ou com ação curativa.	BRASIL 2005 ^a
Declaração de valor energético e nutrientes nas porções de embalagens individuais:	BRASIL 2003 BRASIL 2006
Presença de corantes e conservantes;	BRASIL 2012
Serviço de SAC	BRASIL 2012
Sabor	BRASIL 2012
Peso líquido	BRASIL 2012
Validade e lote	BRASIL 2005b
Ingredientes	BRASIL 2012
rotulagem de alergênicos	BRASIL 2015
Modo de preparo	BRASIL 2012
Endereço do fabricante	BRASIL 2012
Necessidade de recomendação de que seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico	BRASIL 2005b
Advertência: “Este produto não substitui uma alimentação equilibrada”	BRASIL 2005b
Sugestões de uso*	BRASIL 2005 ^a
Presença de cafeína	BRASIL 2015
Informações e restrições de consumo	BRASIL 2012
Recomendações de armazenamento	BRASIL 2012
Tipo de <i>whey</i> (concentrado, hidrolisado ou isolado),	BRASIL 2012
Responsabilidade técnica	BRASIL 2012

4.4 Métodos Microbiológicos

4.4.1 Preparo das Amostras

No laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, de cada unidade amostral transferiu-se assepticamente 10 g das amostras *whey protein* para um frasco com 90 mL contendo água peptonada a 0,1% esterilizada formando a diluição inicial (10^{-1}). A partir desta, foram feitas diluições seriadas até 10^{-3} .

4.4.2 Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas (SILVA et al, 2017)

Para realização da contagem de bactérias heterotróficas mesófilas utilizou-se o método de plaqueamento em profundidade ou *pour plate*, em que foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-3} para placas de Petri esterilizadas, em seguida adicionou-se agar padrão para contagem (PCA) fundido. As placas foram semeadas em duplicata. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa de 37°C por 48 horas. Após este período, procedeu-se a leitura e os resultados foram expressos em unidade formadora de colônia por grama (UFC/g).

4.4.3 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para contagem de estafilococos coagulase positiva utilizou-se o método/o de contagem direta em placas. Foram transferidas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-3} para placas de Petri contendo agar Baird-Parker (BP). Em seguida, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do agar com auxílio de alça de Drigalski e incubou-se as placas em estufa bacteriológica, à temperatura de 37°C por 48h (SILVA ET AL, 2017).

Após esse tempo quantificou-se o número de colônias típicas e atípicas de cada placa e selecionou-se três de cada tipo e semeou-se em tubos de ensaio esterilizados contendo caldo BHI, que foram incubados a 37° C por 24 horas. Em seguida, cada de cada cultivo foi realizada a observação da morfologia das bactérias pelo método de Gram e realizou-se os seguintes testes: da catalase, da fermentação de manitol e o teste de produção de coagulase.

O cálculo do número de UFC/g foi realizado em função do número de colônias típicas contadas multiplicadas pela diluição inoculada e pela porcentagem de colônias confirmadas. Os resultados foram expressos em UFC/g.

4.4.4 Contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras

A contagem de fungos filamentosos e de leveduras em unidades formadoras de colônias por grama de *whey protein* foi realizada segundo metodologia de diluição decimal seriada em placas, descrita por Pitt e Hocking (2009).

Foram transferidas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-3} em duplicata para placa de Petri para semear em superfície no meio de cultivo Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) recomendado por King et al. (1979), com auxílio de alça de Drigalski esterilizada. As placas com DRBC foram incubadas a 25 °C durante sete dias em estufas microbiológicas com controle eletrônico de temperatura. Transcorrido tal período, todas as placas foram observadas, sendo selecionadas para contagem aquelas que continham de 10 a 100 UFC.g⁻¹ (DALCERO et al., 1997; DALCERO et al., 1998).

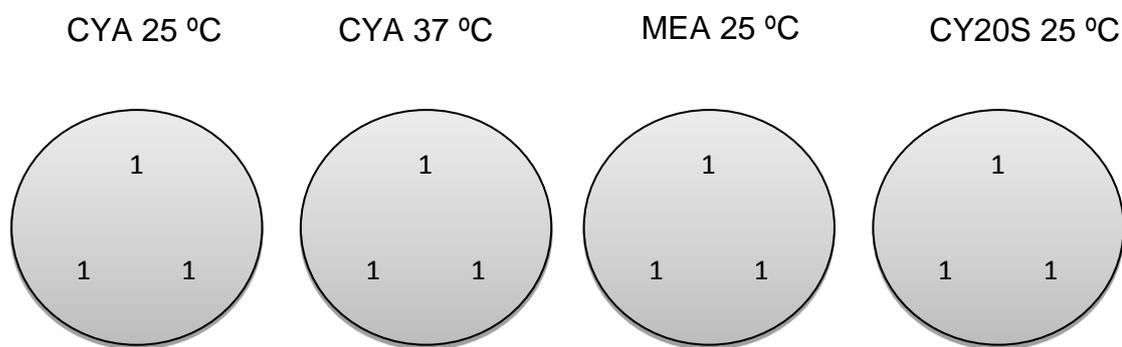
4.4.5 Isolamento e Identificação Fúngica

A identificação do gênero das colônias foi realizada segundo Samson et al. (2000) conforme as suas características macro e microscópicas. As colônias fúngicas identificadas como *Aspergillus* e *Penicillium* foram subcultivadas em tubos inclinados contendo Agar Extrato de Malte (MEA) e as de *Fusarium* foram repicadas em tubos com Agar Spezieller Nalvistoffarmer (SNA) e Agar Batata Dextrose (BDA) para a posterior identificação das espécies.

As colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus* spp. foram identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por Klich (2002) baseada na semeadura padrão em três meios básicos (Figura 1): agar extrato de levedura Czapek (CYA); agar extrato de levedura Czapek 20% sacarose (CY20S); agar extrato de malte (MEA). Em microtubos previamente esterilizados preparou-se o inóculo das cepas isoladas, de acordo com a metodologia descrita por Klich (2002).

Preparou-se uma suspensão de conídios em 0,5 mL de meio ágar semi-sólido constituído de 0,2% de ágar-ágar e 0,05% de Tween®80. A suspensão de conídios

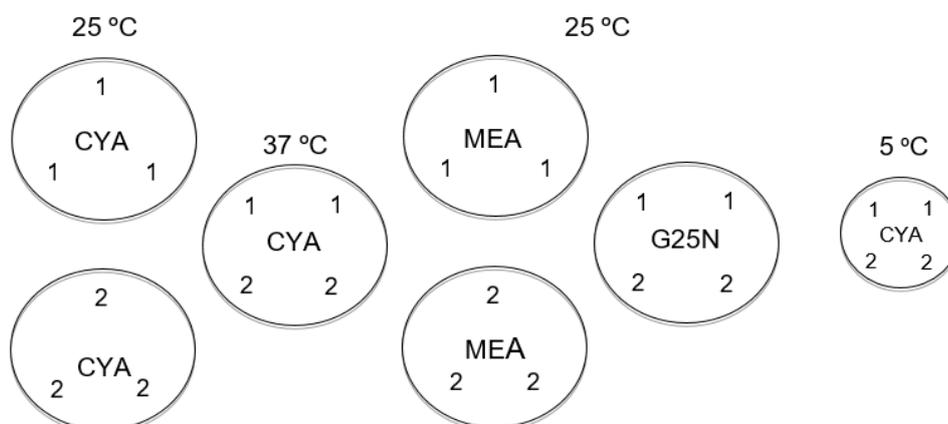
foi inoculada por meio de alça de platina em forma de agulha em placas de Petri contendo os meios de cultivo. A agulha foi introduzida na suspensão e o inóculo foi distribuído em três pontos equidistantes nas placas com os diferentes meios. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 25 °C por sete dias. Após a incubação, visando à identificação das espécies, foram observadas suas estruturas micromorfológicas e as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e cor de exsudado).



Fonte: KLICH (2002) adaptado por ALVES 2014

Figura 1 - Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas (25 e 37 °C).

As colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Penicillium* spp. foram identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por Pitt (2004), baseadas na semeadura em três meios básicos (Figura 2): Agar Extrato de Levedura Czapek (CYA); Agar Extrato de Malte (MEA); e Agar Nitrato de Glicerol 25% (G25N). Para maior eficiência e aproveitamento do sistema, inoculou-se as placas de Petri com duas cepas diferentes a serem testadas; a preparação da suspensão de conídios e inoculação nos meios de cultivo foi igual à utilizada para *Aspergillus* spp.



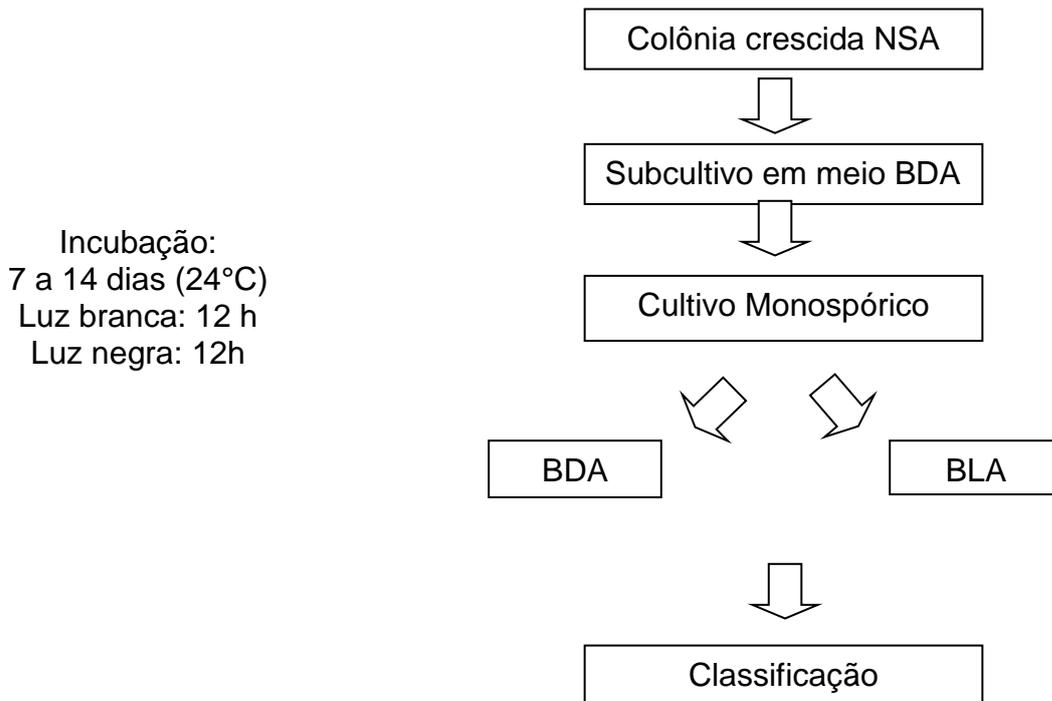
Fonte: KLICH (2002) adaptado por ALVES (2014)

Figura 2 - Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37 °C).

As colônias fúngicas isoladas pertencentes ao gênero *Fusarium* spp. foram identificadas pelo método de diluição em placa recomendado por Booth (1971). Após subcultivo em meio agar dextrose batata (BDA), realizou-se o cultivo monospórico que consiste em recolher pequena quantidade de micélio da colônia subcultivada e agitá-lo em tubo com cerca de 10 mL de água destilada esterilizada.

A suspensão era então vertida sobre placa de Petri contendo ágar-ágar 1,5% e homogeneizado em movimentos em forma de “8” sobre a bancada. O sobrenadante foi descartado e a placa era incubada a temperatura ambiente inclinada em ângulo aproximado de 45°.

Após período de 16 a 18 horas, as placas foram examinadas por microscopia (x 30) em busca de conídios germinados isolados. Um único conídio por vez era removido e transferido para o meio Agar Batata Dextrose (BDA) e também para o meio Agar Folhas de Bananeira (BLA), modificando a metodologia original que emprega o meio Agar Folhas de Cravo (CLA), conforme Keller (2009). Após incubação por sete a 14 dias (foto período de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra), as colônias foram identificadas usando critérios microscópicos e macroscópicos segundo a chave taxonômica de Nelson et al. (1983) conforme está esquematizado na Figura 3.



Fonte: NELSON et al. (1983) adaptado por Keller (2009).

Figura 3 - Esquema de incubação das cepas de gênero *Fusarium* nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final.

4.5 Determinação da Atividade de Água

Foi realizada a determinação de atividade de água em ponto de orvalho em aparelho portátil marca Decagon, modelo Pawkit série PO 3413 conforme recomendação do fabricante. Retirou-se aproximadamente 10g da amostra e transferiu-se para recipiente próprio que foi inserido no aparelho. Após 10 segundos realizou-se a leitura diretamente no visor.

4.6 Métodos de Microscopia

Para a análise foi utilizado o método de pesquisa de sujidades por digestão enzimática (WILDMAN), conforme descrito em Villela (2004), para alimentos em pó. Foi realizada um *pool* com as quatro repetições para cada marca de *whey protein* testada para realização da microscopia no Laboratório de Controle Físico-químico de Alimentos do NUEPPA. Para preparar o *pool* das marcas, de cada sachê foi retirado 5,0 g que foram transferidas para um frasco lavado e seco.

4.6.1 Solução de Pancreatina (VILLELA, 2004)

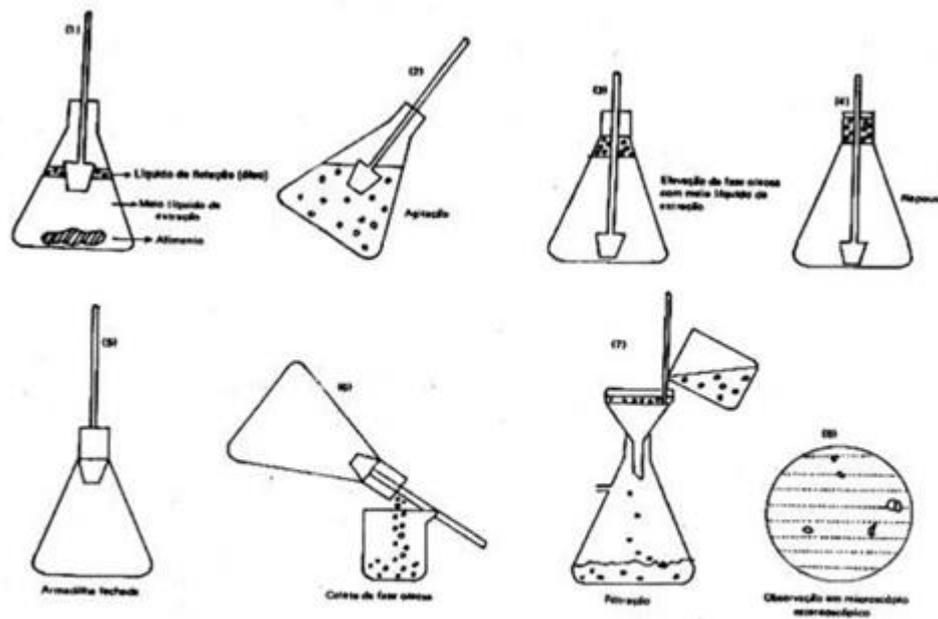
Pesou-se 10 gramas de pancreatina NF (National Formulary) Merck. (art. 7130) a qual foi adicionada 100mL de água aquecida a 38°C. Esta mistura foi homogeneizada em liquidificador doméstico por 10 minutos e posteriormente permaneceu em repouso por 30 minutos, com agitações ocasionais. Em seguida a mistura foi filtrada duas vezes utilizando-se papel filtro e depois foi submetida a filtração a vácuo, em funil de Büchner, sobre papel de filtro qualitativo de filtração média. Retirou-se 10mL do filtrado e acrescentou-se 90mL de água destilada. Esta é a solução de uso no método. Esta solução foi conservada sob refrigeração por um período máximo de uma semana.

4.6.2 Análise Microcópica

Retirou-se 25 g do *pool* amostral ao qual foi adicionado 50 mL da solução de pancreatina homogeneizando-se a seguir. Na sequência acrescentou-se água destilada até completar o volume de 400 mL. Depois, o pH 8,0 foi ajustado com solução de Na₂PO₄ a 5,0%. Essa mistura permaneceu em repouso por 15 minutos, decorrido esse período verificou-se o pH, esse procedimento foi repetido após 45 minutos. Em seguida foram adicionadas três gotas de formol, homogeneizou-se e deixou em repouso por 12 a 18h em temperatura ambiente inferior a 40°C.

Essa mistura foi transferida para frasco armadilha de Wildman, lavando-se bem o frasco tipo Bequer com porções de água destilada, até completar o volume aproximado de 900 mL. Em seguida adicionou-se 30 mL de querosene e inclinou-se o frasco de Wildman e com rápidos movimentos circulares, ascendentes e descendentes da haste, misturando bem o conteúdo, para evitar a formação de bolhas de ar. Em seguida, a mistura foi homogeneizada por um minuto, com fortes movimentos de rotação de forma que o conteúdo gire, evitando a perda ou derrame de líquido.

Terminada agitação, adicionou-se água quente entre 40 a 50°C até que o líquido de extração (camada oleosa) atinja o gargalo do frasco. De cinco em cinco minutos agitou-se a mistura durante 20 minutos, em seguida a mistura permaneceu em repouso durante 10 minutos para ocorrer separação nítida entre as fases aquosa e oleosa. Após esse intervalo a rolha do frasco de Wildman foi movimentada suavemente até o gargalo, de formasse uma camada sobrenadante oleosa (Figura 4).



Técnica de extração com frasco-armadilha de Wildman (AKOZUE *et al.*, s.d).

Fonte: BARBIERI (2001) apud Villela (2004)

Figura 4: Esquema para obtenção de sujidades pelo método da digestão enzimática proposto por Wildman

Em seguida a camada oleosa foi transferida para um frasco tipo Béquer e posteriormente foi filtrado a vácuo funil de filtração (Büchner) com papel de filtro qualitativo, acoplado a um sistema de vácuo que utiliza frasco de Kitasato. Após filtração o papel de filtro com o qualitativo foi transferido para uma placa de Petri (figura 4).

Na etapa seguinte realizou-se a microscopia em três fases: a): observação direta no papel filtro para verificar a presença de insetos e/ou seus fragmentos, pelos de animais, sujidades e demais corpos estranhos utilizando-se lupa com aumento de 400x; b): captura dos fragmentos com bastão e transferência para lâmina de microscópio com lamínula; c) observação em microscópio ótico com aumento de 400x. Os resultados foram expressos como presença ou ausência de sujidades, larvas e ou parasitas/25g de *whey protein*.

4.7 Detecção e Quantificação de Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) e Cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

4.7.1 Preparo de Curva Analítica

Seis soluções de trabalhos foram preparadas a partir dos padrões analíticos de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 (Japanese Aflatoxin Mixture Ref. CRM40139 Sigma Aldrich do Brasil e Aflatoxin M1 Ref. CRM46319 Sigma Aldrich do Brasil) e cafeína (Caffeine Ref. C0750, Sigma Aldrich do Brasil) nas concentrações de 10, 15, 20, 35, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os padrões de aflatoxinas e de 100, 250, 500, 750, 1.000 e 1.250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o padrão de Cafeína, usando metanol Grau LC-MS (Sigma Aldrich Ref. 1.06035.2500) como solvente de diluição e analisadas por CLAE-EM.

4.7.2 Ensaios de Recuperação de Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)

Ao *whey protein* homogeneizado com o líquido extrator foram adicionadas 100 μL de duas soluções de trabalho preparadas a partir dos padrões analíticos de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, usando metanol Grau LC-MS (Sigma Aldrich Ref. 1.06035.2500) como solvente de diluição, seguidas por um período de repouso de 30 minutos e seguido da etapa de extração descrita a seguir e analisadas por CLAE-EM.

4.7.3 Extração e Purificação dos Extratos

A extração e purificação dos extratos foram realizadas de acordo com a metodologia adaptada do que foi descrita por Teixeira et al. (2008). Para extração foram utilizados 25 g de amostra, na qual adicionaram-se 70,0 mL de metanol e 10,0 mL de solução de cloreto de potássio 4,0%. Em seguida a amostra foi submetida a agitação em liquidificador doméstico por cinco minutos. Após a homogeneização foram adicionados 75,0 mL de solução clarificante (sulfato de amônio PA 30%) e 7,5 g de celite 545 (017907 QEEL Química).

Posteriormente, a amostra foi submetida novamente a agitação por cinco minutos, seguido de repouso por 20 minutos. Em seguida seria realizada a filtração

para seguir a etapa de partição líquido-líquido. Entretanto, devido a elevada viscosidade da amostra em suspensão, não foi possível realizar a filtração em papel filtro Whatman n° 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, E.U.A.), mesmo utilizando o método de sucção por vácuo com funil de Büchner; necessitando adaptar a metodologia recomendada por Teixeira et al. (2008) da seguinte maneira: alíquotas de 10 mL da suspensão foram transferidas para oito tubos de Falcon de plástico para centrifugação (centrífuga Sigma modelo 2-5) a 3.500 rpm por 25 minutos. Essa etapa foi repetida por três vezes até formar um volume de 50 mL de sobrenadante.

Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 50 mL para um frasco tipo *Becker*, seguida de adição de 50 mL de água destilada, essa mistura foi transferida para um balão de decantação de 500 mL, no qual foram adicionados 20 mL de clorofórmio e agitou-se manualmente por cinco minutos.

Decorrido esse tempo, foi aberta a torneira do balão para retirada da fração clorofórmica que foi recolhida para um frasco tipo *Erlenmeyer* com capacidade para 50 mL, depois foram adicionados 20 mL de clorofórmio ao balão e procedeu-se mais uma agitação manual com posterior retirada do líquido decantado em outro frasco tipo *Erlenmeyer* de forma a obter 40 mL da fase.

Em seguida, o solvente foi evaporado em banho-maria a 60 °C por aproximadamente 15 minutos. O extrato seco resultante foi suspenso em 1,0 mL de clorofórmio e em seguida homogeneizado em agitador tipo *vórtex*. Após a suspensão, foi acondicionado em frasco âmbar com capacidade de 4,0 mL para posterior evaporação do solvente em capela de fluxo laminar. O extrato seco resultante foi armazenado em *freezer* até o momento da análise de aflatoxinas e de cafeína.

4.8 Métodos Cromatográficos

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um UFLC Shimadzu, equipado com uma coluna Shim-pack XR-ODS C18 (50mm x 2.0 mm i.d., tamanho de partícula de 2,2 µm). Temperatura do forno mantida a 40 °C. A fase móvel empregada constituiu-se de Água (Grau LC-MS, Sigma Aldrich Ref. 14263), contendo 0,1 % de ácido fórmico (v/v; Grau LC-MS, Sigma Aldrich; Ref. 56302) como eluente A e Metanol (Grau LC-MS, Sigma Aldrich; Ref. 1.06035.2500) contendo 0,1 % de ácido fórmico Sigma (v/v; eluente B; Grau LC-MS, Ref. 56302). O fluxo empregado foi de 200 µL/min e o gradiente foi programado com fluxo contendo 5,0% do eluente B por três min,

seguido de um aumento linear para 60 % do eluente B até o tempo de cinco min, permanecendo nestas condições por sete minutos, retornando para 5,0 % do eluente B por quatro minutos para acondicionamento da coluna. O volume injetado foi de 10 µL, com auxílio de um auto-injetor (SIL-20A HT).

Os cromatogramas foram monitorados por espectrômetro de massas Bruker (micrOTOF QII) equipado com uma fonte de ionização por eletronspray (ESI), operando no modo positivo, utilizando nitrogênio como gás de nebulização. A pressão do nebulizador foi ajustada para 4,0 bar, o fluxo do gás de secagem foi ajustado para 8,0 L/min e a temperatura do gás de secagem ajustado em 200 °C. A voltagem do capilar foi ajustada para 4.500 V. A calibração do espectrômetro foi realizada com auxílio de formiato de sódio na faixa de m/z 50 a 900.

O limite de quantificação do método analítico foi de 10 µg/L para aflatoxina (Japanese Aflatoxin Mixture Ref. CRM40139 Sigma Aldrich do Brasil e Aflatoxin M1 Ref. CRM46319 Sigma Aldrich do Brasil) e de 100 µg/L de cafeína (Caffeine Ref. C0750, Sigma Aldrich do Brasil). A curva padrão foi construída em diferentes níveis de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e Cafeína pode ser visualizada na Figura 7. A quantificação dos analitos foi determinada pela correlação das áreas sob a curva dos picos dos padrões e dos extratos das amostras, utilizando o *software* Compass Data Analysis (Versão 4.1, Bruker). A estimativa do limite de detecção (Tabela 2) foi determinada com base na relação de três vezes o ruído da linha de base, conforme a equação 1 (ICH, 1996)

$$\text{Equação 1} \quad LD = \frac{DP \times 3}{IC}$$

em que:

DP= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação;

IC= inclinação da curva de calibração

A estimativa do limite de quantificação foi determinada com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base, conforme a equação 2 (ICH, 1996).

$$\text{Equação 2} \quad LD = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Em que:

DP= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação;

IC= inclinação da curva de calibração

Tabela 2: Limite de detecção e limite de quantificação das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e cafeína

Analito	Limite de Detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)
AFB1	1,5	5,0
AFB2	0,4	1,2
AFG1	1,2	3,9
AFG2	1,7	5,7
AFM1	0,9	3,1
Cafeína	22,0	73,2

4.9 Análise Estatística

Os dados das contagens de bactérias heterotróficas, de estafilococos coagulase positiva e de fungos filamentosos e leveduras foram transformados em $\log_{10}(x+1)$, realizou-se o teste da normalidade e em seguida a análise de variância pelo método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey para comparação das médias pelo pacote estatístico SigmaStat® v.3,5 (Systat Software, San Jose, CA, 2005) com significância de mínima $< 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de Rotulagem

Referente a rotulagem nutricional obrigatória (BRASIL 2005a) as marcas pesquisadas atendiam plenamente cinco parâmetros dos seis exigidos pela legislação (tabela 3). Quanto ao item: “informação nutricional que deve corresponder ao conteúdo líquido da embalagem, rotulagem de alergênicos” três marcas (50%) estavam desconformes quanto ao aspecto “rotulagem de alergênicos”. Em uma das marcas (16,7%), não constava informações para alérgicos referentes a presença de clara de ovo em pó e de óleo de peixe, embora fizessem parte da lista dos ingredientes declarada no rótulo, contrariando também a RDC 26 de 2015 que estabelece os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias (BRASIL, 2015). As duas marcas (33,4%) com sabor chocolate não declararam a presença de cafeína no rótulo, embora esta substância seja inerente ao produto (tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros analisados relativos a rotulagem nutricional obrigatória nas embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI.

Elementos oficiais de rotulagem nutricional obrigatória (*)	Marcas em conformidade (%)
a) informação nutricional que deve corresponder ao conteúdo líquido da embalagem, rotulagem de alergênicos;	3 (50,0)
b) palavras ou qualquer representação gráfica que possa tornar a informação falsa, ou que possa induzir o consumidor ao erro;	6 (100,0)
c) Demonstrar propriedades que não possuam ou não possam ser demonstradas;	6 (100,0)
d) Destacar a presença ou ausência de componentes que sejam próprios ou impróprios de alimentos de igual natureza;	6 (100,0)
e) Ressaltar nas marcas de <i>whey protein</i> pesquisadas), a presença de componentes que sejam adicionados como ingredientes em todos os alimentos com tecnologia de fabricação semelhante;	6 (100,0)
f) Indicar que o alimento possui propriedades medicinais ou terapêuticas ou aconselhar o seu consumo como estimulante, para melhorar a saúde, para prevenir doenças ou com ação curativa.	6 (100,0)

(*) BRASIL 2005a; BRASIL 2005b

Cinco marcas (83,3%) informavam sobre: a necessidade de recomendação de nutricionistas ou de médicos para consumo e Sugestões de uso (Tabela 4). Apenas uma das marcas (16,7%) informava na rotulagem que a embalagem continha whey isolado, as demais não mencionavam se era concentrado, isolado ou hidrolisado.

Tabela 4. Informações complementares para o consumidor, verificadas na rotulagem das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI.

Elementos oficiais de rotulagem (*)	Marcas em conformidade (%)
Presença de corantes e conservantes;	6 (100,0)
Serviço de SAC	6 (100,0)
Sabor	6 (100,0)
Peso líquido	6 (100,0)
Validade e lote (**)	6 (100,0)
Ingredientes	6 (100,0)
Modo de preparo	6 (100,0)
Endereço do fabricante	6 (100,0)
Necessidade de recomendação de que seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico (**)	5 (83,3)
Advertência: “Este produto não substitui uma alimentação equilibrada” (**)	5 (83,3)
Sugestões de uso*	5 (83,3)
Presença de cafeína	4 (66,0)
Informações e restrições de consumo	4 (66,0)
Recomendações de armazenamento	4 (66,0)
Tipo de <i>whey</i> (concentrado, hidrolisado ou isolado),	1 (16,7)
Responsabilidade técnica	0 (0,00)

(*) BRASIL 2005a; BRASIL 2005b (**) BRASIL 2010

Existem várias formas de apresentação comercial de *whey* que deveriam padronizar as informações nutricionais contidas na rotulagem. Apenas a marca “E” (16,7%) (Tabela 4) informava que o *whey protein* era do tipo “isolada” que continha 92% de proteína. As demais não declaram explicitamente a associação dentre

qualidade e quantidade de proteína contida na formulação. As informações nutricionais por porção presentes nas rotulagens de suplementos proteicos em sachês são estimadas para dietas de 2.000 calorias diárias, sem especificação individual referente a: gênero, idade, peso e atividade física praticada, sendo necessário ajustar o consumo conforme as características individuais (WOLFE et al. 2017). Atletas que objetivem aumentar a massa muscular devem consumir proteínas entre 1,6 a 1,7 g por quilo de peso corporal, os que praticam esportes em que o predomínio é a resistência devem consumir entre 1,2 a 1,6g/kg, deste modo, os atletas devem ser conscientizados de que o aumento do consumo proteico na dieta além dos níveis recomendados não leva aumento adicional da massa magra (HERNANDEZ; NAHAS 2009).

Apesar do consumidor ser atraído pela oferta de proteína descrita no rótulo, ainda deve constar no mesmo as consequências da ingestão inconsciente e excessiva de proteínas. O consumo médio de proteínas varia conforme o sexo, peso corporal e massa corporal magra, nível de atividade, outros fatores individuais como: estado nutricional, condições de saúde (CASAS et al. 2015) e ainda atividades físicas regulares (HERNANDEZ; NAHAS 2009). De forma geral, pessoas sedentárias devem consumir diariamente 0,8 a 1,0 grama de proteína por quilo de peso (g/kg), praticantes de exercícios físicos e demais atletas de alta performance até 2,0 g/kg (MENON; SANTOS 2012) ou até quantidades superiores como indivíduos treinados em resistência que chegaram a consumir uma dieta extremamente rica em proteínas (4,4 g/kg/dia) (JÄGER, et al, 2017). Dependendo do tipo de *whey* adquirido, o consumidor pode ingerir proteínas de forma inadequada, interferindo na qualidade e ou quantidade do valor diário de ingestão.

O excesso de proteína consumida não leva necessariamente ao aumento de massa muscular, uma vez que nem todos os aminoácidos resultantes são incorporados a síntese proteica, sendo parte deles degradada e em via metabólica para produção de energia e o nitrogênio é excretado. Este excesso sobrecarrega o fígado pela necessidade de detoxicação da amônia resultante e os rins pela sobrecarga de excreção de produtos nitrogenados. O consumo excessivo de proteína por ratos alimentados experimentalmente com suplementos proteicos para atletas por 14 semanas apresentou as seguintes alterações: a) no fígado: congestão nos vasos sanguíneos hepáticos, aumento de apoptose, destruição dos hepatócitos e espessamento da membrana, b) no sangue: aumento das transaminases, colesterol,

lipoproteínas e triacilgliceróis e c) redução de insulina com suspeita de diabetes (ALI et al. 2016).

Embora 14 parâmetros dos 22 analisados na rotulagem estejam adequados as normas de vigilância, merece destaque a falta de atenção aos demais itens analisados não contemplados para o atendimento do consumidor (Tabela 5), sugerindo que os fabricantes procuram atender apenas as exigências de vigilância e do código de defesa do consumidor (BRASIL 2012). A informação nutricional referente aos suplementos importados pode não corresponder à realidade do produto ou que estes possuem ingredientes não informados na rotulagem disponível no Brasil (FREITAS et al. 2015; SILVA et al. 2016). Entre as amostras analisadas duas eram importadas (A e F) e os fabricantes seguiram apenas as instruções estabelecidas pela legislação, mas que, no entanto, itens como presença de cafeína deixam de ser informados por falta da mesma exigência.

Tabela 5. Percentual de conformidade dos parâmetros analisados da rotulagem das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI.

Percentual de marcas em conformidade por parâmetro analisado	Quantidade de parâmetros conformes (%)
100%	14 (64,0)
83,3 %	3 (14,0)
66,6 %	2 (9,0)
50,0 %	1 (4,0)
16,7 %	1 (4,0)
0,0 %	1 (4,0)
Total	22 (100,0)

Portanto, é necessário que os consumidores fiquem atentos às informações contidas nos rótulos, sendo capazes de identificar a omissão de informações importantes referentes ao consumo de suplementos (SILVA et al, 2017). Outro aspecto que deve ser ressaltado é que os nutricionistas antes de prescrever a suplementação de *whey* para atletas (ou não atletas) devem analisar rigorosamente a quantidade de proteína informada na rotulagem e solicitar previamente exames bioquímicos dos seus pacientes para avaliar a função hepática, pancreática e renal.

Também é fundamental que acompanhem periodicamente durante o todo o período de consumo as taxas metabólicas do sangue, glicemia, provas para insulina, função hepática e ultrassonografia de fígado.

Leite et al. (2015) analisaram rótulos dos suplementos proteicos e constataram inadequação para com a legislação brasileira vigente em 75% das amostras. Casagrande e Vicenzi (2016) também encontraram inadequações em 94,3% das rotulagens para suplementos com cafeína para atletas. Entretanto, Carvalho & Souza (2015) obtiveram 92,6% de conformidade das informações dos rótulos de suplementos de BCAA. Santos et al (2018) analisaram suplementos em geral e constataram que 60 % das amostras estavam em desacordo com a legislação. Pode-se observar que o rigor das informações de rotulagem varia muito conforme o tipo de suplemento analisado, provavelmente por não serem obrigadas a registrar o suplemento no Ministério da Saúde (BRASIL, 2015). Nesta pesquisa, nenhuma das marcas pesquisada informou a respeito de responsabilidade técnica, talvez por isso, ocorram tantas falhas de rotulagem.

A inclusão de substâncias bioativas tais como cafeína deveriam constar nos itens obrigatórios da rotulagem nutricional (BRASIL 2005a; BRASIL 2005b). O Código de Defesa do Consumidor no artigo 4º referente ao respeito à saúde e segurança no atendimento das necessidades dos consumidores, e no artigo 18º ressalta que os fornecedores de produtos respondem pelos vícios de qualidade que os torne impróprios ou inadequados ao consumo a que se destinam com a indicações constantes da rotulagem (BRASIL 2012). A cafeína em excesso ou em pessoas sensíveis pode causar insônia, náuseas e ansiedade (ALTERMANN et al. 2008) dentre a ativação do sistema nervoso central favorecendo elevação da frequência cardíaca, especialmente quanto a exposição precoce de adolescentes pelo fator de risco para desenvolver hipertensão pelo aumento persistente da resistência vascular (JAMES et al. 2018). Embora entre as informações suprimidas aparentemente irrelevantes para os fabricantes existem parâmetros na rotulagem, como a cafeína, que podem ser de extrema importância para a saúde do consumidor.

Após a análise de rotulagem realizada ficou evidente que deve haver maior rigor na elaboração das informações contidas nos rótulos dos suplementos proteicos e que deve ter ainda responsabilidade técnica. De um modo geral, os atletas procuraram informações sobre o consumo de suplementos com seus treinadores, visando melhorar a saúde, especialmente para praticar esportes individuais e se

engajar em treinamento por tempo prolongado (NABUCO et al.2016). Ressalta-se que este produto deve ser consumido por atletas sob a orientação rigorosa de nutricionistas após avaliação da integridade física e funcional deles. E que os educadores físicos, comerciantes, instrutores de academia (BEZERRA e MACEDO 2013), amigos, colegas de treino, familiares tenham consciência dos riscos para a saúde antes de recomendar a utilização indiscriminada dos suplementos proteicos para atletas.

Os rótulos relatam que eles têm elevadas concentrações de proteína, sugerindo que o consumo potencializa a hipertrofia muscular. É importante que as instruções de rotulagem sejam claras, objetivas e cumpram a legislação vigente, especialmente as que dizem respeito à forma de uso, restrições alimentares, presença de substâncias que possam alterar a composição original do produto e a necessidade de um profissional de nutrição.

5.2. Contagem de Micro-organismos

O resultado das análises microbiológicas das amostras de sachês de *whey protein* está apresentado na Tabela 6, as amostras da marca C apresentaram as maiores contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* (ECP) dentre as marcas pesquisadas ($P < 0,05$). Em experimento realizado com *whey protein* na Arábia, Saudita Aljaloud et al. (2013) encontraram 5,54 UFC/g em \log_{10} de ECP nas amostras, esta contaminação geralmente está associada aos manipuladores de alimentos, porém em leite e derivados pode ocorrer também em consequência da ordenha de vacas com mastite estafilocócica.

Tabela 6. Resultados médios das análises microbiológicas e da atividade de água nas amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI.

Marca de <i>whey</i>	ECP	CBH	CFL	Atividade de água
A	0,00 ^c ± 0,00	2,72 ^{a,b} ± 0,35	1,04 ^{a,b} ± 0,00	-
B	0,00 ^c ± 0,00	0,00 ^c ± 0,00	1,04 ^{a,b} ± 0,00	0,58
C	1,21 ^a ± 0,15	2,43 ^{a,b} ± 0,18	1,64 ^a ± 0,44	0,48
D	1,04 ^b ± 0,00	2,15 ^b ± 0,28	0,61 ^{a,b} ± 0,18	0,41
E	1,04 ^b ± 0,00	1,41 ^b ± 0,33	0,26 ^b ± 2,00	0,30
F	1,04 ^b ± 0,00	3,38 ^a ± 0,96	0,52 ^{a,b} ± 1,15	0,60
P	<0,001	<0,001	P = 0,040	

(P < 0,05) CBH = Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas por grama em logaritmo de base 10; ECP = Contagem de estafilococos coagulase positiva por grama em logaritmo de base 10; CFL = Contagem de Fungos filamentosos e leveduriformes por grama em logaritmo de base 10.

A legislação vigente não estabelece valores para ECP para suplementos alimentares, porém recomenda que os produtos devem atender às outras normas pertinentes quanto as características microbiológicas (BRASIL 2010). Dessa forma, podem ser utilizados por similaridade os parâmetros para ECP relativos ao leite em pó e ao soro de leite: destinado ao consumo máximo 2,00 UFC/g em log₁₀ (BRASIL 2001; BRASIL 2012) para comparação de resultados podendo-se perceber que os valores obtidos nas amostras de *whey protein* estão em conformidade visto que a maior quantidade encontrada foi 1,21 UFC/g em log₁₀ (tabela 6).

Ao avaliar a CBH pode-se verificar que houve diferença (P < 0,05) entre marcas pesquisadas (na Tabela 6) sendo as amostras das marcas A, C e F as que embora apresentem os maiores níveis de concentração, estavam em conformidade com o estabelecido pelo MAPA para leite em pó (BRASIL 1996) e para soro de leite (BRASIL 2012). Também pode-se observar que as CFL máximas obtidas nas amostras de *whey* analisadas foram 1,64 UFC/g em log₁₀ (tabela 6) e que houve diferenças entre marcas (P < 0,05). Embora as contagens de CBH e CFL não sejam indicadores seguros para informar sobre a presença de patógenos ou toxinas em um alimento (SILVA et al 2017), estes parâmetros servem como indicador da contaminação

bacteriana em geral referente as condições de qualidade, vida de prateleira, higiene no preparo e no processamento do produto.

A legislação vigente não estabelece valores de CBH para suplementos proteicos para atletas, entretanto, por similaridade, os valores máximos para CBH para soro de leite em pó 5,18 UFC/g em \log_{10} (BRASIL, 2012). Aljaloud et al. (2013) obtiveram contagens de CBH 6,20 UFC/g em \log_{10} em *whey protein*. Deste modo, os resultados apresentados sugerem que a quantidade de micro-organismos presentes no *whey* não impossibilita o consumo do mesmo, embora identifique-se variações nas contagens, os maiores valores obtidos são aceitáveis conforme padrões de higiene estabelecidos pelas normas de vigilância.

As contagens de fungos filamentosos e leveduras também servem como índice para determinação da qualidade, porém as legislações disponíveis para suplementos para atletas (BRASIL 2010), para leite em pó (BRASIL 1996) e para soro de leite (BRASIL 2012) não estabelecem parâmetros para esses micro-organismos. Os únicos alimentos que têm padrões microbiológicos disponíveis (BRASIL 2001) são: purês e doces em pasta ou massa e similares (máximo de 4,00 UFC/g em \log_{10}) e alimentos para imunossuprimidos e imunocomprometidos (1,70 UFC/g em \log_{10}). A ABIA (2001) estabelece para sopas desidratadas valores máximos de 3,0 UFC/g em \log_{10} . Deste modo, pode-se observar na Tabela 5 que os valores obtidos são relativamente baixos (1,64 UFC/g em \log_{10}) inclusive para imunossuprimidos. Essa quantidade obtida está dentro do esperado para produtos de origem animal, e provavelmente os fungos obtidos devem ser provenientes das demais matérias-primas utilizadas na formulação, presença de insetos e da contaminação do ambiente durante o processamento.

5.3 Isolamento e Identificação Fúngica

Embora tenha-se constatado a presença de fungos filamentosos em todas as marcas, ao analisar a atividade de água (a_w) das amostras de *whey* (Tabela 6) pode-se perceber valores incompatíveis com a multiplicação da maioria dos fungos filamentosos e de leveduriformes (a_w mínimo de 0,80 e de 0,88, respectivamente), sendo incompatíveis também com a multiplicação de fungos xerofílicos que necessitam de valores mínimos de 0,66 (JAY, 2005, SILVA et al 2017). Nas amostras analisadas, não foram encontrados fungos dos gêneros *Penicillium* nem *Fusarium* (Tabela 6), entretanto, o gênero *Aspergillus* estava presente três marcas pesquisadas.

Os fungos isolados são potencialmente produtores de aflatoxinas, substâncias hepatotóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas, constituindo-se um perigo potencial para o consumidor. Porém, as espécies isoladas de *Aspergillus* (Tabela 7 e Figura 5) necessitam no mínimo de 0,78 de aw (SAMSON; HOEKSTRA 2001) e não teriam condições de se multiplicar nem de produzir micotoxinas nas amostras de *whey protein*, entretanto, em embalagens caso haja um aumento na umidade após embalagens abertas e utilizadas por tempo prolongado, que ocorre comumente em embalagens em potes e sacos até 2.200kg, o *whey protein* torna-se um substrato para desenvolvimento destes fungos e produção dos seus metabólitos.

Tabela 7. Espécies de fungos filamentosos isolados e identificados nas amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI.

Marca	Espécies fúngicas isoladas nas amostras de <i>whey</i>		
	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
A	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-
B	<i>Aspergillus parasiticus</i> / <i>Aspergillus flavus</i>	-	-
C	-	-	-
D	<i>Aspergillus parasiticus</i> / <i>Aspergillus</i> agregados Niger	-	-
E	-	-	-
F	-	-	-

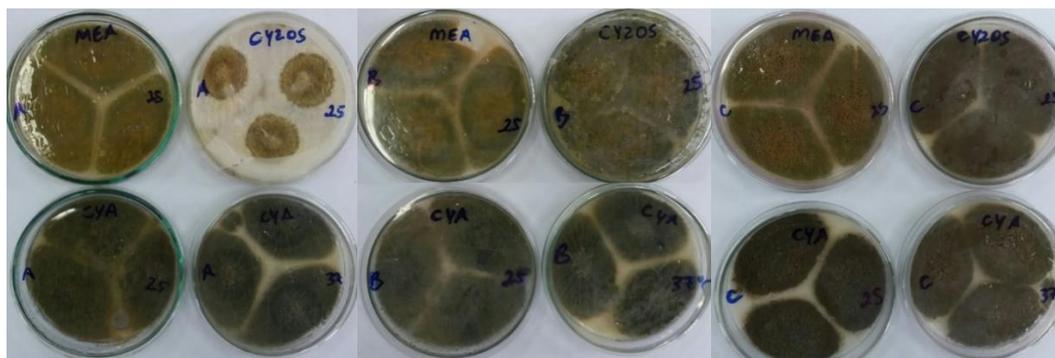


Figura 5. Espécies de *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus* isoladas nas amostras das marcas A, B e D das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI nos meios MEA, CYA 25, CYA 37 e CYA05.

De modo geral o conteúdo do sachê de *whey protein* após preparo é consumido imediatamente após a abertura embalagem, portanto é improvável que as espécies de *Aspergillus* isoladas nas amostras das marcas pesquisadas se multipliquem nesse intervalo de tempo. No entanto, deve-se atentar para as embalagens com maiores quantidades de *whey protein* disponíveis a venda, que após abertas para o primeiro consumo, passa um período prolongado de utilização (a depender da demanda) por vários eventos de abertura do “pote” ou “saco” até utilização total do conteúdo. Esses eventos de abertura repetida ou o não fechamento adequado da embalagem pode promover absorção da umidade do meio ambiente para o *whey protein* elevando a *aw* do produto, podendo propiciar a multiplicação dos fungos filamentosos e produção aflatoxinas.

5.4 Métodos de Microscopia

Os 141 fragmentos de sujidades capturados e identificados por embalagem individualizada de *whey protein* estão descritos na Tabela 8 e demonstrados na figura 6. Observa-se que as marcas A, D e F possuem maiores quantidades de sujidades em geral do que as demais, seguidas pelas marcas B e C, sendo a que apresentou menor registros foi a marca E. Foi possível identificar estruturas alheias aos componentes da *whey* como fragmentos e larva de artrópodes, fragmentos de fios plásticos, hifas, fragmentos de madeira e resíduos de fezes de insetos. A presença destas sujidades sugere descontrole nas boas práticas de fabricação especialmente

ao que se refere ao controle integrado de pragas. Deste modo, a contaminação dos produtos por essas sujidades pode ter ocorrido em qualquer etapa do processo de produção desde a obtenção da matéria prima até o envase. Também pode ser consequência da utilização de embalagens que não estivessem adequadamente armazenadas.

Tabela 8. Sujidades identificadas em 25g das amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI.

Sujidades identificadas	A	B	C	D	E	F	Total
Fragmento de insetos	15	8	5	8	4	10	50
Fezes de insetos	5	7	4	8	1	9	34
Ovos de insetos	--	--	--	1	--	--	1
Hifas	9	2	2	10	2	4	29
Fragmentos de fios de plástico	4	4	3	3	1	3	18
Fragmento de madeira	3	1	--	1	--	4	9
Total	36	22	14	31	8	30	141

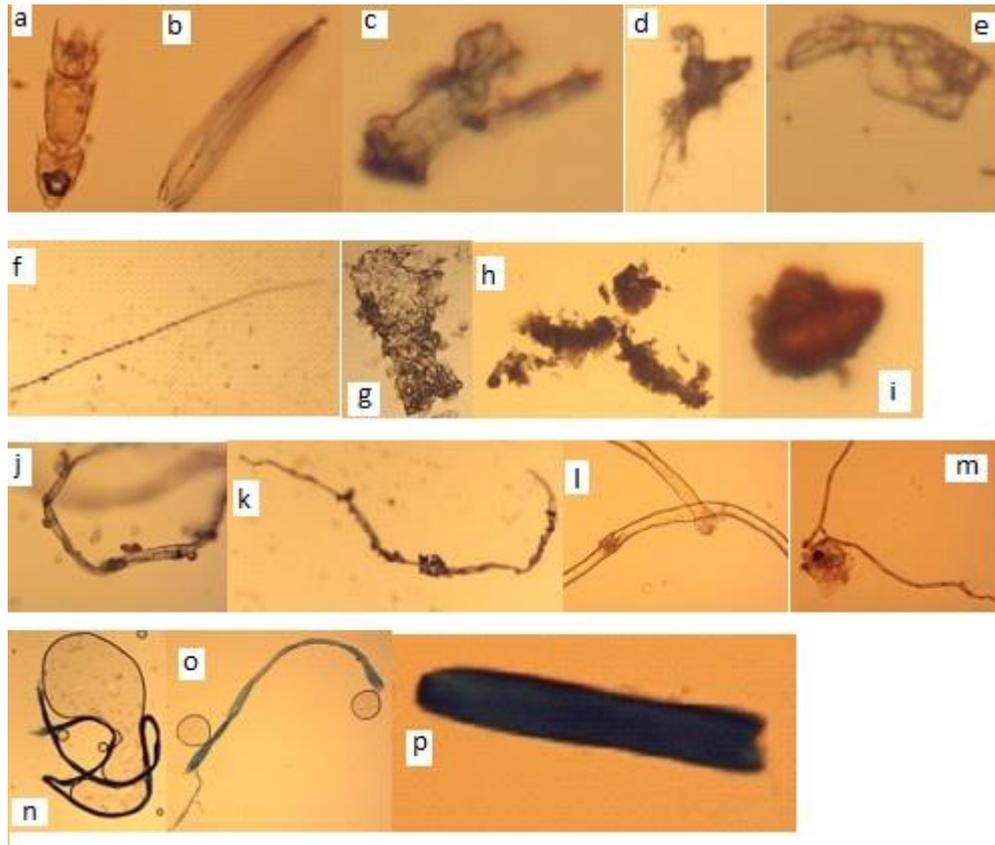


Figura 6. Imagens de sujidades identificadas em 25g das amostras de embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos da marca B para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI. A, B, C, D, E, F= Fragmento de insetos; G, H= Fezes de insetos; I=Ovos de insetos; J, K, L, M= Hifas; N, O= fios de plástico; P= fragmento de madeira. 40x

Devido ao fato de que artigos e legislações referentes a microscopia e pesquisa de sujidades para suplementos proteicos para atletas ser escassa, por similaridade foi necessário recorrer a outras normatizações. Nesse sentido, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite (BRASIL 2012) estabelece que o produto não deverá conter substâncias estranhas de qualquer natureza. Dessa forma, todas as marcas pesquisadas apresentaram fragmentos de insetos (partes de insetos, fezes e larva), (Tabela 8), em quantidades superiores ao aceitável, sendo as que apresentaram os maiores índices de sujidades foram as marcas A e F que continham 36 e 30 sujidades identificadas, respectivamente. Pelo exposto, as amostras de *whey protein* analisadas foram consideradas em desacordo com a legislação específica para soro do leite, por apresentarem matéria estranha indicativa de falhas das boas práticas de fabricação.

A RDC 14 (BRASIL, 2014) não estabelece especificamente parâmetros para alimentos de origem animal, porém considera impróprios para o consumo alimentos do grupo cacau e seus derivados com quantidades superiores a 12 unidades de fragmentos de insetos em 25g do produto, considerando que são indicativos de falhas das boas práticas (não considerados indicativos de risco). A marca E contém quantidade aceitável de sujidades (oito unidades para 25g) estando em conformidade com a RDC 14 (BRASIL, 2014) entretanto, a marca F que também declarava presença de cacau como ingrediente não estava em conformidade por apresentar 30 elementos estranhos (Tabela 8). Destaca-se que os insetos podem veicular doenças transmitidas por alimentos; por este motivo, sugere-se que as empresas responsáveis pelos produtos pesquisados aprimorem o controle integrado de pragas nas suas diversas etapas de produção, transporte, envasamento do produto.

Pode-se verificar ainda, a presença de hifas (Tabela 8) provavelmente provenientes dos fungos quantificados (Tabela 6) em todas as marcas, e das espécies de *Aspergillus* spp. isoladas nas marcas A, B e D (Tabela 7). Pode-se identificar fragmentos de fios de plástico em todas as amostras pesquisadas (100%), esta contaminação pode ser resultante dos resíduos de embalagens dos diferentes produtos utilizados como matéria-prima. Em quatro marcas (66,6%) havia fragmentos de madeira talvez pela utilização de material inadequado para o preparo do produto. Esses achados indicam que as marcas pesquisadas devem ter mais atenção junto as boas práticas de fabricação, provavelmente na escolha dos fornecedores, no controle do ambiente e do controle integrado de pragas.

5.5 Curva Analítica

Analisando os cromatogramas dos íons extraídos (Figura 7) dos padrões de aflatoxinas e de cafeína, pode-se observar que houve boa separação, permitindo a identificação de todos os analitos em uma única corrida cromatográfica. A curva analítica determinada para todos os padrões (Figura 8) apresentaram linearidade (R) superior a 0,99; atendendo aos padrões recomendados pelo BRASIL (2017) maior que 0,99. Estabelecendo as faixas de trabalhos para cafeína de 100 a 1.250 µg/kg e para todas as aflatoxinas de 10 a 100 µg/kg.

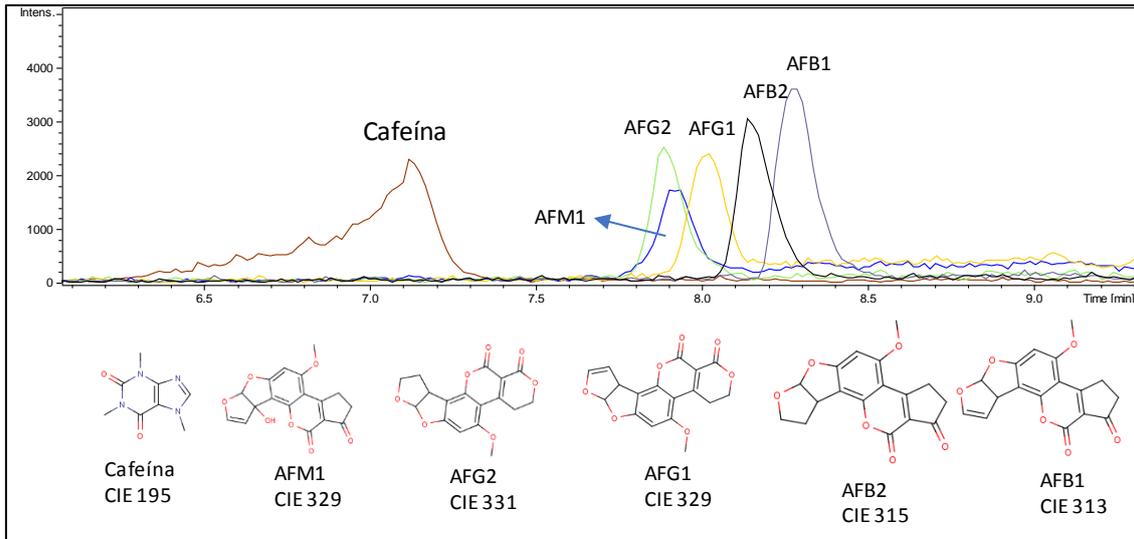


Figura 7: Cromatograma dos íons extraídos dos padrões para Cafeína e Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) por LCMS.

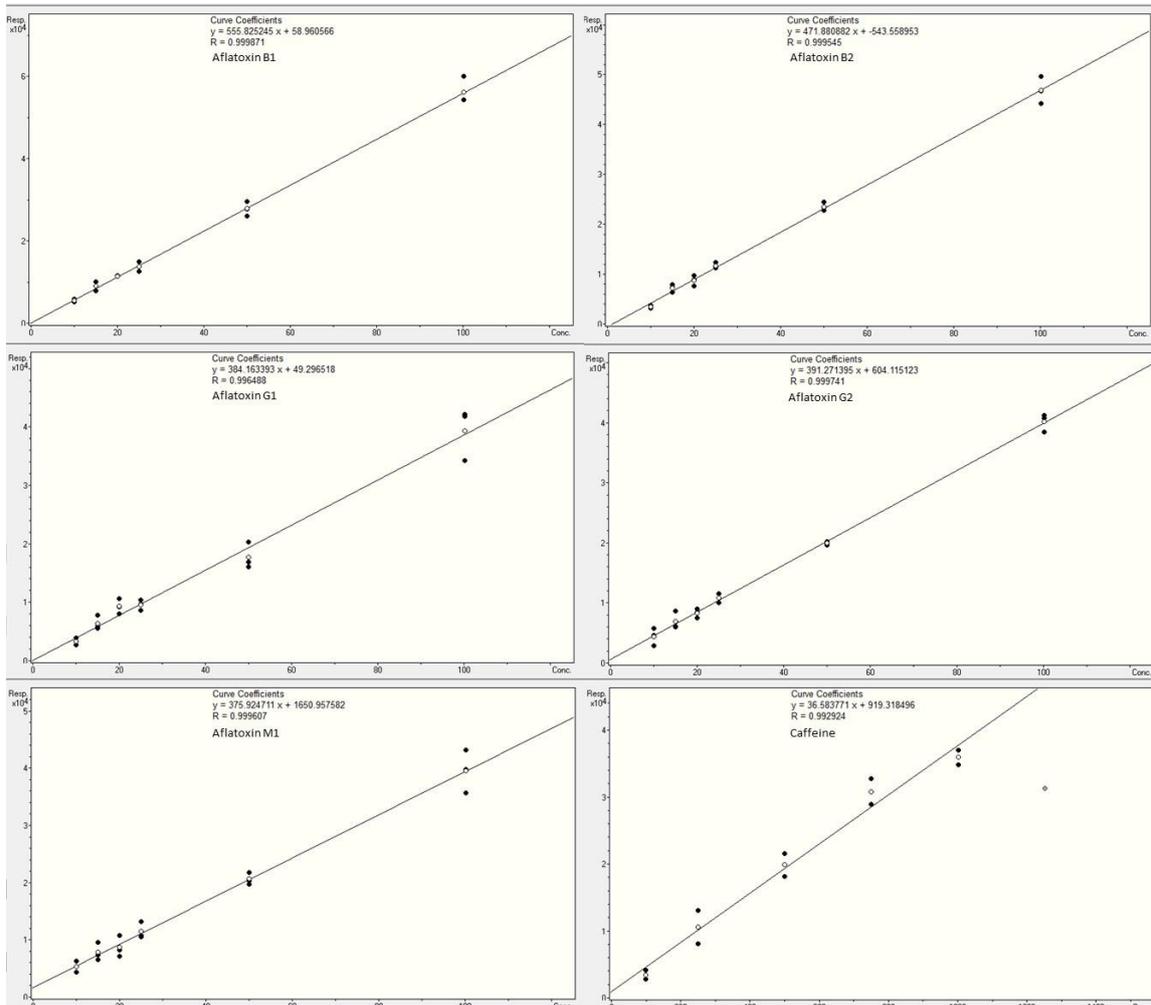


Figura 8: Curva de calibração para Cafeína e aflatoxina B1, B2, G1, G2, M1.

Para a avaliação da eficiência do método de extração foram realizados ensaios de recuperação em dois níveis, nas concentrações de 50 e 100 µg/kg para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 apresentando valores de recuperação variando de 13 a 103% (Tabela 9), indicando que as aflatoxinas B1 e B2 apresentaram maior afinidade pelo solvente extrator que as aflatoxinas G1 e G2.

Tabela 9. Resultado do ensaio de recuperação de aflatoxinas (%).

Nível de fortificação	Recuperação (%)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
100 µg/kg	80	103	17	17
50 µg/kg	70	94	29	13

As aflatoxinas podem causar micotoxicoses com efeitos agudos (letais ou não) como convulsões, subagudos e crônicos (TROMETTA, 2014). Esses efeitos podem ser hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, genotóxicos, levando muitas vezes, o paciente a óbito (GONÇALVES et al, 2017). Das 24 embalagens analisadas, duas (8,3%) de marcas diferentes (B e D) apresentavam aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) (Tabela 10), entretanto, não continham AFM1, caracterizando que as toxinas encontradas não eram provenientes do leite utilizado para formulação dos *wheys*. Provavelmente podem ser provenientes das espécies fúngicas isoladas (Tabelas 6,7 e Figura 5) nas amostras, ou ainda pelas hifas identificadas nas sujidades identificadas (Tabela 8). A legislação vigente não dispõe de parâmetros para aflatoxinas em suplementos proteicos para atletas, porém estabelece como limite máximo tolerável para alimentos 20 µg/kg (BRASIL 2011).

Adilah et al. (2018) estudaram em ratos o efeito de dieta hiperproteica associada com lactobacilos e aflatoxina B1 em concentrações pouco acima do tolerável e evidenciaram que, os probióticos minimizam os efeitos carcinogênicos do intestino delgado e do colón, entretanto não alteram as características de inflamação hepática nem esplênica que a aflatoxina pode causar. Destaca-se que em 25g por de amostra, foi obtido aproximadamente quatrocentas vezes a quantidade máxima aceitável para um quilo de alimento (BRASIL 2011). Considerando-se que os resultados obtidos eram referentes ao conteúdo parcial das embalagens individuais ou sachês, a quantidade de aflatoxina encontrada nas amostras das marcas B e D (Tabela 10) seria integralmente ingerida pelos consumidores.

Tabela 10: Nível de contaminação de cafeína e de aflatoxinas M1, B1, B2, G1, G2 das amostras das embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI resultados expressos em µg por porção de 25 g.

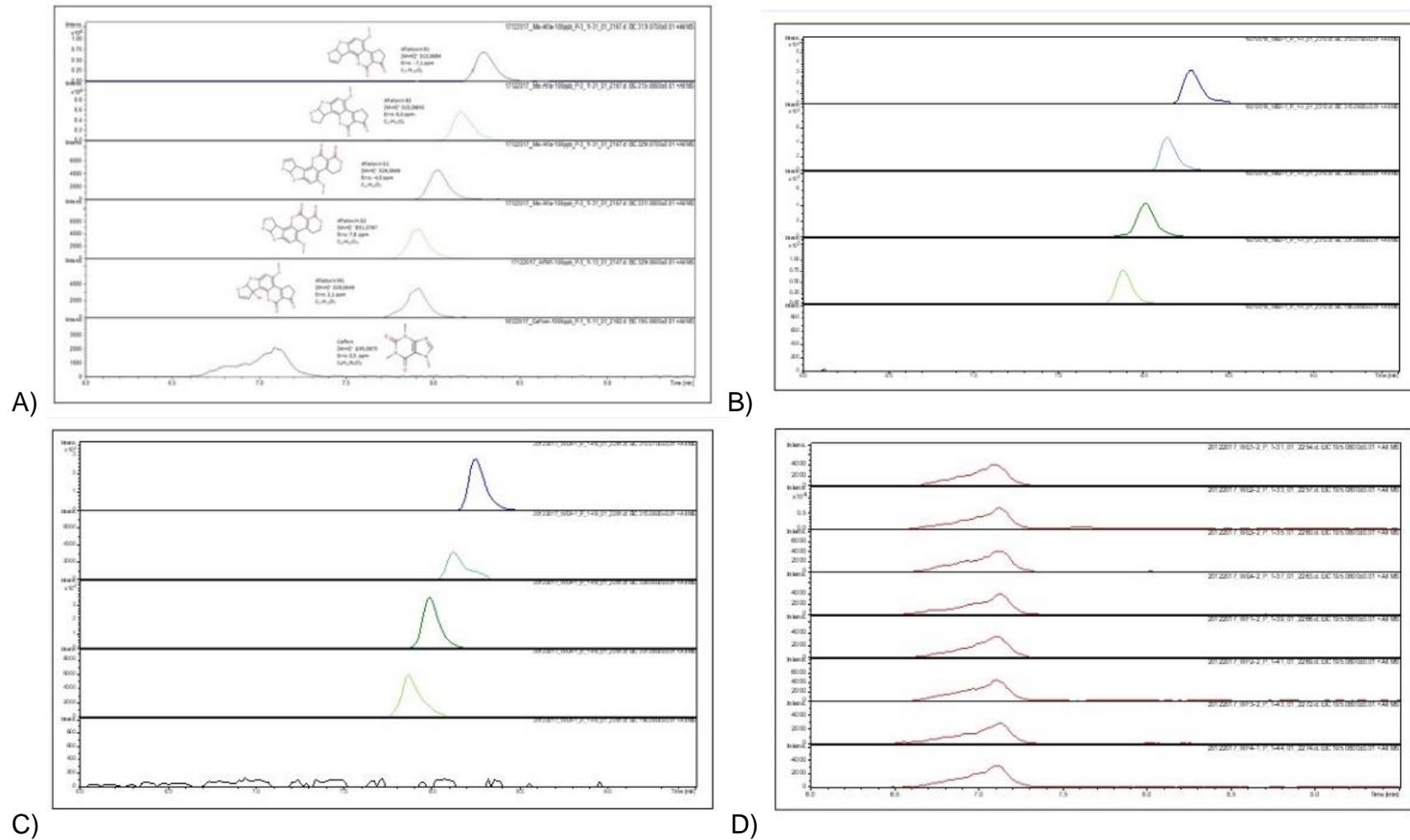
Amostra	Concentração µg/25g					
	Cafeína	AFM1	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
A1	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
A2	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
A3	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
A4	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
B1	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
B2	nd	nd	66,3	97,5	87,2	177,6
B3	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
B4	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
C1	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
C2	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
C3	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
C4	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
D1	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
D2	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
D3	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
D4	nd	nd	42,8	5,5	76,1	14,0
E1	655,8	nd	nd	nd	nd	Nd
E2	851,8	nd	nd	nd	nd	Nd
E3	513,8	nd	nd	nd	nd	Nd
E4	482,6	nd	nd	nd	nd	Nd
F1	411,4	nd	nd	nd	nd	Nd
F2	408,8	nd	nd	nd	nd	Nd
F3	329,0	nd	nd	nd	nd	Nd
F4	408,2	nd	nd	nd	nd	Nd

nd= não detectável; **AFM1**; **AFB1**; **AFB2**; **AFG1**; **AFG2** = aflatoxina M1; aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1, aflatoxina G2.

A lista de ingredientes da marca B continha amido de milho ceroso que pode ser uma fonte das aflatoxinas, já a marca D não declara utilizar ingredientes vegetais na sua composição. Embora essas marcas não apresentassem contagens fúngicas elevadas (Tabela 6), as aflatoxinas extraídas das amostras podem ter ocorrido pela presença de hifas encontradas (Tabelas 8; Figura 6), provavelmente pela contaminação ocorrida durante o processamento industrial antes do envase. Esses resultados são preocupantes especialmente porque todo o conteúdo do sachê é consumido imediatamente após hidratação. Ou seja, a ingestão da *whey protein* diária

antes e depois do treino desses sachês contaminados com aflatoxinas em quantidades acima do remendado pela legislação, a longo prazo pode causar desde de micotoxicoses agudas até consequências crônicas como carcinoma.

Nas sementes de cacau podem ser encontradas as seguintes metilxantinas (PAOLLETE et al, 2012): teobromina (0,9 a 1,4g por 100g) e cafeína (0,2g a 1,3g de por 100g). A cafeína estimula o Sistema Nervoso Central, diminui a fadiga, aumenta o estado de alerta; estimula a broncodilatação e induz o aumento da respiração; entretanto, em doses elevadas pode causar palpitações, convulsões, dor de cabeça e estômago, insônia, perda de apetite, náusea, vômito, depressão, falta de potência, (BORTOLINI et al 2010). As marcas pesquisadas de *whey* sabor chocolate (E e F) continham níveis de cafeína compatíveis com esperado para este alimento (Tabela 10 e Figura 9). Entretanto, esse componente não estava declarado na rotulagem das marcas com sabor chocolate, podendo causar efeitos indesejáveis em; indivíduos sensíveis, tais como taquicardia por aumento da frequência cardíaca.



C) D)

Figura 9. Cromatograma dos íons extraídos aflatoxina e cafeína do padrão injetado (A), comparados ao de aflatoxinas das amostras B2 (B) e D4 (C) e de cafeína nas amostras E1, E2, E3, E4, F1, F2, F3 e F4 (D) obtidos nas embalagens individualizadas ou sachês dos suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializadas em Teresina, PI resultados expressos em μg por porção de 25 g.

Pode-se constatar a presença de diferentes contaminantes nos sachês de *whey protein*, como: fragmentos, ovos e fezes de insetos, fragmentos de plásticos e madeira, cafeína, fungos e hifas destes. Com exceção das hifas estas sujidades não representem perigo potencial à saúde do consumidor, porém não poderiam estar presentes no *whey protein*. Convém alertar para os cuidados com as boas práticas de fabricação no sentido de melhorar a qualidade do *whey* para o consumidor.

As quantidades dos micro-organismos índices higiene pesquisados eram consideradas aceitáveis pelos órgãos reguladores. E os valores de *aw* da *whey protein* nos sachês seria incompatível com a multiplicação das bactérias e dos fungos filamentosos e leveduriformes, e com a produção de aflatoxinas. Desta forma as aflatoxinas encontradas no *whey* devem ter sido produzidas antes do envasamento, durante as etapas de produção, ou estavam presentes nas hifas de *Aspergillus parasiticus* isoladas das mesmas amostras do produto.

Nas embalagens individuais ou sachês com até 40g podem conter hifas e fungos, deste modo, pode-se deduzir que essa contaminação também possa ocorrer em embalagem com maiores quantidades (potes e 'sacos' com 2,0 kg ou mais). Assim, estima-se que nas residências o consumo completo do conteúdo de *whey* dessas embalagens seja prolongado. Caso haja elevação dos níveis de atividade de água (*aw*) decorrentes: do aumento da umidade relativa do ambiente aumente, do tempo de exposição da embalagem aberta para preparo das porções e da quantidade de vezes que o pote ou saco seja aberta, os fungos presentes poderiam se multiplicar e produzir micotoxinas.

Outro ponto que deve ser ressaltado é que deve haver maior controle toxicológico quanto a presença de cafeína e aflatoxinas, para que sejam prevenidas possíveis taquicardias, hipertensão, micotoxicoses agudas e crônicas pelo consumo do *whey*. Além disso, as rotulagens não informam o tipo de *whey* relativo as concentração e estrutura das proteínas disponíveis como também não apresentam o responsável técnico nem informam sobre as restrições quanto ao consumo em excesso de proteínas, necessidade de orientação de nutricionista.

6. CONCLUSÕES

A análise de embalagens individualizadas ou sachês de suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) disponíveis para comercialização permitiu concluir que os rótulos omitem informações importantes, como: a presença de substâncias estimulantes do sistema nervoso, como a cafeína nas marcas estudadas sabor chocolate e ainda de alérgenos, como ovos e peixes.

Além disso, não apresentam o responsável técnico nem informam sobre as restrições quanto ao consumo em excesso de proteínas, necessidade de orientação de nutricionista. Também não informam o tipo de *whey* relativo as concentração e estrutura das proteínas disponíveis.

Bactérias heterotróficas mesófilas; fungos filamentosos e leveduras e *Staphylococcus coagulase positiva* estão presentes em embalagens individualizadas ou sachês suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) em quantidades permitidas para o consumo diário.

Embora fungos dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* não tenham sido isolados, as embalagens individualizadas de suplementos proteicos para atletas podem conter *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus agregados niger*.

A atividade de água do *whey protein* não favorece a multiplicação de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger* e os demais microorganismos presentes na embalagem individualizada.

As marcas de suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) disponíveis em embalagens individualizadas ou sachês estão em desacordo por possuírem as seguintes matérias estranhas indicativas de falhas das Boas Práticas: fragmentos e fezes de insetos, hifas e fios de plástico, ovos de insetos e fragmentos de madeira.

Os suplementos proteicos para atletas (*whey protein*) comercializados nas embalagens individualizadas ou sachês sabor chocolate nas marcas pesquisadas, contem cafeína dentro do esperado para esse tipo de alimento.

Consumidores de *whey protein* comercializados em embalagem individualizada ou sachês estão expostos quantidades de aflatoxinas que os tornam susceptíveis a micotoxicoses, efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos.

Partindo-se do que foi relatado os nutricionistas não devem considerar apenas o elevado teor de proteínas ao prescrever suplementos proteicos para atletas, pois o mesmo contém elementos alheios a sua composição que indicam baixa condição higiênico sanitária.

REFERÊNCIAS

- ABIA. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. *Compêndio da Legislação de Alimentos, Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos*. 8 rev. São Paulo:ABIA, 2001. v. 1
- ADILAH, Z. N.; LIEW, W.-P. P. S.; REDZWAN, M.; AMIN, I. Effect of High Protein Diet and Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota Supplementation in Aflatoxin B1-Induced Rats. *BioMed Research International*, v. 2018, 10p. 2018, Article ID 9568351, <https://doi.org/10.1155/2018/9568351>
- ALI, D. A.; EL-SAYYAD, H. I. H.; MOFTAH O. A.; CHILIBECK, P. D. Structural and functional abnormalities of hepatic tissues in male Wistar rats fed hyperwhey and super amino anabolic protein. *Nutrition*, v. 32, p. 840–848., 2016
- ALJALOOD, S. O.; IBRAHIM, S. A.; FRASER, A. M; SONG, T.; SHAHBAZI, A. Microbiological quality and safety of dietary supplements sold in Saudi Arabia. *Emir. J. Food Agric*. v. 25, n.8, p. 593-596, 2013.
- ALMEIDA, C. C.; JÚNIOR, C. A. C.; OLIVEIRA, A. C. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, jul./ago., 2006.
- ALTERMANN, A. M.; DIAS, C. S.; LUIZ, M. V.; NAVARRO, F. A influência da cafeína como recurso ergogênico no exercício físico: sua ação e efeitos colaterais. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva* v. 2, n. 10, p. 225-239, 2008
- ALVES, V. C. Aspectos micológicos e micotoxicológicos de pães tipo *hot-dog* influenciados pela qualidade da farinha de trigo. Dissertação de Mestrado do Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, 2014. 59 p.
- ANDRADE, L. A; BRAZ, V. G.; NUNES, A. P. O.; VELUTTO, J. N.; MENDES, R. R. Consumo de suplementos alimentares por pacientes de uma clínica de nutrição esportiva de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 20, n. 3, p. 27-36, 2012.
- BALCIUNAS, E. M. *Produção de bacteriocina por Bifidobacterium lactis a partir de soro de leite*. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BEZERRA, C. C.; MACÊDO, E. M. C. Consumo de suplementos a base de proteína e o conhecimento sobre alimentos proteicos por praticantes de musculação. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*.; n. 7, v.40, p. 224-232. 2013
- BORGES, G. M.; Lazzari, F.; Eberle, L.; Milan, G. S. O efeito país de origem e sua influência na percepção dos consumidores de *whey protein*: um estudo experimental. *REAd. Revista Eletrônica de Administração* (Porto Alegre), n. 23, v. .2, p. 1-30, 2017
- BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria Nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. 1996

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2001; 10 jan.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. [acesso 2018 jun 15]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0359_23_12_2003.pdf/76676765-a107-40d9-bb34-5f05ae897bf3

BRASIL. Anvisa Agência Nacional de Vigilância Sanitária Rotulagem Nutricional Obrigatória Manual de Orientação às Indústrias de Alimentos. 2ed.– Universidade de Brasília – Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Universidade de Brasília, 2005 a. 44p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação aos consumidores Alimentos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Universidade de Brasília – Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Universidade de Brasília, 2005 b. 17p.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC Nº 163, de 17 de agosto de 2006. Documento sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. [acesso 2018 jun 15]. Disponível em: <http://crn3.org.br/Areas/Admin/Content/upload/file-0711201565805.pdf>

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 18, DE 27 DE ABRIL DE 2010, aprova o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas Brasília DF, 2010

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 07/2011. Determina limites para presença de micotoxinas em alimentos. Brasília: DF, 2011.

Brasil. Instituto Nacional de Metrologia INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008. 4 ed. Divisão de Acreditação de Laboratórios (DICLA), 2011. 19p. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidog/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf
Acesso em: 12/06/18.

BRASIL. Ministério da Agricultura Instrução Normativa nº-62, de 29 de dezembro de 2011: Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 Dez 2011. Sec 1. p. 6 -11.

BRASIL. Senado Federal. Código de Proteção e Defesa do Consumidor E Legislação Correlata. 5 ed. Brasília: Senado Federal, Subsecretaria de Edições Técnicas, 2012.

106 p. [acesso 2018 jun 15]. Disponível em <https://www2.senado.leg.br/bdsf/bitstream/handle/id/496457/000970346.pdf>

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 54, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2012, que aprova o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar Brasília DF, 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0054_12_11_2012.html. acesso 2018 jun 15]

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Projeto de Instrução Normativa Nº, 2012. Padrões de identidade e qualidade de soro de leite. Brasília: DF, 2012. Disponível em: <https://www.alimentosonline.com.br/arquivos/1166/cp.pdf> acesso: 25 jun 2018

BRASIL, Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Brasília, DF 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares (Publicado em DOU nº 125, de 3 de julho de 2015/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Universidade de Brasília – Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Universidade de Brasília, 2015. 17p.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Publicada no DOU nº141, de 25 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Universidade de Brasília – Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Universidade de Brasília, 2017. 21p.

CARRILHO, L. H. Benefícios da utilização da proteína do soro de leite Whey Protein. *RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 7, n. 40, 2013.

CARVALHO, B. G.; Souza, E. B. Análise de rótulos de BCAA comercializados no município de Volta Redonda-RJ. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo. v. 9, n. 49, p. 25-29. Jan/Fev, 2015. ISSN 1981-9927.

CASAGRANDA, M.; VICENZI, K. Adequação da rotulagem de suplementos de cafeína para atletas em relação à legislação brasileira. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo. v. 10. n. 60. p.666-672. Nov./Dez. 2016. ISSN 1981-9927

CASAS, J.; RODRIGUES, C. I. S.; D'AVILA, R. Educação nutricional para pacientes renais crônicos em programa de hemodiálise. *Nutrire*, v. 40, n. 1, p. 36-44, abril, 2015.

ESPÍNOLA, H. H. F., COSTA, M. R. A. C., NAVARRO, F. Consumo de suplementos por usuários de academias de ginástica da cidade de João Pessoa – PB. *RevBras de Nutr Esportiva*, n. 1, v. 7, p. 01-10, 2008

FISCHBORN, S. C. A influência do tempo de ingestão da suplementação de *Whey Protein* em relação à atividade física. *RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 3, n. 14, 2012.

FLORÊNCIO, I. M.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H.; MARTINS; R. S.; CAVALCANTI, M. T.; GOMES, J. P. Produção de etanol a partir de lactossoro industrial. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, n. 10, p. 1088-1092, 2013.

FREITAS, A.; EVANGELISTA, A. L.; LOPES; C. R.; SILVA; A. K. S.; LIMA, A. V.; FREITAS, E. S. F.; MOTTA G. R.. Uso de suplementos ergogênicos em praticantes de atividades esportivas na cidade de Teresina-PI. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 7, n. 40, p. 6, 2013.

FREITAS, H. R.; BIZARELLO, T. B.; ROMANO, U. S.; SANTANA, P. G. B. S.; HAUBRICH, R., CASTRO, I. P. L. Avaliação da rotulagem e informação nutricional de suplementos proteicos importados no Brasil, *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo. v. 9, n. 49, p.14-24, Jan/Fev, 2015. ISSN 1981-9927.

GOMES, G. S; DEGIOVANNI, G. C; GARLIPP, M.R.; CHIARELLO, P. G.; JORDÃO JR, A. A. Caracterização do consumo de suplementos nutricionais em praticantes de atividade física em academia. *Rev Med (Ribeirão Preto)*, n. 41, v.3, p. 327-331, 2008

GONÇALVES, B.; SANTANA, L.; PELEGRINI, P. Micotoxinas: uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. *Revista de Saúde da FACIPLAC*, v.4, n.1, p.1-12 jan/jul, 2017

HALLAK A, FRABRINI S, PELUZIO M. C. G. Avaliação do consumo de suplementos nutricionais em academias da Zona Sul de Belo Horizonte, MG, Brasil. *Rev Bras de Nutr Esportiva*, n. 1, v. 2, p. 55-60, 2007.

HERNANDEZ, A. J.; NAHAS, R. M. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Rev Bras Med Esporte* v. 15, n. 3, mai-jun, 2009.

HIRSCHBRUCH MD, FISBERG M, MOCHIZUKI L. Consumo de Suplementos por Jovens Frequentadores de Academias de Ginástica em São Paulo. *Rev Bras Med Esporte*, n. 14, v. 6, p.539-543, 2008.

HOFFMAN, J. R.; FALVO, M. J. Protein—which is best?. *Journal of sports science & medicine*, v. 3, n. 3, p. 118, 2004.

ICH. International Conference on Harmonization. *Validation of analytical procedures: methodology*. London, 1996. 9 p. (ICH Harmonized Tripartite Guideline CPMP/ICH/281/95).

INDUSTRIATIVIDADE, *Faturamento da indústria de suplementos alimentares cresce 10%*, 2017. Disponível em <http://industriatividade.com.br/faturamento-da-industria-de-suplementos-alimentares-cresce-10/> acesso em 23 mar 2018

JÄGER, R. KERKSICK, C. M.; CAMPBELL, B. I.; CRIBB, P. J.; WELLS, S. D.; SKWIAT, T. M.; PURPURA, M.; ZIEGENFUSS, T. N.; FERRANDO, A. A.; ARENT, S. M.; SMITH-RYAN, .A. E.; STOUT, J. R.; ARCIERO, P. J.; ORMSBEE, M. J.; TAYLOR, L. W.; WILBORN, C. D.; KALMAN, D. S.; KREIDER, R. B.; WILLOUGHBY, D. S.; HOFFMAN, J. R.; KRZYKOWSKI, J. L.; ANTONIO, J. International society of sports nutrition position stand: protein and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, v. 14, n. 1, p. 20, 2017.

JAMES, J. E.; BALDURSDOTTIR, B.; JOHANNSDOTTIR, K. R.; VALDIMARSDOTTIR, H. B; SIGFUSDOTTIR, I. D. Adolescent habitual caffeine consumption and hemodynamic reactivity during rest, psychosocial stress, and recovery. *Journal of Psychosomatic Research*, p. 16–23, 2018.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 771p.
JOVANOVIĆ, Snežana; BARAĆ, Mirosljub; MAĆEJ, Ognjen. Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, v. 55, n. 3, p. 215-233, 2005.

KELLER, L. A. M. *Avaliação micológica e micotoxicológica de silagens destinadas à alimentação de bovinos de fazendas no estado de São Paulo e Rio de Janeiro*. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

KING, A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran – Rose bengal medium for enumeration and isolation of fungi from foods. *Applied Environmental Microbiology*. v. 37, n. 5, p. 959-964, 1979.

KLICH, M. A. *Identification of Common Aspergillus Species*. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 122 p

LEITE, V. C. C.; SOUZA, E. B.; NEVES, A. S.; SARON, M. L. G.; MALLETT, A. C. T., C. F. Análise dos rótulos de suplementos proteicos para atletas, segundos as normas brasileiras em vigência. *CADERNOS UniFOA*, v. 28, p. 69-74, agosto, 2015

LINHARES, F. R.; DIAS, J. O.; ALMEIDA, M. C. Cadeia Produtiva Suplementos de Proteína: Um estudo de caso. *XXXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Salvador. Anais, Salvador: Abepro*, 2013.

LUZ, G. B. Processo de extração das proteínas de soro de leite para produção de concentrado proteico. *Revista E-Tech: Tecnologias para Competitividade Industrial*, v. 9, n. 2, p. 137-150, 2016. ISSN-1983-1838

MARQUARDT, L.; ROHLFES, A. L. B.; BACCAR, N. M. M.; OLIVEIRA, S. R.; RICHARDS, N. S. P. S. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. *Tecno-Lógica*, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2012.

MENON, D.; SANTOS, J. S. Consumo de proteína por praticantes de musculação que objetivam hipertrofia muscular. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 18, n. 1, p. 8-12, 2012.

MIURA, J. F. N. *Whey Protein: nacional ou importado? Uma análise do comportamento do consumidor*; 2014; Monografia; (Aperfeiçoamento/Especialização em MBA em *Marketing*) - Universidade Católica de Brasília; Brasília. 36 p. 2014.

NABUCO, H. C. G.; RODRIGUES, V. B.; RAVAGNANI, C. F. C. Fatores associados ao uso de suplementos alimentares entre atletas: revisão sistemática. *Rev Bras Med Esporte*, vol. 22, n. 5, p. 412-419, Set/Out, 2016.

NAHAS, M. V.; GARCIA, L. M. T. Um pouco de história, desenvolvimentos recentes e perspectivas para a pesquisa em atividade física e saúde no Brasil. *Rev. bras. Educ. Fís. Esporte*, São Paulo, v.24, n.1, p.135-48, jan./mar, 2010.

NELSON, P. E.; TOUSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Pennsylvania, University Press, 1983. 193p

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E.C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: um subproduto valioso. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 67, n. 385, p. 64-71, 2012.

PAOLETTI, R., POLI, A., CONTI, A.; VISIOLI, F. Chocolate and Health. *Italy, Springer*, v. 153, p. 1-128, 2012.

PITT, J. I *Guía de laboratorio para la identificación de especies comunes de Penicillium*. New York: Springer, 2004

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*, 3. ed. New York: Springer. 2009.

PRADO, M. S. *Elaboração de um refrigerante sabor laranja com adição de isolado proteico de soro de leite*. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

ROHLFES, A. L. B.; BACCAR, N. M.; OLIVEIRA, M. S. R.; MARQUARDT, L.; WEIS, L.; LOPES, L.; BLEY, D. E.; HOCHSCHEID, S. L. Aproveitamento de subproduto de agroindústrias do setor queijeiro para desenvolvimento de produtos alimentícios e redução de impacto ambiental. *Tecno-Lógica*, v. 18, n. 1, p. 13-18, 2014.

SAMSON, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C. *Introduction to food and airborne fungi*. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 2000. 388 p.

SANTOS, G. M.; SOUSA, P. V. L., OLIVEIRA, J. M. S.; SALDANHA, N. M. V. P., NEIVA, R. C., BARROS, N. V. A. Análise da rotulagem de suplementos proteicos comercializados na cidade de Teresina-PI. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo. v. 12. n. 70. p.255-261. Mar./Abr. 2018. ISSN 1981-9927.

SANTOS, M.V.; Composição e características do leite. In: *Qualidade do Leite e Manejo de Ordenha: conceitos atualizados*. São Paulo: Rede Agripoint, 2012, Módulo 1, p.01-11.

- SHNEIDER C, MACHADO C, LASKA SM, LIBERALI R. Consumo de Suplementos Nutricionais por Praticantes de Exercício Físico em Academias de Musculação de Balneário Camboriú –SC. *Rev Bras de Nutr Esportiva*, v. 2, n. 11, p.307-322, 2008.
- SILVA, F. S.; LUPKI, F. B.; MORAIS, H. A. Avaliação da rotulagem nutricional de suplementos energéticos comercializados em Diamantina, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo. v. 11. n. 64. p.400-409. Jul./Ago. 2017. ISSN 1981-9927
- SILVA, L. V.; SOUZA, S. V. C. Qualidade de suplementos proteicos: avaliação da composição e rotulagem. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 75, p 1703, 2016
- SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R; OKAZAKI, M.M. *Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos e água*. 5 ed. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p.
- SILVA, T. T. *Análise microbiológica e físico-química do leite cru comercializado sem inspeção no município de Candeias – MG*. 2017. 29 f. Monografia (Bacharel Medicina Veterinária), Centro Universitário de Formiga, Formiga, 2017.
- TEIXEIRA, A.S.; FREITAS-SILVA, O.; GODÓY, R.L.O.; VARGAS, E.A.; MARTINS, A. Análise e quantificação de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de castanha-do-Brasil. *Revista Ciência da Vida*, Seropédica, v.28, p.22-24, 2008.
- TERADA, L. C.; GODOI, M. R.; SILVA, T. C. V.; MONTEIRO, T. L. Efeitos metabólicos da suplementação do Whey Protein em praticantes de exercícios com pesos. *RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 3, n. 16, 2012.
- TROMBETA, F. Efeito da administração oral de aflatoxina B1 nas convulsões induzidas em ratos. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2014. 73 p.
- TUNICK, M. H. *Whey protein production and utilization: a brief history*. In: Onwulata, C.I.; HUTH, P. J. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists: Iowa, USA, 2008. Pág 1-13
- VILLELA, M R . L. *Pesquisa de sujidades em farinha de trigo e seus derivados entre 1987 e 2002; a importância do Controle da Qualidade na higiene e segurança alimentar, sua influência na Legislação Sanitária e promoção da Saúde*. (Dissertação de mestrado) Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2004. 114 p.
- WOLFE, R. R.; CIFELLI, A. M.; KOSTAS, G.; KIM, IL-YOUNG. Optimizing Protein Intake in Adults: Interpretation and Application of the Recommended Dietary Allowance Compared with the Acceptable Macronutrient Distribution Range. *American Society for Nutrition. Adv Nutr*. v. 8 p. 266–75, doi:10.3945/an.116.013821, 2017.
- ZAMBÃO, J. E.; ROCCO, C. S.; VON DER HEYDE, M. E. D.. Relação entre a suplementação de proteína do soro do leite e hipertrofia muscular: uma revisão. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 9, n. 50, p. 179-192, 2015.