

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CAROLINE CRISITINE AUGUSTO

ESTUDO E ANÁLISE CONSTITUCIONAL DO SUPLEMENTO ALIMENTAR *WHEY*  
*PROTEIN* CONCENTRADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

RIO DE JANEIRO – RJ

CAROLINE CRISTINE AUGUSTO

ESTUDO E ANÁLISE CONSTITUCIONAL DO SUPLEMENTO ALIMENTAR *WHEY*  
*PROTEIN* CONCENTRADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus cidade universitária.

Orientadores: Prof.<sup>a</sup>.Dr.<sup>a</sup> .Iracema Takase  
Prof.<sup>a</sup>.Dr.<sup>a</sup> Márcia Nogueira da Silva de la Cruz  
Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres

RIO DE JANEIRO - RJ

2019

Dedico este trabalho aos meus pais e amigos, que foram importantes em minha vida para que pudesse chegar até esta etapa.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por ter dado força e perseverança para a conclusão deste trabalho e graduação. A minha família, pela oportunidade que proporcionaram e por toda a paciência, compreensão e apoio financeiro. .

A Universidade Federal do Rio de Janeiro pela estrutura oferecida, especialmente ao Instituto de Química, local que realizei a minha graduação e este trabalho, local também que foi minha casa por seis anos.

Obrigada aos professores Roberto Salgado Amado, Marciela Scarpallini, Paula Fernandes de Aguiar, Fernanda Veronesi Marinho Pontes e Vinicius Figueiredo Sardela por todo cuidado e conhecimentos transmitidos ao longo da vida acadêmica além de conselhos profissionais e pessoais, em especial aos meus orientadores os Professores Dr<sup>a</sup> Iracema Takase, Dr<sup>a</sup> Márcia Nogueira da Silva de la Cruz e o Dr<sup>o</sup> Alexandre Guedes Torres, pelo incentivo e apoio constantes. .

Agradeço a Professora Dr<sup>a</sup> Ellen Cristina Quirino Lacerda por todas as horas compartilhadas em laboratórios durante os ensaios de bromatologia, ao Laboratório de Bioquímica, Nutricional de Alimentos (LBNA) por me devolverem o encanto de trabalhar com pesquisas e aos meus amigos que sempre estiveram presente apoiando e dividindo as minhas alegrias e tristezas em especial a Rebecca Rodrigues Mattos, Débora Ávila Santos, Ana Beatriz Brito, Carolina Lázaro, Ariana Santos, Daniella Santos, Jaqueline Souza e Patrícia Arras Bertozzi.

Um agradecimento especial para as Professoras Dr<sup>a</sup> Fernanda Veronesi Marinho Pontes e Dr<sup>a</sup> Marlice Aparecida Sipoli Marques por aceitarem ser a minha banca avaliadora e sugerir melhorias para este trabalho.

“ É impossível viver sem falhar em alguma coisa, a não ser que viva tão cautelosamente que talvez nem tenha vivido de verdade – caso que você já teria falhado de não tentar. “

(J.K. Rowling)

“Prefiro que enxerguem em mim erros com arrependimentos do que uma falsa perfeição.”

(Thales de Grulha)

## RESUMO

O consumo de suplementos alimentares teve grande aumento desde a década de 80, em que a preocupação com o corpo e o bem-estar foi ao encontro de novas tecnologias, ampliando a produção de alimentos industriais que supram as necessidades alimentares diárias. .

O *Whey Protein* é um suplemento alimentar em pó que consiste em um concentrado de proteínas, do qual se utiliza como matéria-prima principal o soro do leite para sua produção. O processo é composto por sistema de evaporação, filtração utilizando membranas (micro filtração e ultra filtração) utilizados para concentrar e retirar açúcares e gorduras presentes no soro do leite e por fim é utilizado um sistema de secagem por atomização *Spray Dry* para a produção do suplemento. No mercado existem três tipos de produtos comercializados como *Whey Protein*, como *Whey Protein Concentrado (WPC)*, o *Whey Protein Isolado (WPI)* e o *Whey Protein hidrolisado (WPH)* que são subclassificações de acordo com a técnica utilizada.

Em julho de 2018 foi criada uma nova regulamentação (ANVISA, 2018) para o controle de eficácia e constitucional de suplementos alimentares, com regras quanto ao consumo, aditivos, público e embalagens. Na nova regulamentação suplemento deixa de ser considerado como um alimento e torna-se um alimento modificado, devendo seguir uma legislação inédita no Brasil, mas que foi baseada em modelos estrangeiros.

Neste projeto realizou-se o estudo constitucional de diferentes marcas, nacionais e importadas, do *Whey Protein* concentrado (WPC) com o intuito de verificar se as mesmas apresentavam a constituição de nutrientes informadas e pré-estabelecidas nos rótulos e sem adição de substâncias como cafeína e diuréticos, seguindo a legislação vigente.

Para a realização dos testes foram empregadas às técnicas de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectrofotometria de Ultravioleta Visível (UV-Vis) e um conjunto de técnicas convencionais (titulométricas e gravimétricas).

**Palavras-Chave:** *Whey Protein*, suplemento alimentar, bromatologia.

## ABSTRACT

Vitamin consumption has had a major impact since the 1980, to improve the body, new food production technologies were created to meet daily dietary needs.

Whey Protein is a powdered dietary supplement consisting of a protein concentrate, the milk is most important material as for the production of whey. The process is composed of evaporation, filtration using filtration membranes and ultra filtration system, used to concentrate and extract sugars and fats present in whey and a spray drying system is used. for supplement production As Whey Protein Concentrate (WPC), Whey Protein Isolate (WPI) and Whey Protein hydrolyzed (WPH) is used one Spray Dry.

In July 2018 a new regulation was created (ANVISA, 2018) for the effectiveness and constitutional control of food supplementss, with rules on consumption, additives, public and packaging.

In the new supplement regulation is no longer considered as a food, and becomes a modified food, and must follow a new legislation in Brazil, but was based on foreign models.

In this project, a constitutional study of different national and imported brands of Whey Protein Concentrate (WPC) was carried out in order to verify if they had the constitution of informed and pre-established nutrients in the labels and without the addition of substances such as caffeine. and diuretics, following current legislation.

The tests were performed using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, High Performance Liquid Chromatography, Visible Ultraviolet Spectrophotometry (UV-Vis) and a set of conventional techniques (titration and gravimetric).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Consumo de Suplemento alimentar (ZANARDO,2018)	3
Figura 2-Produção Geral do Soro do leite	4
Figura 3- Representação da molécula Alfa-Lactose	4
Figura 4- Representação da molécula de Beta-Lactose	5
Figura 5- Processo geral de fabricação do <i>Whey Protein</i>	6
Figura 6- Representação da reação de fermentação da molécula de Lactose	7
Figura 7-Pesquisa de campo de indicação do consumo do <i>Whey Protein</i> (BRITO, 2016)	10
Figura 8- Representação da Espectrofotometria de ultravioleta (UV-Vis).	13
Figura 9- Representação simplificada de um ICP-OES	15
Figura 10- Representação da TOCHA	16
Figura 11- Plasma detalhado	16
Figura 12- Representação do equipamento de HPLC	18
Figura 13- Cromatograma (WELTER,2018)	19
Figura 8- Representação da molécula de frutose	21
Figura 9-Representação da molécula de lactose	22
Figura 10- Representação da molécula de amido	22
Figura 11- Representação de algumas moléculas de açúcar, diferenciação de açúcar redutor (NELSON;COX,2014)	23
Figura 12- Representação de moléculas de lipídios (COX,2014)	24
Figura 13- Representação da molécula de proteína (Cardoso,2018)	26
Figura 14- Representação da molécula de cafeína (ALVES, 2002).	29
Figura 15- Representação do questionário realizado neste trabalho	31
Figura 16- Representação do questionário realizado neste trabalho	32
Figura 17- Reação de identificação do açúcar com DNS	44
Figura 18- Imagem da curva de calibração da solução de glicose	

antes de ser analisada em espectrofotômetro.	45
Figura 19- Equipamento de extração de lipídios	47
Figura 20- Formação de uma ligação peptídica (Purgatto, 2014).	49
Figura 21- Digestão da amostra para análise de proteína	50
Figura 22- Faixa de cores do indicador Tashiro	50
Figura 23- Extração para análise de proteína	51
Figura 24- Reação de desprotonação	54
Figura 25- Metilxantinas	55
Figura 26- Cromatograma do padrão	57
Figura 27- Espectro de absorção do pico de padrão de cafeína no comprimento de onda 272nm	57
Figura 28- Cromatograma das amostras (1)	59
Figura 29- Cromatograma das amostras (2)	60



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teste de umidade	40
Tabela 2- Curva analítica da solução de glicose	41
Tabela 3- Resultados da análise de carboidratos	45
Tabela 4- Resultados da análise de lipídios	47
Tabela 51- Resultados da análise de proteínas	52
Tabela 6- Dados experimentais da análise de ICP-OES sem tratamento	54
Tabela 72- Dados experimentais tratados	54
Tabela 8- Diferença entre os dados teóricos e experimentais	54
Tabela 9- Resultados do cromatograma da injeção do padrão cafeína, teofilina e teobromina.	56
Tabela 10- Valores do cromatograma das amostras	57
Tabela 11- comparação teórica e experimental de carboidratos	61
Tabela 12- Comparação entre a porcentagem teórica e experimental de proteína nas amostras	61
Tabela 13- Comparação entre a porcentagem teórica e experimental de lipídios	61
Tabela 14- Valores do rótulo dos produtos	61
Tabela 15- Valores do produto considerando as análises realizadas	62
Tabela 16- Conformidade do rótulo dos produtos	62
Tabela 17- Conformidade geral das amostras	64

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Identidade Sexual de consumidores de <i>Whey Protein</i>	37
Gráfico 2- Relação da idade de frequentadores de academia	37
Gráfico 3- Relação da porcentagem de consumidores de suplemento alimentar em academias	38
Gráfico 4- Relação de consumidores que fazem uso de suplemento do tipo	38
Gráfico 5- Relação da indicação para o consumo de <i>Whey Protein</i>	39
Gráfico 6- Curva de calibração da solução de glicose	42

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Lei de Lambert- Beer	12
Equação 2- Porcentagem de umidade no alimento	20
Equação 3- Porcentagem de umidade na amostra	40
Equação 4- Massa da amostra volatilizada no processo de determinação de umidade	40
Equação 5- Equação da reta referente à curva da solução de glicose	42
Equação 6- Fórmula de absorvidade molar	42
Equação 7- Concentração prática de carboidratos da amostra	42
Equação 8- Concentração prática de carboidratos da amostra com o valor de absorvidade.	43
Equação 9- Porcentagem de carboidratos na amostra	43
Equação 10- Porcentagem de lipídios da amostra	47
Equação 11- Determinação da porcentagem de nitrogênio nas amostras	52
Equação 12- Determinação da porcentagem do teor de proteínas nas amostras	52
Equação 13- Concentração real dos analitos	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-Absorção medida

ALA - Alfa- lactoalbumina

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - Sulfato de amônio

$\sqrt{\quad}$ - Raiz quadrada

$\mu\text{L}$ - Microlitro

ANARA- Laboratório nacional de referência animal

ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC- Metodologia oficial internacional de análises químicas

aq- Sistema aquoso

BLG - Beta-lactoglobulina

BSA- Albumina do soro bovino

C- Concentração

C18- Coluna de separação de HPLC de fase reversa com 18 carbonos( octadecilsilano)

CAE- Concentração do analito pelo equipamento de ICP-OES

Cd- Cádmo

CG- Cromatografia gasosa

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

cm – Centímetro

Co- Cobalto

$\text{CO}_2$  – Dióxido de carbono

Cr- Cromo

CRA- Concentração real do analito

DNS- Ácido dinitrossalicílico

E – Absortividade molar

FDA- Administração de comidas e drogas .

G/l – Gramas por litro

GMP- Glicomacropéptídeos

$\text{H}_2\text{O}$  – Água

$\text{H}_2\text{SO}_4$ - Ácido sulfúrico

$\text{H}_3\text{BO}_3$ -Ácido bórico

HCl- Ácido clorídrico

HNO<sub>3</sub>- Ácido nítrico

HPLC- *High performace liquid cromatography*

I - Intensidade luminosa detectada no equipamento

I<sub>0</sub> - Intensidade da fonte luminosa

ICP-AES- *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado

IDR- Ingestão Diária Recomendada

Ig's- Imunoglobulinas

Kg- Quilograma

K-Potássio

l- Litro

L- Tamanho do caminho óptico

LBNA- Laboratório de Bioquímica, Nutricional de Alimentos.

Log- Logaritmo

MCTB-Média das concentrações das triplicadas dos brancos

Mg – Magnésio

mg- Miligrama

min- Minuto

mL-Mililitro

Mn- Manganês

Mo- Molibdênio

Mol- Mol

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- Sulfato de sódio

NaOH- Hidróxido de sódio

NH<sub>3</sub> – Gás amônia

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>- Íon amônio

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub><sup>-</sup> -Borato de amônio

nm- Nanômetro

NT- Nitrogênio total

Pf- Peso final da amostra

Pi- Peso inicial da amostra

PMP – Porcentagem média de perda das triplicatas dos positivos

PPB-Partes por bilhão

PPM- Parte por milhão

Se- Selênio

SMEDP- *Standart Methods for the Examination of dairy Products*

SO<sub>2</sub>- Dióxido de enxofre

SO<sub>3</sub> – Trióxido de enxofre

Sr- Estrôncio

TBME – Éter metil terc butílico

WPC- *Whey Protein* Concentrado

WPC34- *Whey protein* concentrado com 34% de proteínas

WPC75- *Whey protein* concentrado com 75% de proteínas

WPC80- *Whey protein* concentrado com 80% de proteínas

WPC88- *Whey protein* concentrado com 88% de proteínas

WPH- *Whey Protein* hidrolisado

WPI- *Whey Protein* Isolado

Zn- Zinco

## SÚMARIO

INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	2
1.1 WHEY PROTEIN	2
1.1.1 HISTÓRICO	2
1.1.2 FABRICAÇÃO	3
1.1.3 REGULAMENTAÇÃO	8
1.1.4 CONSUMO	9
1.1.5 ÓRGÃO RESPONSÁVEL	10
1.2 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA POR PLASMA ACOPLADO INDIVIDUALMENTE	11
1.2.1 DEFINIÇÃO	11
1.2.2 EQUIPAMENTO	11
1.2.3 ANÁLISE	14
1.3 ESPECTROMETRIAS DE ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)	14
1.3.1 DEFINIÇÃO	14
1.3.2 LEI DE LAMBERT BEER	14
1.3.3 EQUIPAMENTO	16
1.3.4 AQUISIÇÃO DE RESULTADOS	16
1.4 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	16
1.4.1 DEFINIÇÃO	16
1.4.2 EQUIPAMENTO	16
1.4.3 FASES DA CROMATOGRAFIA LIQUIDA	18
1.4.4 AQUISIÇÃO DE DADOS E RESULTADOS	19
1.5 UMIDADES DE ALIMENTOS	19
1.6 CARBOIDRATOS	20
1.6.1 DEFINIÇÃO	20
1.6.2 MÉTODO DE DNS	22
1.7 FIBRAS	23
1.8 LIPÍDIOS	24
1.8.1 DEFINIÇÃO	24
1.8.2 EXTRAÇÃO	25
1.9 PROTEÍNAS	26

1.9.1	DEFINIÇÃO	25
1.9.2	EXTRAÇÃO	25
1.10	INORGANICOS	26
1.10.1	LEGISLAÇÃO	26
1.10.2	ANÁLISE	26
1.10.3	COMPOSTOS INORGÂNICOS	27
1.11	CAFEINA	28
1.11.1	DEFINIÇÃO	28
1.11.2	ESTUDO DA CAFEINA NO CORPO HUMANO	29
1.11.3	QUANTIFICAÇÃO	
2	Objetivo	30
3	METODOLOGIA	30
3.1	PESQUISA DE CAMPO	31
3.2	UMIDADE	32
3.3	CARBOIDRATOS	34
3.4	FIBRAS	35
3.5	LIPÍDIOS	35
3.6	PROTEÍNAS	36
3.7	INORGÂNICOS	37
3.8	CAFEÍNA	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1	PESQUISA DE CAMPO	37
4.2	UMIDADE	40
4.3	CARBOIDRATOS	41
4.4	FIBRAS	45
4.5	LIPÍDIOS	47
4.6	PROTEÍNAS	49
4.7	INORGÂNICOS	54
4.8	CAFEÍNA	56
4.8.1	TABELA DE RESULTADOS	58
4.8.2	CROMATOGRAFIA	59
4.9	QUANTIFICAÇÕES DA AMOSTRA	62
4.10	EMBALAGENS DO PRODUTO	63

5 CONCLUSÃO	63
6 BIBLIOGRAFICA	66
7 APÊNDICE	76
7.1 DADOS EXPERIMENTAIS DE ICP-OES SEM TRATAMENTO	77
7.2 DADOS TEORICOS	77
7.3 VALORES TEÓRICOS DA AMOSTRA	78
7.4 DADOS EXPERIMENTAIS TRATADOS	79

## INTRODUÇÃO

A alimentação deve ser realizada de forma equilibrada entre todas as fontes de energias ingeridas, mas o imediatismo alimentar e a rotina acelerada do século XXI aumentou o consumo de alimentos processados na rotina alimentar.

O número de obesos no mundo cresceu seis vezes nas últimas quatro décadas, subindo de 105 milhões de pessoas acima do peso em 1975 para 841 milhões em 2017, pesquisa que foi realizada para 186 países. (ZANARDO, 2018). Considerando a projeção de crescimento mundial com a intersecção da projeção de obesos, cerca de um quinto da população mundial estará acima do peso saudável em menos de 10 anos.

No Brasil, a população brasileira aumenta em média 0,1 ponto no índice de massa corporal por ano. Ao longo de quatro décadas, os homens e as mulheres brasileiras atingiram o valor de 25,6 e 26, para o ICM respectivamente, se tornando oficialmente uma população acima do peso saudável. Em contraste com a má alimentação o mercado de comidas e bebidas saudáveis aumentou 17,7% no ano de 2017 (ZANARDO, 2018)

Com a percepção da dificuldade de algumas pessoas em suprir suas necessidades de nutrientes através da alimentação saudável e direta, os suplementos alimentares começaram a aparecer no mercado, TVs e academias na década de 80.

Em 1994, o *Food and Drug Administration* (FDA) definiu suplemento alimentar como sendo um produto, adicionado de algum ingrediente alimentar (vitaminas, minerais, ervas ou outros vegetais, aminoácidos, enzimas, dentre outros), devendo ser administrado por via oral com a finalidade de complementar a dieta (VELTRE, 2018). No Brasil 57% da população faz uso de algum suplemento alimentar, sejam eles minerais, vitamínicos ou compostos.

*Whey protein* é um suplemento alimentar produzido através do soro do leite na produção do queijo. As proteínas do soro são extraídas da parte aquosa do leite gerada durante o processo de fabricação do queijo.

Quando o leite é tratado, a caseína coagula, deixando o soro na superfície. A gordura e as proteínas são filtradas e separadas. A qualidade da separação determina a pureza do *whey protein*, podendo variar entre 35-95%, sendo encontrado de

três formas: *whey protein* concentrado (WPC), *whey protein isolado* (WPI) e o *whey protein hidrolisado* (WPH).

Durante cinco anos consecutivos a ANVISA investigou mais de 30 marcas de *whey protein* concentrado, sendo encontradas irregularidades em todos os anos e em quase todas as marcas. Em julho de 2018 foi criada uma nova legislação para o controle constitucional deste produto, que até então era considerado apenas como um alimento. A nova legislação estabelece quantidades mínimas e máximas de nutrientes e outros aditivos para que seja permitida a sua comercialização (ANVISA, 2018).

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 *Whey Protein*

#### 1.1.1 Histórico

Há 2500 anos na Grécia, Hipócrates, o pai da medicina, já prescrevia *Whey Protein* aos seus pacientes e defendia que o consumo dessa proteína melhorava o crescimento muscular, a força física e reforçava o sistema imunitário. (DOMINGUES, 2007).

Nos anos 20, o uso do soro do leite se espalhou pela Europa como alimento hipercalórico. O produto era filtrado através de uma peneira forrada com tecido fino branco e auxílio de uma colher de pau, com um processo de criação rústico. (MOURA, 2010)

Nos anos 40, a proteína *whey protein* surgiu pela primeira vez em revistas de *Bodybuilding*. A adesão por parte dos atletas foi grande, mas o sabor não era agradável ao paladar, além de conter muito colesterol, gorduras e principalmente lactose. (MOURA, 2010)

Em 1980 deu-se a primeira grande alteração na fórmula da proteína *whey* com a adição de sabores, surgiu a fórmula mais popular desde então, *Whey protein* concentrado (WPC). Devido ao grande consumo, principalmente por atletas de alto nível profissional, outras tecnologias foram empregadas ao processo de forma a maximizar a obtenção e tratamento da proteína.

Atualmente mais de 50% da população brasileira faz uso de algum tipo de suplemento alimentar, sendo o mais consumido por brasileiros o *Whey Protein*. (ZANARDO 2018)(Figura 1).

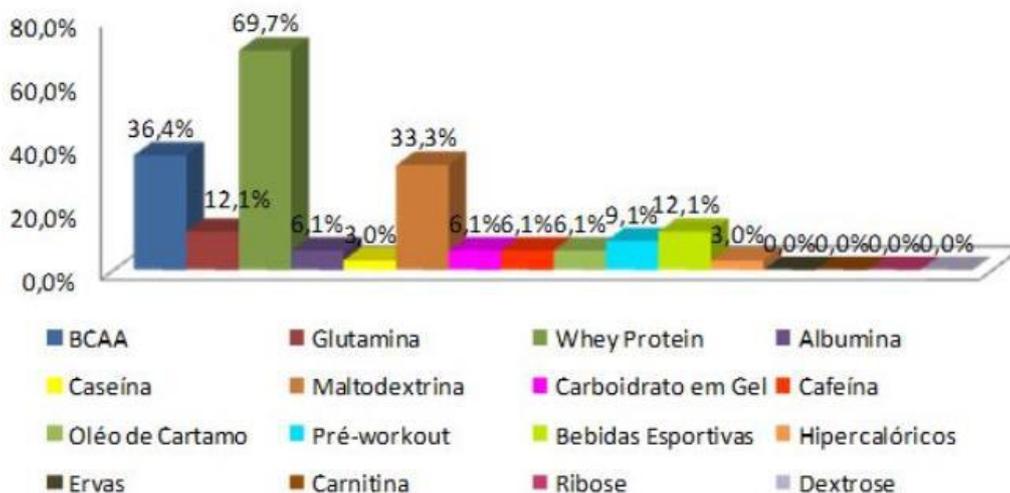


Figura 30- Consumo de Suplemento alimentar (ZANARDO, 2018)

### 1.1.2 Fabricação

O *Whey Protein* é produzido com o soro do leite, em sua grande maioria como um subproduto da produção de queijos como representado na figura 2.

As proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular incluindo algumas pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural, mantendo-as protegidas durante os diversos processos durante a produção do suplemento. As frações, ou peptídeos do soro, são constituídos de beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glicomacropéptídeos. (ALVES, 2013)

Presentes em todos os tipos de leite, a proteína do leite bovino contém cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro (aproximadamente 16% de BLG e 4% de ALA) (Araújo, 1999).

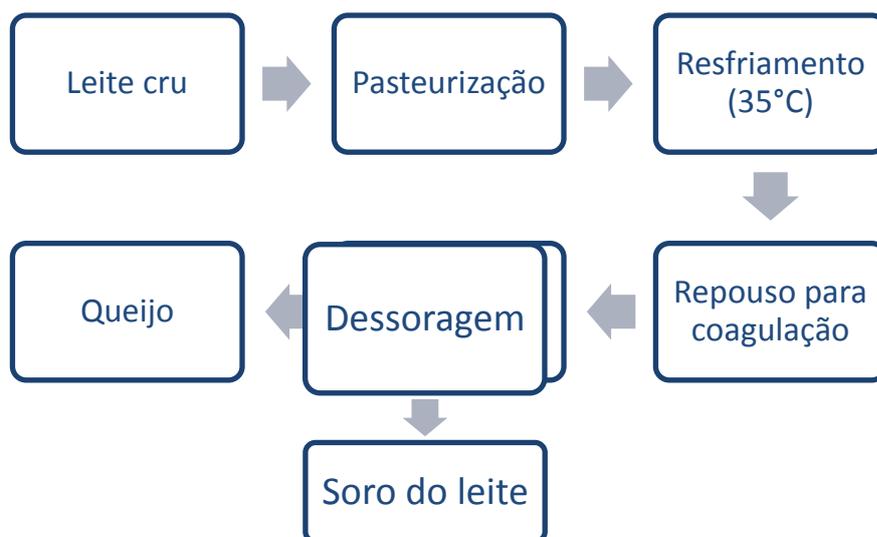


Figura 31-Produção Geral do Soro do leite

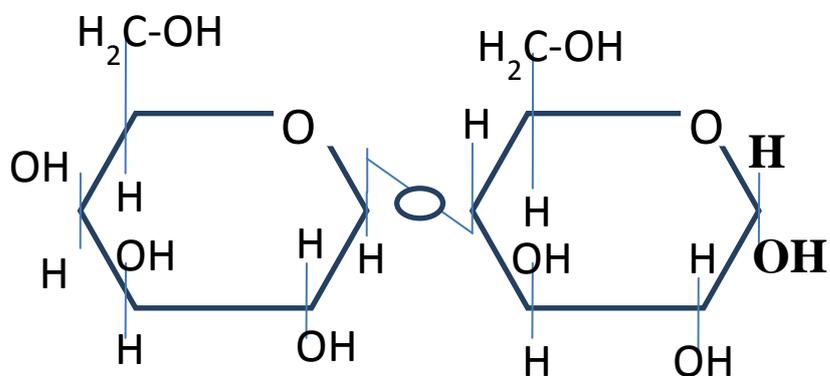


Figura 32- Representação da molécula Alfa-Lactose

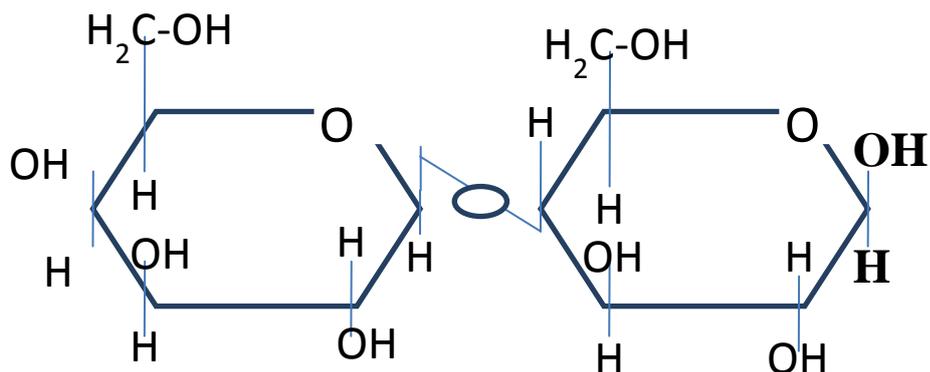


Figura 33- Representação da molécula de Beta-Lactose

A extração das proteínas é um processo formado por um conjunto de filtrações que empregam peso molecular como critério para que as proteínas sejam separadas da gordura, sais minerais e água. O desenvolvimento de ambos os processos (ultrafiltração, microfiltração e hidrólise enzimática) garantem maior pureza ao suplemento de proteína.

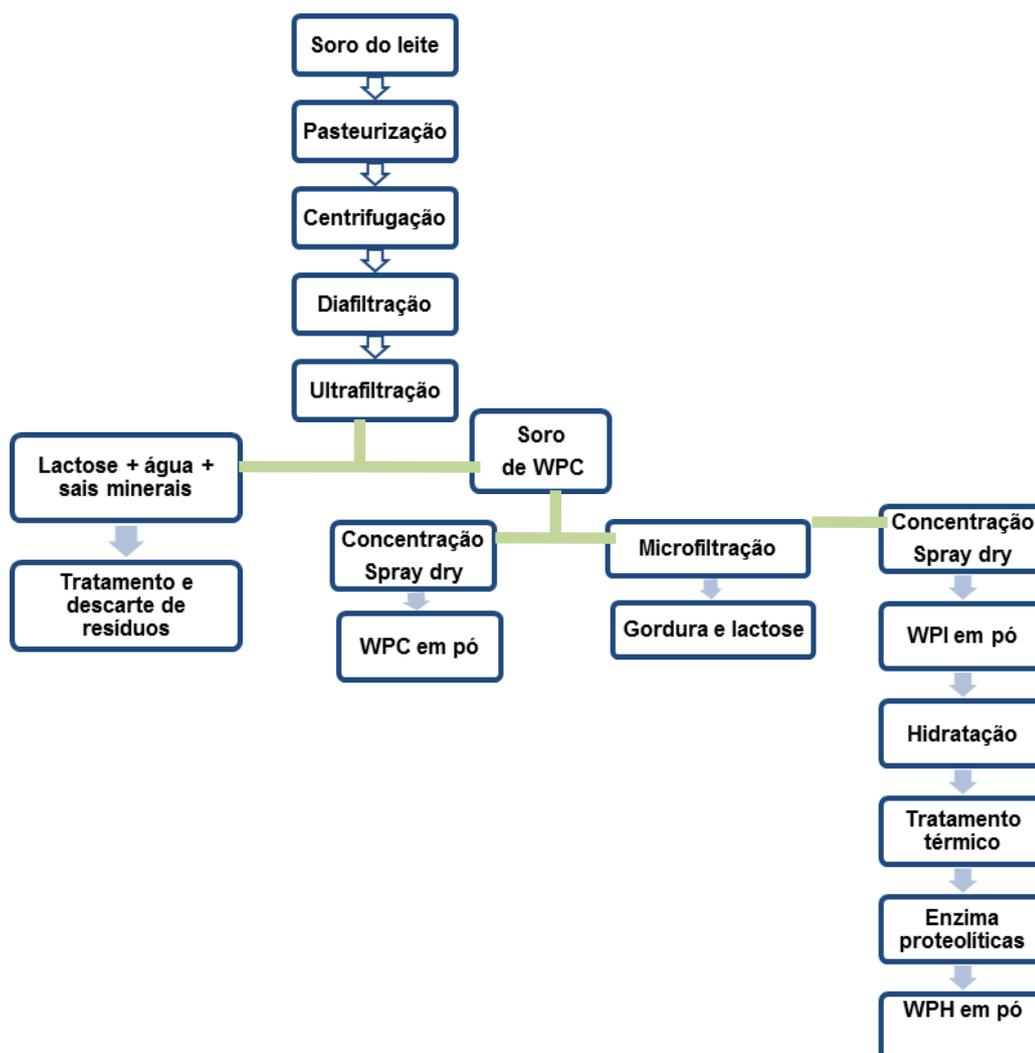
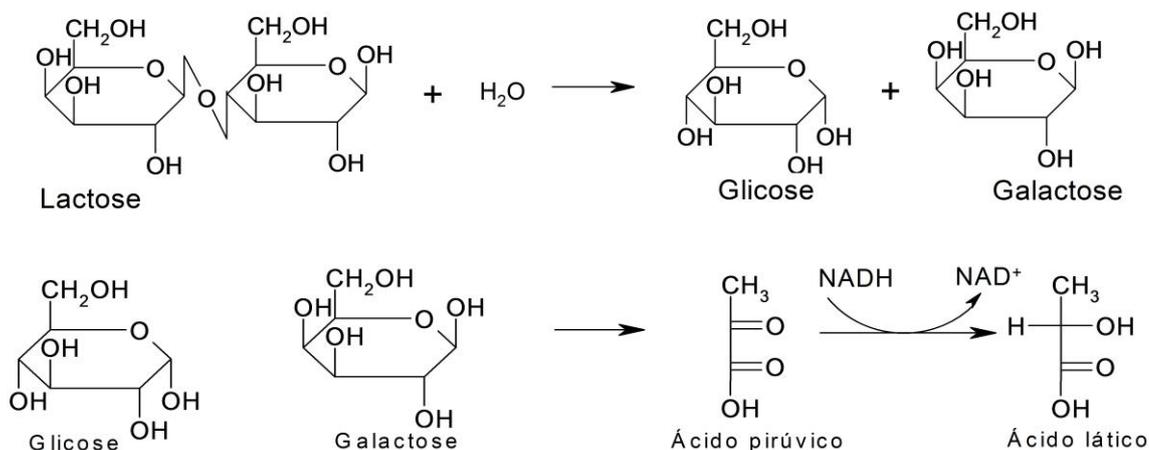


Figura 34- Processo geral de fabricação do Whey Protein

O processo para a produção do suplemento alimentar do tipo *Whey Protein* começa na estabilização do soro do leite, passando por processos de filtração para a separação de gorduras e proteínas como a centrifugação e diafiltração. Para a preparação de *whey protein* com diferentes quantidades de carboidratos podem ser usadas técnicas como a hidrólise enzimática e o tratamento térmico, sendo que estes são processos que encarecem o produto final, sendo assim o WPH é o produto mais caro entre os suplementos dessa categoria (ALVES, 2013)(figura 5).

- Pausterização: O soro do leite é pausterizado, interrompendo a conversão da lactose em ácido láctico, destruindo os organismos do fermento, e em seguida é resfriado a uma temperatura de 6°C, para interromper o processo de fermentação.

Durante a fermentação a lactose (alfa e beta) sofre ação enzimática convertendo-se em glicose e galactose. Os açúcares são fermentados, gerando o ácido pirúvico que é reduzido em ácido láctico.



**Figura 35- Representação da reação de fermentação da molécula de Lactose**

- **Centrifugação:** Remove os traços residuais de queijo e gordura, restando um soro de leite.
- **Diafiltração:** Adição de água com homogeneização do sistema, diminuindo a pressão nas membranas de filtração.
- **Ultra filtração:** são membranas com porosidade projetadas e construídas de modo a reter as moléculas e partículas com pesos moleculares superiores a 20.000, separando-as então das moléculas menores, como as de lactose que possuem peso molecular de 342, sais minerais e água.
- **Micro filtração:** Processo de fluxo tangencial sob um gradiente de pressão utilizando uma membrana com taxa de rejeição de peso molecular acima de 100.000. O processo de micro filtração remove os grandes glóbulos e moléculas de gordura, os quais são concentrados e separados dos demais componentes do soro de leite. O processo de micro filtração é utilizado para produzir WPI, com elevados teores protéicos (superiores a 90% de concentração) e baixos, ou livres, teores de lactose e gordura.
- **Tratamento térmico:** Favorecer a quebra da proteína em peptídeos menores.
- **Hidrólise enzimática:** transformação da proteína em partículas menores, como os dipeptídeos e tripeptídeos, ampliando assim o aproveitamento nutricional da proteína hidrolisada, produzindo o WPH.

Quanto maior o número de filtrações realizadas maior a pureza do produto. No mercado atual encontramos o *Whey Protein* de três formas distintas. ( ATRA,2005)

- WPC- Formato mais barato e genérico,com quantidades significativas de gordura e lactose (açúcar do leite), variando de acordo com a filtração. Podendo existir, de acordo com a quantidade de proteínas no suplemento, As versões mais comuns são WPC34, WPC75, WPC80 e WPC88.
- WPI- Necessita de um processo de microfiltração ou por filtração iônica, isolando a proteína da lactose e gordura, resultando em uma proteína pura e isolada. Sua recomendação principal é para intolerantes a lactose e para quem quer rapidez na absorção.
- WPH- Consiste no concentrado de WPI com a quebra em peptídeos através de enzimas para ser absorvido rapidamente pelo corpo.

### 1.1.3 Regulamentação

Com a ampliação de mercados de nutrição esportiva,e o crescimento de redes para as atividades físicas, o consumo de suplementos alimentares vem crescendo em números consideráveis no Brasil, com São Paulo sendo a segunda maior cidade do mundo em números de academias (BRITO, 2012).

O principal órgão responsável pelo controle efetivo, normatização, aperfeiçoamento e fixação de identidade dessas substâncias, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, onde tem sua regulamentação fixada através da Portaria Nº 32 de 13 de janeiro de 1998. (ANVISA,1998 )

A portaria Nº 32 aponta que os suplementos vitamínicos e ou de minerais, são alimentos que servem apenas como complementação para uma dieta diária para as pessoas com deficiência nutricional quando a alimentação direta é insuficiente.

Suplementos alimentares devem conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da ingestão diária (IDR) de vitaminas ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva. (ANVISA, 2018).

Em 27 de abril de 2010,a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº18, publicada pela ANVISA, estabeleceu a classificação, a denominação, os requisitos de composição e de rotulagem dos alimentos para os atletas.Segundo essa resolução, estes alimentos são formulados especificamente como auxílio alimentar para os atletas diante do grande desgaste físico nos quais são submetidos,atendendo as suas

carências em nutrientes e promover uma melhor performance nos treinos e competições (GOSTON e CORREIA, 2009).

O uso complementar das vitaminas e sais minerais deve servir apenas como forma de auxiliar para atingir as necessidades nutricionais, fundamentadas nas quantidades sugeridas de consumo e sempre acompanhadas de orientações médicas ou nutricionais mesmo em casos de não atletas (GOSTON e CORREIA, 2009).

Em julho de 2018 a ANVISA estabeleceu uma nova resolução, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 239, que classifica o *Whey Protein* como um suplemento alimentar, devendo respeitar as quantidades de aditivos permitidos e coadjuvantes de tecnologias.

#### 1.1.4 Consumo

O uso de suplementos deve ser realizado por recomendação de nutricionistas ou profissional habilitado como estabelece a lei 8.234, que regulamenta a profissão de nutricionistas. O uso sem a devida indicação ocorre por não existir leis que fiscalizem prescrição e venda dos suplementos (NOGUEIRA, 2016).

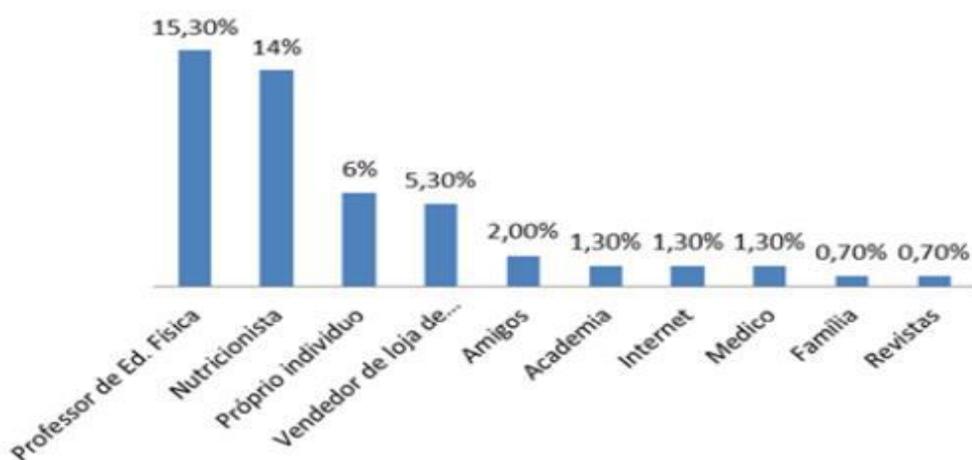


Figura 36-Pesquisa de campo de indicação do consumo do Whey Protein (BRITO, 2016)

Normalmente a utilização de suplementos não é aconselhada adequadamente, figura 7, sendo a maior indicação realizada pelo profissional de Educação Física, seguido da indicação de nutricionistas e vendedores, podendo prejudicar o usuário com o uso indevido.

Os consumidores devem ser conscientes de que o consumo além dos níveis recomendados não aumentará a eficácia do produto. Sem uma correta prescrição, o suplemento ao invés de proporcionar efeitos benéficos poderá causar efeitos prejudiciais à saúde do consumidor, podendo ser desde efeitos leves e reversíveis até extremamente graves como arritmia, alteração da pressão arterial, insônia, sonolência, irritabilidade, ansiedade, problemas renais e hepáticos (NOGUEIRA; SOUZA; BRITO, 2013).

#### **1.1.5 Órgãos responsáveis**

Pode-se encontrar uma grande variação de metodologias de análise de alimentos em livros e artigos, porém somente os métodos oficiais podem ser utilizados para emissão de relatórios sobre os alimentos.

Estudos e pesquisas para publicação podem usar métodos padrões ou métodos modificados que por estatísticas apresentem confiabilidade em seus resultados (métodos validados).

Os métodos padrões são criados por agências nacionais e internacionais que apresentem resultados reprodutíveis. Como referência internacional destaca-se a AOAC (Official Analytical Chemists International) que consiste no mais conhecido e completo compendium de análise de alimentos e engloba os produtos em geral, e a SMEDP (*Standart methods for the Examination of dairy Products*) que consiste no compendium específico para análise de leite e seus subprodutos e derivados.

Nacionalmente as metodologias do Instituto Adolfo Lutz e ANARA também são referências oficiais para relatórios e publicações, além das metodologias específicas descritas em resoluções e instituições normativas (Ministério da Agricultura e da Saúde).

Para a determinação de componentes em concentrações muito baixas ou de traços é recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz, o uso de metodologias em equipamentos instrumentais como cromatografias gasosas e espectrometrias.

Elementos ou substâncias que contenham uma concentração maior do que 1% do alimento, de acordo com as metodologias do Instituto Adolfo Lutz, podem ser determinadas por métodos clássicos, exemplo extração por solvente para lipídios e titulação para determinação de proteínas.

## 1.2 Espectrofotometria de Ultravioleta Visível (UV-Vis)

### 1.2.1 Definição

A espectrofotometria ultravioleta visível é um método que estuda as interações entre a luz com a matéria. Cada composto químico absorve, transmite ou reflete luz ao longo de um determinado intervalo de comprimento de onda. A espectrofotometria pode ser utilizada para identificar e quantificar substâncias químicas a partir da medição da absorção e transmissão de luz que passa através da amostra utilizando a lei de Lambert –Beer.( SARAN,2012).

### 1.2.2 Lei de Lambert Beer

Lei de Lambert-Beer, determina que a absorvância seja diretamente proporcional à concentração da solução de amostra, como descrita pela equação 1. Onde:

- A é absorvância medida;
- $I_0$  é a intensidade da fonte luminosa;
- I é a intensidade luminosa detectada;
- c é a concentração (Mol.L<sup>-1</sup>) ;
- L é o tamanho do caminho óptico (cm)
- $\epsilon$  é a absorvância molar, que é uma constante e única de cada substância(L.mol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>).

#### Equação 14- Lei de Lambert- Beer

$$A = \log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot L$$

A absorção da radiação visível e ultravioleta depende do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes.

A absorção de comprimentos de onda longos da radiação do ultravioleta e visível é restrita e limitada a um número de grupos funcionais chamados de cromóforos, que possuem energia de excitação consideravelmente baixa.(SKOOG,HOLLER,NIEMAN, 2002 )

### 1.2.3 Equipamento

Originalmente, os espectrofotômetros UV-VIS foram desenvolvidos para medidas de absorção em amostras líquidas, atualmente existem equipamento para a leitura de substâncias sólidas. O espectrofotômetro UV-Visível é um equipamento multi-propósito e que trabalha na faixa de comprimento de onda de 190 a 1100nm.

O espectrofotômetro é um aparelho capaz de produzir luz monocromática por meio uma lâmpada deutério ou tungstênio e de detectar de uma forma sensível a quantidade de luz absorvida por uma amostra a um dado comprimento de onda.

A luz é transmitida da lâmpada para um sistema de espelhos e lentes. O raio luminoso passa por uma fenda que deve atingir um prisma com rede difração e decompor a luz branca em diferentes comprimentos de onda. Quanto menor for à fenda, menor é a diferença dos comprimentos de onda que chegam à amostra e assim melhoram a resolução do resultado.

O sistema de detecção de um espectrofotômetro consiste num tubo fotomultiplicador sensível à luz. O tubo fotomultiplicador converte os sinais de luz em sinais elétricos

Existem equipamentos que fazem o desconto do branco (teste dos reagentes) automático, que são os sistemas de dupla fenda. No caso de equipamentos de uma única fenda o valor lido de absorção para cada amostra deve ser tratado, sendo descontando o valor do branco. O valor do branco nunca deverá ser superior a 10 % do valor observado numa amostra.

Caminho do espectro:

1- A luz branca emitida pela lâmpada passa através de uma rede de difração no monocromador e é separada nos vários comprimentos de onda do espectro visível.

2. O comprimento de onda desejado é selecionado através de um seletor

3. Parte da intensidade do feixe luminoso que incide na amostra é absorvida, sendo a restante parte transmitida. A luz transmitida é direcionada para um detector que a transforma num sinal elétrico

4. O sinal elétrico gerado no transdutor é transmitido para um amplificador de sinal, onde a sua intensidade é aumentada.

5. O sinal amplificado será recebido por um voltímetro, que dá a leitura da quantidade de luz que foi transmitida pela amostra. O mostrador pode indicar tanto unidades de absorvância como de transmitância.

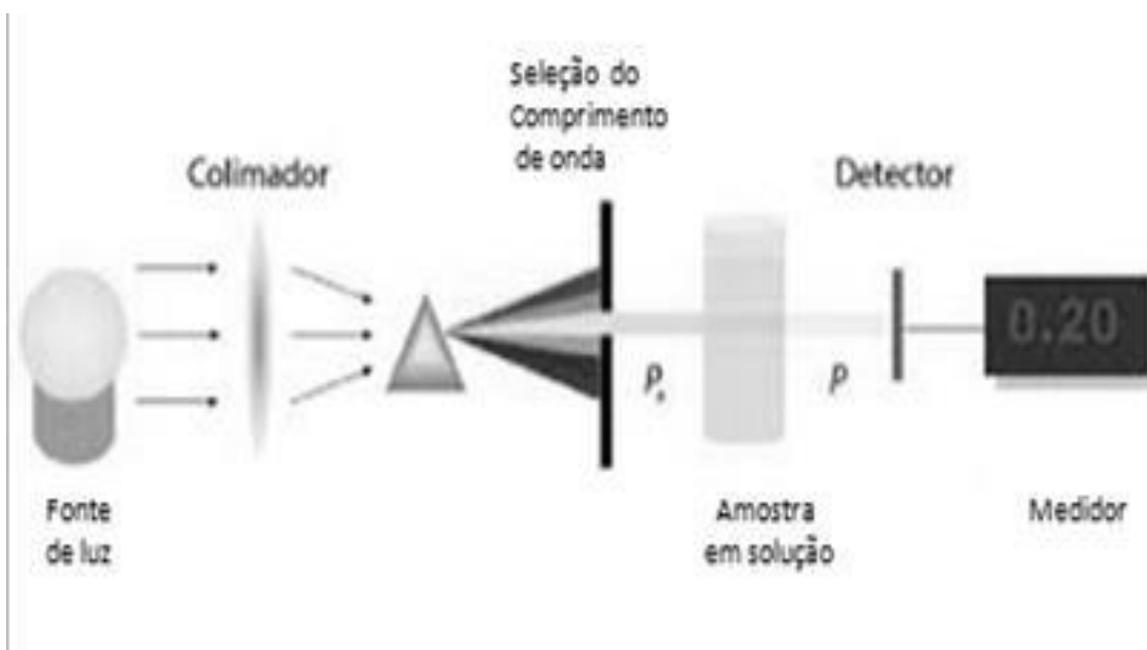


Figura 37- Representação da Espectrofotometria de ultravioleta (UV-Vis) (TEIXEIRA,2012)

### 1.3 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente

#### 1.3.1 Definição

A técnica que recebe o nome em inglês de ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*), e em português Espectrometria de Emissão óptica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), é uma técnica de análise instrumental multielementar, capaz de realizar um alto número de determinações em uma faixa de tempo curto. A técnica é baseada na medida da intensidade da radiação emitida, quando um átomo ou íon excitado por uma fonte de plasma de argônio à alta temperatura, retorna ao seu estado fundamental (MAGACHO, 2013-SKOOG, HOLLER and NIEMAN, 2002).

A técnica de ICP OES tem sido largamente empregada na determinação de elementos de traço em alimentos, como o leite, pois se conseguem baixos limites de detecção, faixa linear de trabalho ampla e a possibilidade de se fazer determinações simultâneas multielementares( KARADJOVA, 2000).

Nesta técnica o preparo das amostras é considerada um passo crítico importante na determinação dos elementos. Para minimizar os erros durante o preparo das amostra, uma amostra controle é preparada simultaneamente com as demais a serem

analisadas. A escolha do procedimento de digestão depende da natureza da matriz, dos elementos a serem determinados e dos métodos instrumentais a serem usados em sua determinação(VOGEL, 2002).

### 1.3.2 Equipamento

O equipamento é composto por sistema de injeção de amostra, fonte de plasma com acoplamento indutivo, gerador de radio frequência e espectrômetro/detector. Processador

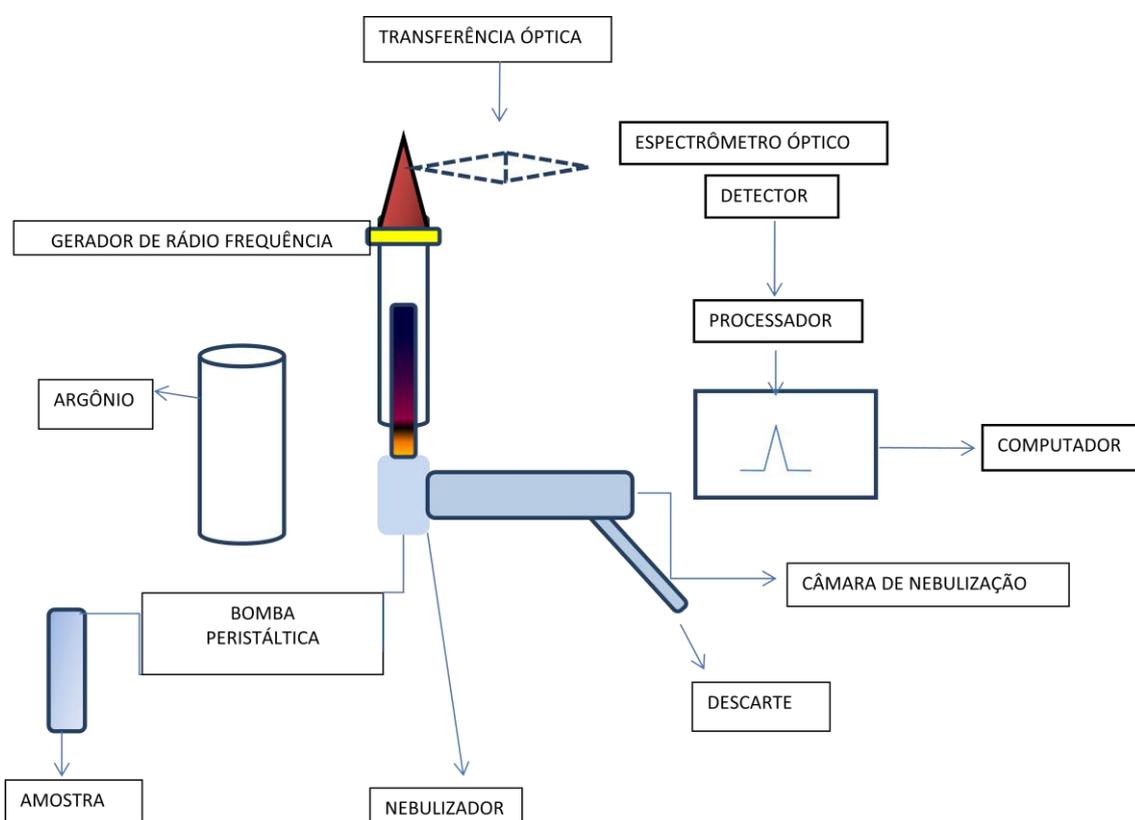


Figura 9- Representação simplificada de um ICP-OES

A tocha é formada por três canais convergentes com entradas individuais, figura 10. A tubulação externa (1) é a entrada para o gás, em que é formado o vórtex de Reed, servindo como isolante térmico e para a centralização do plasma, na tubulação intermediária (2) ocorre a entrada do gás auxiliar que confere a estabilização do plasma. A tubulação interna (3) em que ocorre a entrada da amostra devido à

nebulização pneumática da amostra com o gás argônio no formato de um aerossol. (AIR PRODUCTS,2018)

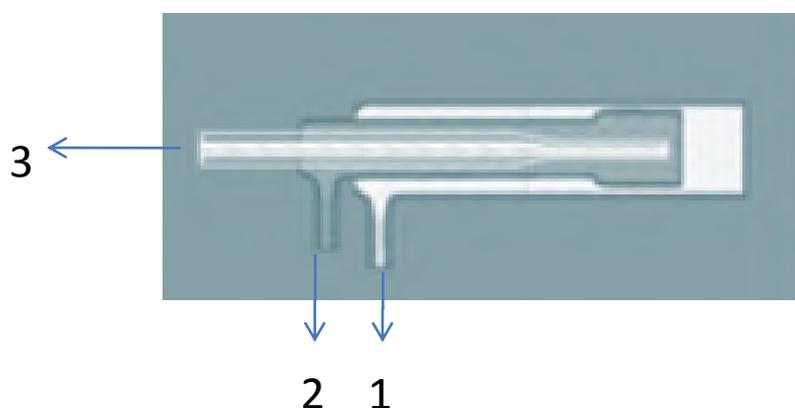


Figura 10- Representação para TOCHA

A região do plasma é dividida em quatro partes, a primeira PHZ (ocorre à atomização), a segunda nomeada de IRZ (excitação do átomo atomizado), a terceira NAZ (ionização e a excitação iônica) e a quarta ocorre à formação óxido.

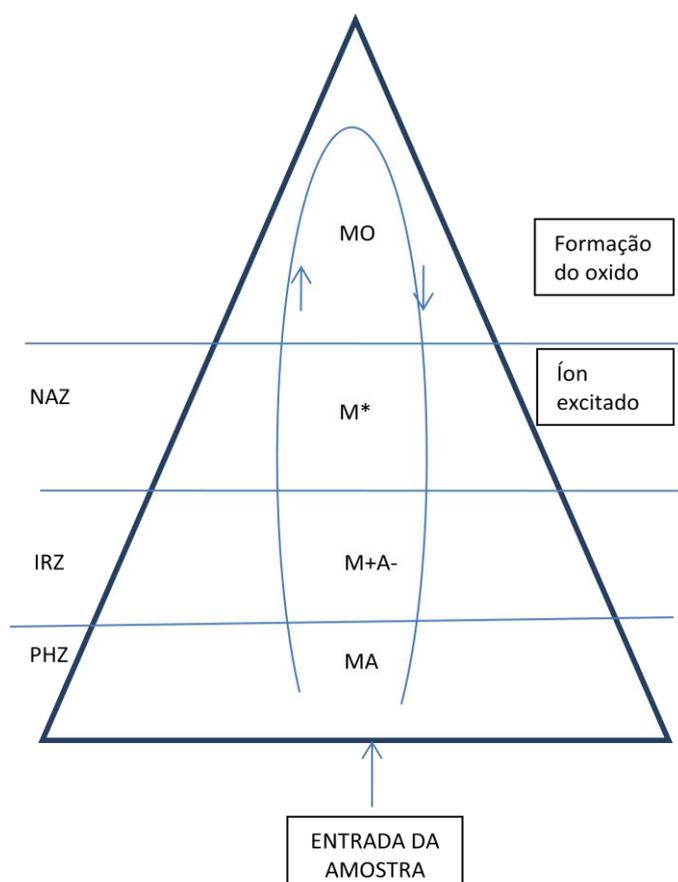


Figura 11- Esquema do plasma detalhado

### 1.3.3 Análise

A amostra é nebulizada com gás inerte, formando um aerossol dentro da câmara de nebulização e segue para a tocha onde os elétrons serão excitados.

Os elétrons da espécie emitem linhas espectrais de acordo com as suas transições possíveis. A luz emitida é direcionada para uma lente que tem a função de ampliar a zona de descarga luminosa do plasma quando projetada sobre a fenda de entrada, aumentando a iluminação para a rede de difração. O monocromador seleciona as linhas para que o espectrômetro para então o sinal ser processado e computadorizado(MAGACHO, 2013).

## 1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

### 1.4.1 Definição

A cromatografia tem como princípio básico, a separação de determinadas misturas, utilizando dessa forma duas fases, uma móvel e outra estacionária. A fase móvel pode ser constituída por uma substância líquida ou um gás, já a fase estacionária é composta por um líquido ou um sólido. (WELTER, 2018).

A cromatografia pode ser dividida em dois grupos, planar ou de coluna, existindo dessa forma vários tipos de cromatografia, por exemplo, cromatografia gasosa (CG), líquida, de camada delgada entre outras.

A cromatografia líquida de alta eficiência – CLEEA ou também conhecida com a sigla HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), faz parte do grupo de classificação da cromatografia colunar. Essa técnica cromatográfica normalmente é empregada em amostras de alimentos, água, solo, cosméticos, fármacos, etc...

### 1.4.2 Equipamento

O equipamento para a realização desse tipo de cromatografia é denominado de cromatógrafo líquido que é constituído por vários sistemas, sendo eles:

- Sistema de reservatório de fase móvel;
- Sistema de bombeamento de fase móvel;
- Sistema de injeção;
- Coluna cromatográfica;
- Sistema de detecção (existe detecção por UV, fluorescência, espectrofotometria de massas, etc.);
- Sistema de aquisição e registro de dados.

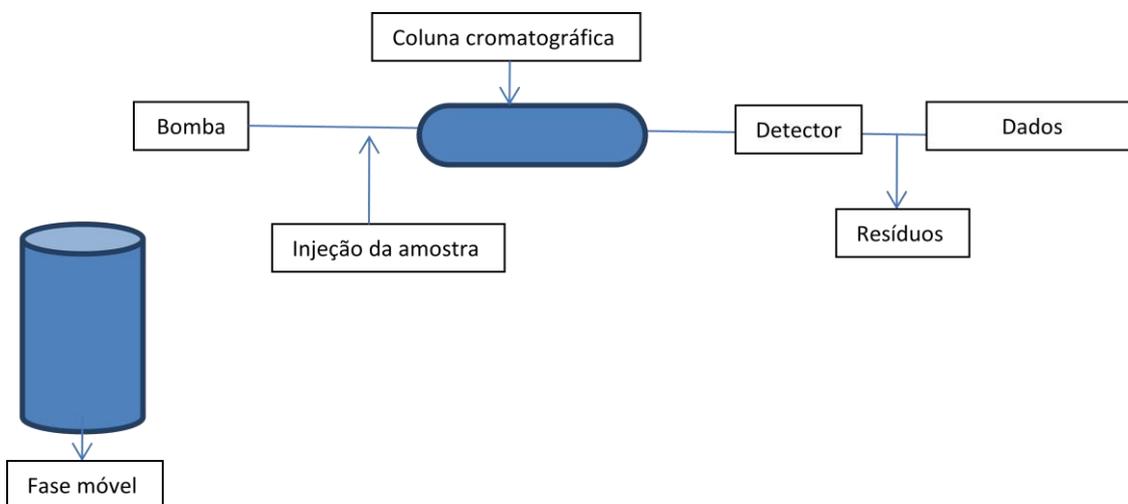


Figura 12- Representação do equipamento de HPLC

### 1.4.3 Fases da cromatografia líquida

Para a fase estacionária pode-se utilizar compostos sólidos ou líquidos. Os sólidos normalmente são substâncias absorventes, tais como, sílica e carvão ativo, e a separação é baseada em absorção. O composto líquido da fase estacionária é denominado de película delgada, sendo que nesse caso a base de separação de misturas é denominada de partição.

Na fase móvel, pode-se utilizar um solvente puro ou uma mistura de alguns solventes, por exemplo, metanol, acetonitrila e água. Existem critérios para que o solvente, puro ou misto, seja passível de utilização para a técnica. Estes critérios são:

- Baixa viscosidade;
- Dissolução da amostra sem perda dos compostos;
- Polaridade adequada para a realização da separação dos componentes da amostra.

A eluição da amostra pode ser realizada de dois modos: a isocrática, em que a composição da fase móvel se apresenta constante durante o processo de análise, ou modo gradiente, a composição da fase móvel pode ser ajustada para variar durante a realização da análise de acordo com o tempo da mesma. (WELTER,2018)

#### 1.4.4 Aquisição de dados e resultados

Para a cromatografia se utiliza sistemas de computação ou automação para aumentar a quantidade de dados coletados em relação ao tempo. A automação pode ser em partes do equipamento como injeção automática ou um programa que realize as aquisições de dados diretamente.

A aquisição e tratamento de dados irá definir na precisão de um pico gerado no cromatograma, figura 13, sua relação com o tempo de injeção e intensidades.

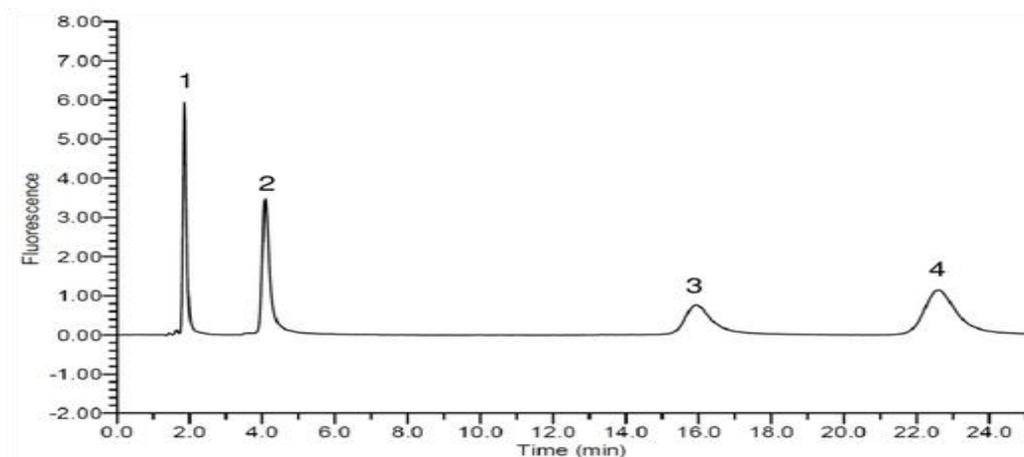


Figura 13- Cromatograma (WELTER,2018)

#### 1.5 Umidade de alimentos

A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos, pois correlata à estabilidade, qualidade e composição influenciando na estocagem e embalagem do produto.

Umidade é dada como uma fração que engloba todos os constituintes voláteis à temperatura de 100°C – 105°C sendo que a porcentagem de umidade do alimento (%U).

Em literatura estão descritos diferentes metodologias oficiais para a determinação de umidade em alimentos, tais como métodos por destilação (Bidwell Sterling), químicos (Karl Fischer) e físicos (estufa 105 °C).

O método gravimétrico indireto em estufa faz parte da metodologia oficial (INSTITUTO ADOLFO LUTZ,2008), baseia-se na remoção da água por aquecimento total da amostras, sendo o ar quente absorvido por uma camada muito fina do alimento e então conduzido para o interior por condução (CUNHA,2018).

No teste de umidade ocorre a perda de produtos voláteis e água. Existem três tipos de água em alimentos:

- Água adsorvida (está presente nos espaços inter granulares e entre os poros do material. É eliminada com facilidade. Atua como meio de dispersão e nutriente para o crescimento de microrganismos ou reações químico-enzimáticas) (FENNEMA. 2010);
- Água absorvida (uma parte da água que está adsorvida como uma camada muito fina nas superfícies internas e externas dos colóides macromoleculares (amidos, pectinas, celulosas e proteínas) por meio de Força de Van der Waals e formação de ligação hidrogênio(FENNEMA. 2010);
- Água ligada (está combinada quimicamente com outras substâncias. Este tipo de água não é utilizada como solvente, não permite o desenvolvimento de microrganismos e é difícil de ser eliminada) (FENNEMA. 2010);

A equação 2 é padrão para realizar o cálculo de umidade (%). Em que:

- Pi = Peso inicial da amostra
- Pf = Peso final da amostra.

#### Equação 15- Porcentagem de umidade no alimento

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{Pi} - \text{Pf}) \times 100}{\text{Pi}}$$

Onde: O teor de umidade é a medida da quantidade total de água contida num alimento (água total), e é geralmente expresso como uma porcentagem (%) do peso total (FENNEMA. 2010).

## 1.6 Carboidratos

### 1.6.1 Definição

Carboidratos são denominados como glicídios, sacarídeos ou popularmente conhecidos como açúcares. A denominação carboidrato, utilizada para as moléculas que pertencem a este grupo, é consequência da sua estrutura química que possui átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio ligados da seguinte maneira (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>.

Os carboidratos podem ser classificados como monossacarídeo (frutose), oligossacarídeo (lactose) ou polissacarídeo (amido). Essa classificação está baseada no número de moléculas ligadas entre si (Teixeira, 2012).

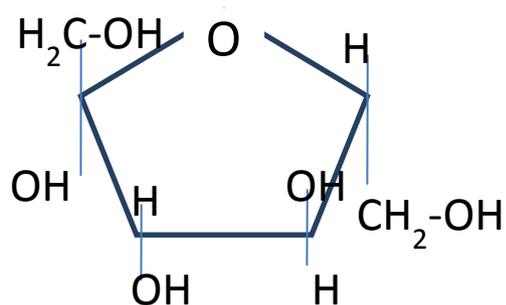


Figura 38- Representação da molécula de frutose

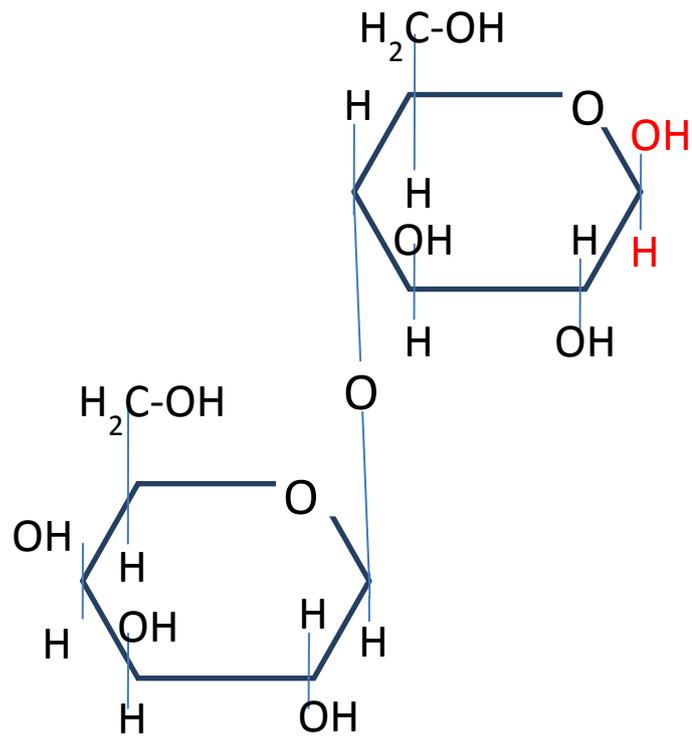


Figura 39-Representação da molécula de Lactose

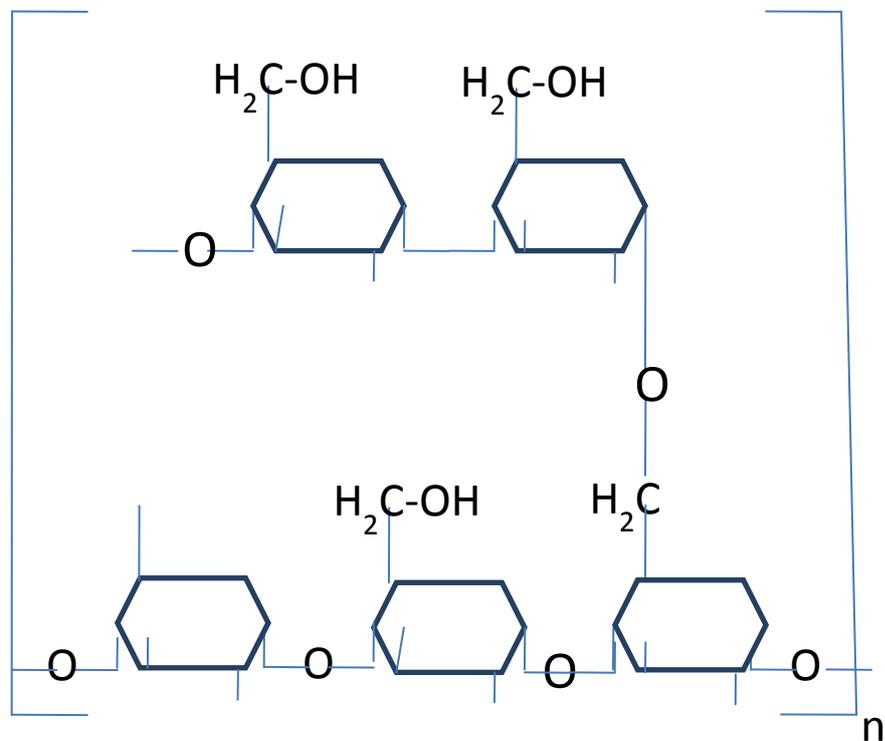


Figura 40- Representação da molécula de amido

Diferentemente de outras frações, os carboidratos necessitam da combinação de no mínimo dois métodos para serem quantificados. Os mono e oligossacarídeos podem ser determinados em conjunto utilizando técnicas de cromatografia líquida ou DNS (Ácido 3,5-dinitrossalicílico) (somente açúcares redutores), porém os polissacarídeos necessitam de um método enzimático para serem determinados por espectroscopia (HU,2008).

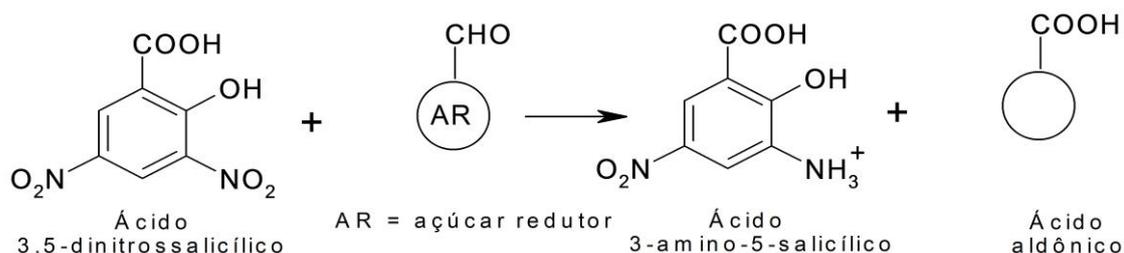
A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é o método mais difundido para quantificação de moléculas, o que garante maior precisão na medida de concentração desses carboidratos em solução, porém para dosagem de açúcares redutores o método; descrito por Miller (1959), DNS, é considerado uma excelente adaptação e considerado um método modificado e aceito de análise pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ.

### 1.6.2 Método de DNS

Açúcares redutores são carboidratos que possuem seu grupo carbonílico livre, capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes em solução alcalina. O carbono carbonílico é oxidado a um grupo carboxílico.

Os carboidratos cujos carbonos são envolvidos em ligações glicosídicas são incapazes de assumirem a sua forma linear e, portanto, de se oxidarem em solução alcalina, são denominados açúcares não redutores, como exemplo, a sacarose.

Os açúcares redutores os mais importantes são a glicose, galactose, frutose e lactose. Esses carboidratos são os mais presentes em processos de análises de alimentos de origem láctea e vegetal. (NELSON; COX, 2014).



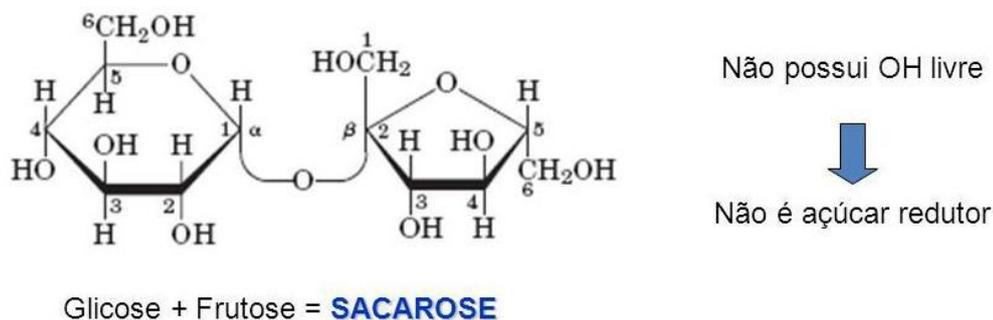
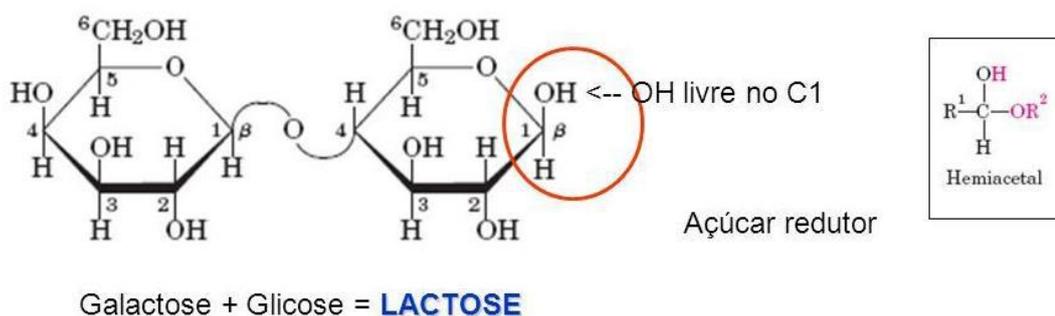
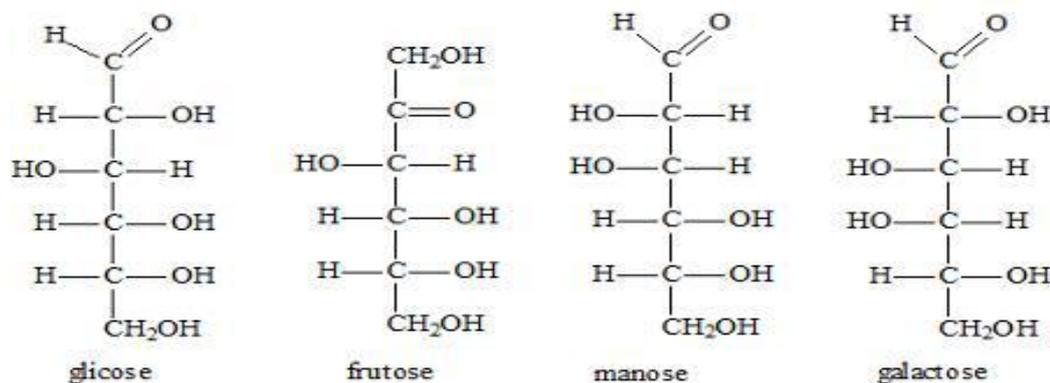


Figura 41-Representação de algumas moléculas de açúcar e a diferenciação entre açúcar redutor e não redutor e reação do DNS (NELSON;COX,2014)

## 1.7 Fibras

Quimicamente a fibra alimentar (FA) é composta, de polissacarídeos de origem vegetal interligados entre si formando uma rede tridimensional, com a presença de outras substâncias como proteínas de parede celular, lignina, compostos fenólicos, fitatos, oxalatos e entre outros. (VASCONCELOS. 2016).

As fibras são subclassificadas em fibras solúveis e fibras insolúveis de acordo com a solubilidade de seus componentes em água. Como exemplos de fibras solúveis podem-se citar pectinas e para as fibras insolúveis destaca-se a celulose.

A determinação de fibra alimentar pode ser realizada por métodos gravimétricos, enzimico-gravimétricos, enzimico-químicos por espectrofotometria, enzimico-químicos por cromatografia a gás (CG), enzimico-químicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 1.8 Lipídios

### 1.8.1 Definição

O leite bovino contém os mais complexos lipídios conhecidos. Os triacilgliceróis (triglicerídeos) representam, sem dúvida, a maior proporção dos lipídios, compreendendo de 96 a 98% de seu total. No leite, os triacilgliceróis estão presentes como glóbulos de gordura, sendo grande parte dessa gordura são retirados pelos processos de produção do *Whey Protein*. (TONIAL,2009).

Os lipídios são conhecidos como óleos e gorduras que apresentam baixa solubilidade em água. Possuem ácidos graxos em sua estrutura, que são constituídos de átomos de carbono e hidrogênio, e possui um grupo terminal, denominado carboxila (COOH).

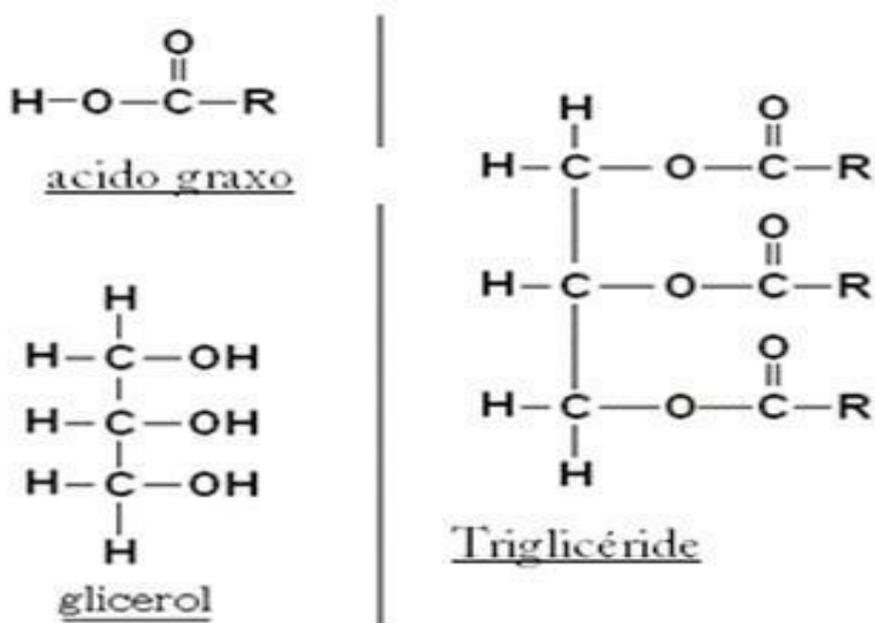


Figura 42- Representação de moléculas de lipídios (COX,2014).

Os lipídios são compostos sujeitos às reações de oxidação. A oxidação lipídica ocorre entre o oxigênio atmosférico e os ácidos graxos insaturados dos lipídios. A

oxidação provoca uma série de alterações indesejáveis no alimento como mudança de cor, sabor, aroma e textura, ela é a responsável pela rancidez nos alimentos (FREITAS,2017). Alguns fatores favorecem a reação de oxidação como o calor, luz e a presença de metais. Para impedir que ocorra a oxidação do alimento pode ser usado embalagens modificadas que impeçam a influência da luz como embalagens laminadas.

A extração a quente é referência oficial do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), neste processo a massa inicial permanece dentro da cápsula de extração, somente o solvente a quente entra em contato com a amostra. O solvente extrai a gordura da massa inicial e quando chega ao fim o ciclo de extração os lipídios permanecem no balão junto com o solvente.

### **1.8.2 Extração**

A extração a quente é uma metodologia baseada em conceito gravimétrico que considerada uma metodologia oficial de análise para esta classe. Utiliza um aparato que permite a extração de lipídios através da contínua passagem de um solvente aquecido através da amostra. O solvente então é evaporado depois de um ciclo de extração é realizado a pesagem da gordura extraída retida no balão.

Quando desejável pode-se injetar a gordura extraída em um HPLC e realizar uma análise de identificação de lipídios presentes na amostra e quantificá-los individualmente (FREITAS, 2017).

## **1.9 Proteínas**

### **1.9.1 Definição**

As proteínas se caracterizam por ser o grupo mais abundante de macromoléculas, encontradas dentro e fora das células, e de importância vital aos seres vivos. Suas funções são tão amplas que englobam transporte de outras moléculas, imunidade e construção de tecidos. A alimentação humana deve incluir todas as classes de proteínas que são encontradas nas diferentes fontes (carne, peixe, ovo, leite e derivados) (FELTRE, 2004).

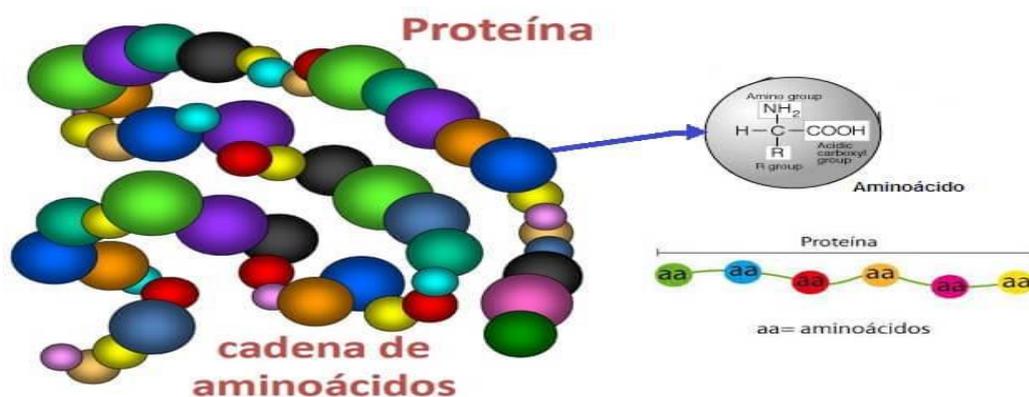


Figura 43- Representação da molécula de proteína (CARDOSO,2018)

Moléculas de proteínas muito grandes, pois são formadas pela união seqüencial de aminoácidos por meio de ligações peptídicas que podem chegar a milhares de aminoácidos (CARDOSO, 2018).

### 1.9.2 Extração

Existem dois métodos de terminação de proteína considerados oficiais pela AOAC e pela ANVISA, são o método de biureto (método direto) e o método de Kjeldahl (indireto). A reação de biureto caracteriza ligações peptídicas enquanto que Kjeldahl determina o teor de nitrogênio total (proteína total).

A proteína do leite é comumente expressa como proteína total ou proteína bruta, corresponde ao teor percentual de nitrogênio total (NT), sendo utilizado o fator de conversão 6,38, conseqüente do teor médio de 15,67% de nitrogênio nas proteínas do leite e que também será considerado para o suplemento (AOAC, 1999 )

### 1.10 Inorgânicos

Cada amostra possui em sua constituição uma porcentagem de produtos inorgânicos. A porcentagem de inorgânicos pode estar ligada a aminoácidos, proteínas, carboidratos ou ser adição de um conservante.

Em 1999 pesquisas de controle detectaram uma deficiência nacional de cobre, zinco, selênio e cobalto no sangue e no leite do gado brasileiro (ANVISA, 1999). Desde então muitos fazendeiros complementam a alimentação do rebanho com ração especial acrescida destas substâncias, além de cálcio e sódio.

### 1.10.1 Legislação

No Brasil os limites de metais potencialmente tóxicos na alimentação são declarados pela ANVISA, sendo cobre 5,0 mg/kg, cobalto 0,05mg /kg, selênio 0,05mg/kg , zinco 25mg/kg (ANVISA, 2012)

A presença de metais muitas vezes está associada à localização geográfica, seja na água ou no solo. Alguns metais pesados são micro contaminante ambientais que podem estar presentes no leite e por consequência no soro do leite devido a alimentação do gato, mas que possuem limites para sua presença nos alimentos, como Cádmio 0,05mg /kg, ,Cromo 0,05mg/kg , Estrôncio 0,02mg/kg, Manganês0,01mg/kg ,Molibdênio 0,01mg/kg .

### 1.10.2 Análise

ICP OES é usado para analisar diversos elementos simultaneamente e para níveis tão baixos quanto 1-10 partes por bilhão (ppb), o que é indicado para elementos de traços, em que o número de fótons produzido é diretamente relacionado à concentração desse elemento na amostra.

Na determinação de inorgânicos, serão contabilizados sódio, potássio, magnésio, cálcio, estrôncio, cobalto, cromo, estanho, ferro, selênio, zinco, molibdênio e manganês.

### 1.10.3 Compostos inorgânicos

O sódio é o elemento inorgânico mais presente em alimentos, de acordo com a ANVISA o consumo desta substância não pode ultrapassar as 2,0g/dia. Para ter o mesmo resultado que o sódio proporciona nos alimentos, muitas indústrias alimentícias utilizam o potássio ( $K^+_{(aq)}$ ) como um substituto, porém sua interferência no corpo humano é tão severa quanto o sódio (ANVISA, 2012).

O magnésio é um dos minerais mais abundantes no corpo humano e desempenha um papel fundamental em muitas das funções fisiológicas do organismo. O leite é uma das principais fontes alimentares de magnésio, tendo em media 11mg no leite e 8mg no soro do leite. Algumas empresas adicionam o magnésio na pasteurização do leite para auxiliar na redução da contaminação bacteriana e a deterioração (CARDOSO,2013).

O cálcio é o elemento inorgânico em maior quantidade no leite, no soro do leite está presente com 47mg/100mg. É um mineral essencial para a construção e

manutenção dos ossos e dos dentes, além de ser muito importante para a contração muscular e transmissão dos impulsos nervosos ( AVILA,2017).

Alguns metais são classificados como importantes para o bom funcionamento do corpo, são apenas adquiridos por alimentação. O ferro, zinco, cobre, cobalto e selênio são alguns destes exemplos, sendo que entre estes mencionados apenas o ferro não possui limite de acordo com a ANVISA.

Outros metais, mais pesados, podem ser detectados no soro do leite, mesmo não estando presentes na alimentação por ração ou suplementação do gado. São estes o cromo, cádmio, estrôncio, manganês e molibdênio. Se estes metais são encontrados em concentrações de traços, muito menores que o limite legal, é recomendado o estudo complementar da água e do solo em que estes animais fazem uso, para identificação de contaminação cruzada. (AVILA, 2017).

## **1.11 Cafeína**

### **1.11.1 Definição**

A cafeína é um composto orgânico da família dos alcalóides de nomenclatura oficial 1,3,7-trimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona, pertencente a classe de metilxantinas, sendo que a cafeína é um dos mais potentes dessa classe que incluem a teobromina e a teofilina.

A cafeína é, de acordo com a revista *New Scientist*, é a "droga psicoativa" mais popular. Nos Estados Unidos, estima-se que mais de 90% dos adultos a usam todos os dias. Em moderação, a cafeína pode ter alguns efeitos positivos, mas em excesso causa os mesmos problemas que qualquer outra droga ilegal, inclusive a abstinência (ALVES,2002).

Muitos consumidores de suplementos alimentares do tipo *Whey Protein* também fazem uso de cafeína comprimido como estimulante para a realização do treino o que somado as quantidades de cafeína de produtos diários podem ultrapassar o limite indicado como seguro pela ANVISA.



Figura 44- Representação da molécula de cafeína (ALVES, 2002).

### 1.11.2 Estudo da cafeína no corpo humano

Um estudo sobre os efeitos da cafeína na saúde humana indicou que seu consumo moderado (máximo de 4,6 mg/kg de peso), praticado por adultos saudáveis em idade reprodutiva, não está associado a efeitos adversos. (ALVES,2012).

Em regulamentação brasileira a adição de cafeína em produtos alimentares não é proibida desde que a informação da quantidade do produto esteja explícita no rótulo nutricional e na embalagem, não podendo exceder a quantidade limite de 240mg de cafeína por porção de alimento.

Os efeitos mais relatados da ingestão da cafeína podem ser descritos como aumento da capacidade de alerta e redução da fadiga, melhora no desempenho de atividades físicas, controle motor descontrolado, baixa qualidade do sono, irritabilidade, surtos de ansiedade e aumento da pressão arterial e arritmia cardíaca(BRENELLI,2003).

### 1.11.3 Quantificação

A quantificação e identificação da cafeína, por métodos oficiais, são realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. O método de extração e quantificação por solvente orgânico e com técnica gravimétrica só é recomendado para os casos de fármacos. (SAITO,2006).

As análises recentes da ANVISA detectaram a presença de cafeína em suplemento de *Whey Protein* concentrado, o que não era relatado em nenhum rótulo, por isso a importância em realizar esse teste. (IMETRO,2017)

## 2 Objetivo

Realizar o estudo de cinco marcas diferentes de Whey Protein concentrado e verificar suas adequações com a nova resolução da diretoria (RDC) Nº 239, verificando carboidratos, proteínas, lipídios, fibras e presença de cafeína.

## 3 Metodologia

Para realizar um estudo representativo de *Whey Protein*, foram selecionadas cinco marcas entre as quinze marcas mais consumidas de suplemento no Brasil de acordo com a pesquisa de (BRITO 2012).

A escolha do método de análise para cada classe de substância presente no suplemento considerou a disponibilidade de equipamentos e padrões para obtenção de resultados representativos que respeitassem os métodos oficiais de análise em alimentos.

Para escolha de cada método também foi considerado a quantidade relativa do componente analisado, composição química da amostra, especificidade e sensibilidade dentre os métodos considerados oficiais de análise de alimento disponíveis no laboratório.

A análise com repetição para cada amostra é aconselhável como uma margem de segurança entre os resultados. A realização de experimentos em triplicata foi escolhida por ser um número aceitável entre a precisão e o tempo de trabalho. O valor médio da triplicata é a melhor estimativa do teor do analito na amostra, enquanto que o desvio padrão é a estimativa do erro experimental em uma determinação, sendo que o erro padrão no valor médio da triplicata é menor pelo fator de  $1/\sqrt{3}$ . (PASSARI, 2011).

### 3.1 Pesquisa de Campo

O consumo de suplemento alimentar é crescente no país, a regulamentação de distribuição e compra é livre, não sendo necessário um receituário.

Considerando a lei 8.234 somente nutricionistas, nutrólogos e endocrinologistas poderiam indicar a quantidade e o formato de consumo de suplemento alimentar do tipo *Whey Protein*.

Para a avaliação sobre a relevância do projeto, foi desenvolvido um questionário online com seis perguntas (sexo, idade, praticante de atividade física regular, consumidor de suplemento alimentar, consumidor de suplemento alimentar do tipo *Whey Protein* e indicação do consumo de suplemento), com respostas anônimas devendo ser respondido no prazo de duas semanas em diferentes academias na cidade do Rio de Janeiro.

## Consumo de suplemento alimentares

Suplemento alimentar é qualquer substância ou complexo que seja utilizado para suprir as necessidades do corpo. Podem ser encontrados em farmácias, lojas especializadas, lojas verdes e até em programas de televisão.

<sup>A</sup>Obrigatório

Qual sexo você se identifica? \*

- Feminino
- Masculino
- Prefiro não dizer

Qual a sua faixa etária? \*

- 18-25 anos
- 26-35 anos
- 36-45 anos
- 46-60 anos
- mais que 61 anos

**Figura 45- Representação do questionário realizado neste trabalho**

Qual a sua frequência de atividade física semanal? \*

- nenhuma atividade
- 1-2 vezes na semana
- 3-5 vezes na semana
- mais que 6 vezes

Faz uso de algum suplemento alimentar ( whey protein, BCCA ,  
vitaminas, cafeína entre outros ) ? \*

- Sim
- Não

Faz uso de suplemento alimentar do tipo Whey protein ( whey protein  
concentrado , whey protein isolado , whey protein hidrolisado ) ? \*

- Sim
- Não

Quem fez a indicação do suplemento alimentar ? \*

- Nutricionista/ Endocrinologista/Nutrólogo
- Professor de academia/ Bacharel em educação física / Treinador /  
Personal trainer
- Amigos/Familiares
- Vendedor
- Auto indicação
- Não faço uso de nenhum suplemento alimentar

ENVIAR

Figura 46- Representação do questionário realizado neste trabalho

### 3.2 Umidade

Seguindo o método gravimétrico indireto, metodologia oficial Instituto Adolfo Lutz, foi utilizada uma estufa com termostato calibrado em 105°C, as amostras em triplicatas com 1g aproximadamente cada devendo permanecer por 6-8h em estufa ou até atingir peso constante.

Para a realização dessa análise foi necessário o uso de cadinhos de vidros, balança analítica, estufa com controle de temperatura e dessecador para descanso da amostra até poder ser pesada.

As pesagens devem ser realizadas com balança analítica e com as amostras em temperatura ambiente. As amostras devem permanecer em dessecadores até atingirem a temperatura ambiente, para que não sofram interferência pelo ambiente. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008)

### 3.3 Carboidratos

Para a realização da análise por DNS é necessário realizar uma curva padrão de algum açúcar redutor, sendo recomendada glicose ou frutose, em cinco concentrações diferentes. (0,2- 0,4- 0,6- 0,8 e 1,0 Mol/L).

Deverá ser preparada uma solução do suplemento, para cada triplicata, contendo 0,5g do suplemento para 250 ml de água MilliQ. A solução deve ser homogeneizada, devendo ser retirada uma alíquota de 2,00ml para um tubo de ensaio.

No tubo de ensaio com amostra de volume de 2,00ml, adicionar 1,00ml de solução de NaOH 30% e 5,00ml de DNS. O tubo deve ser aquecido em banho Maria por 5 minutos e resfriados. Deve-se adicionar 7,00ml de água ultra pura fria. O mesmo procedimento deve ser seguido para a curva padrão e para o branco.

As amostras devem ser lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 490 nm, sendo anotado o valor de absorvância. (FERNANDES, 2009).

### 3.4 Fibras

A fibra alimentar é composta, majoritariamente, de polissacarídeos de origem vegetal interligados entre si formando uma rede tridimensional. Teoricamente, compostos do tipo *Whey Protein* não possuem fibras devido ao seu processo de

produção, mas podem ser encontradas fibras caso seja utilizada para aumentar o volume do produto, resultado em uma adulteração.

Existem fibras insolúveis (celulose, hemicelulose, pectina e ligninas) e fibras solúveis (pectinas,  $\beta$ -glicanos, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses).

A análise indicada para determinação de fibra solúvel, insolúvel e total é o método enzimático-gravimétrico.

O processo começa com a hidrólise do amido e proteínas utilizando enzimas. As fibras vão precipitar e devem ser filtradas, secas em estufa e pesadas.

### **3.5 Lipídios**

O conteúdo lipídico é tradicionalmente determinado por métodos gravimétricos através da extração com solventes. Existem vários métodos para extração de lipídios, dentre eles, Soxhlet, hidrólise ácida e Bligh; Dyer são os métodos de extração dominantes para a avaliação do teor de lipídios em alimentos e ingredientes alimentícios (FREITAS,2017)(HYVÖNEN, 1996; XIAO et al., 2012).

Os tratamentos químicos e físicos utilizados para extração de lipídios devem removê-los de seus locais de ligação como membranas celulares, lipoproteínas e glicolipídeos. Além disso, os solventes utilizados para extração da gordura devem ter uma elevada solubilidade para todos os compostos lipídicos e ser suficientemente polar.

A extração com solvente a quente pode ser realizada com o equipamento de Soxhlet ou com o extrator de lipídios acoplado. O balão de fundo chato deve ser pesado em balança analítica junto com as bolas de vidro. Foi pesado próximo de 3g de amostra na cápsula de extração e o solvente utilizado é o éter de petróleo. A amostra completou um ciclo (cerca de 90 minutos de extração), parte do solvente pode ser recuperado. O excesso de solvente no balão foi retirado por evaporação em capela.

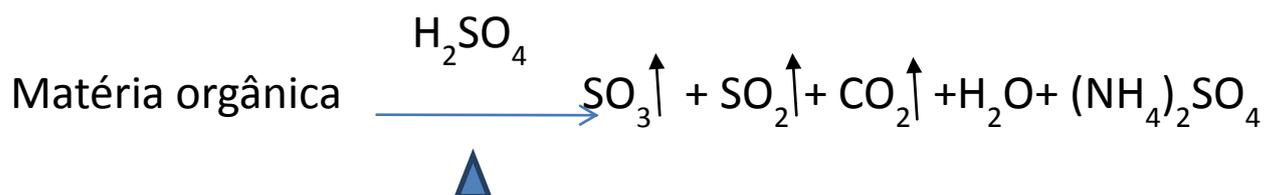
Os balões foram resfriados e pesados. A quantidade de lipídios corresponde à diferença entre as massas dos balões vazios e a massa depois da extração. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ,2008)

### **3.6 Proteínas**

O método de Kjeldahl baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com

liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada. Este método é dividido em três etapas principais: a digestão, destilação e titulação (MENDES, 2017).

**Digestão:** Aquecimento da amostra (0,5g) com ácido sulfúrico concentrado (5 ml) até que todo o carbono e hidrogênio sejam oxidados, utilizando o sal de sulfato de sódio ( eliminação da umidade da amostra) e sulfato de cobre penta hidratado (aumentar a velocidade da reação) como catalisador da reação. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio.



**Destilação:** Transformação do nitrogênio presente na solução na forma de sulfato de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) para  $\text{NH}_3$  gasoso. Com adição de NaOH concentrado e aquecimento, ocorre a liberação do amoníaco , que é separada da mistura por destilação. O gás então reage com uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio, que na presença do indicador Tashiro torna a solução azul-esverdeada.



**Titulação:** A etapa final consiste na titulação do borato de amônio com uma solução de ácido sulfúrico ou clorídrico padronizada. Não é necessário adição de indicador, pois a solução azul-esverdeada deve passar para roxo quando o ponto de equivalência da titulação for atingido.



### 3.7 Inorgânicos

O estudo e quantificação dos inorgânicos presentes nas amostras foram realizados em equipamento do tipo ICP-OES, devido à concentração ser de traço para muitos dos constituintes.

A primeira parte do processo é a abertura da amostra. Em um sistema de triplicatas, as amostra foram mensuradas com valores próximos de 2g cada em copos de digestores. Foram adicionados 5,00 mL de ácido nítrico concentrado e ácido clorídrico concentrado (1:1) e o sistema foi posto em aquecimento constante ate que

toda a matéria orgânica seja oxidada. Quando necessário, foi adicionado uma quantidade equivalente de ácidos nítrico e clorídrico na amostra.

A solução final apresentou coloração verde clara, neste caso levei a amostra até quase a secura e adicionei apenas 2,00 mL de ácido nítrico e retirei do aquecimento.

A solução presente em cada copo de digestor foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL quantitativamente.

A amostra presente no balão foi injetada no equipamento de ICP-OES sob as seguintes condições:

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição adotada</b>
<b>Potencia de Radiofrequência</b>	150 W
<b>Orientação da Tocha</b>	Modo Duo ( Axial e Radial)
<b>Rotação da bomba</b>	25 rpm
<b>Vazão do gás de nebulização</b>	0,57 L.min <sup>-1</sup>
<b>Vazão do gás auxiliar</b>	1,0 L.min <sup>-1</sup>
<b>Vazão do gás do plasma</b>	12 L.min <sup>-1</sup>
<b>Tempo de integração</b>	15s
<b>Câmara de expansão</b>	Ciclônica resistente a HF
<b>Nebulizador</b>	Burgener Mira Mist

Para o controle são realizados três positivos contendo sais de nitritos ou cloretos dos cátions que serão analisados para verificar possíveis perdas durante a abertura. Também foram realizadas uma triplicata de branco para analisar uma possível contaminação dos solventes (ASMES, 2015).

### 3.8 Cafeína

Para ser analisada é necessária a realização da extração da cafeína do suplemento alimentar. Foram pesadas amostras, em triplicatas de 0,02g aproximadamente, em tubos de ensaio. Para o padrão, 0,01g em um tubo de ensaio identificado como padrão e um tubo de ensaio foi identificado como branco que não será adicionado nenhum sólido.

Em todos os tubo de ensaio foram adicionados 5,00mL de água Milliq, 1,00 mL de solução de hidróxido de potássio 2M e 2,00 mL de TBME. (éter metil terc butílico).

As amostras devem ser centrifugadas por 20 minutos com 4000rpm. A fase orgânica deve ser transferida para um tubo seco com pipeta de Pasteur e ser evaporado em fluxo de nitrogênio por 15min. A amostra foi ressuspensa com 60 ul de metanol: água (70:30)(V:V) para fazer a injeção no HPLC

O HPLC foi utilizado seguindo os seguintes parâmetros :

Condições cromatográficas	
Coluna	C18
Comprimento de onda	272nm
Volume de injeção	20 µL
Vazão da fase móvel	1 mL/ min
Fase movel	Metanol:água (70:30)
Tempo de análise	15 min

A determinação da concentração da amostra foi dada pela integração dos picos utilizando uma solução padrão como referência para o cálculo da área. (AOAC,1997)(Welter,2018).

## 4 Resultados e discussões

### 4.1 Pesquisa de Campo

A pesquisa de mercado, quanto ao consumo do suplemento alimentar do topo *Whey Protein*, foi realizada nas academias do Rio de Janeiro, Ilha do Governador, entre os dias 7-10 de agosto de 2018. O questionário online foi preenchido por 1154 pessoas maiores de idade que freqüentaram as academias durante este período como alunos, professores ou visitantes.

Os dados recolhidos foram estudados e compuseram os seguintes gráficos:

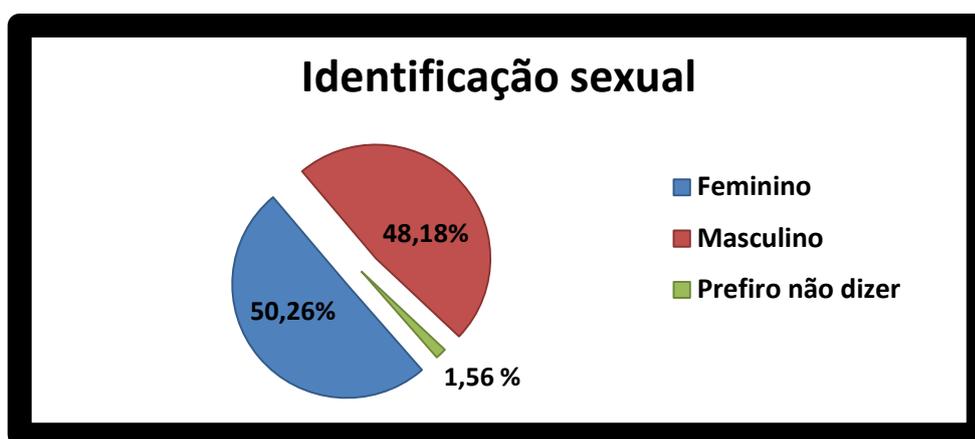


Gráfico 7- Identidade Sexual de consumidores de Whey Protein

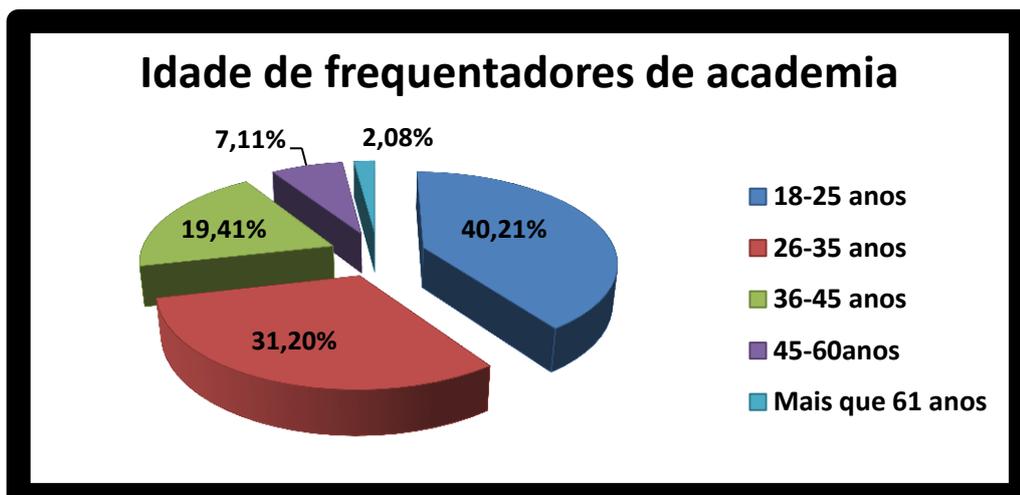


Gráfico 8-Relação da idade de frequentadores de academia

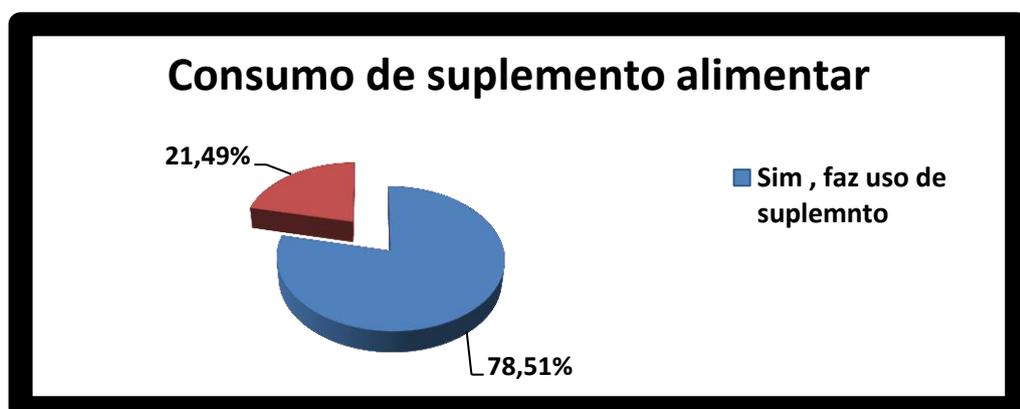


Gráfico 9- Relação da porcentagem de consumidores de suplemento alimentar em academias

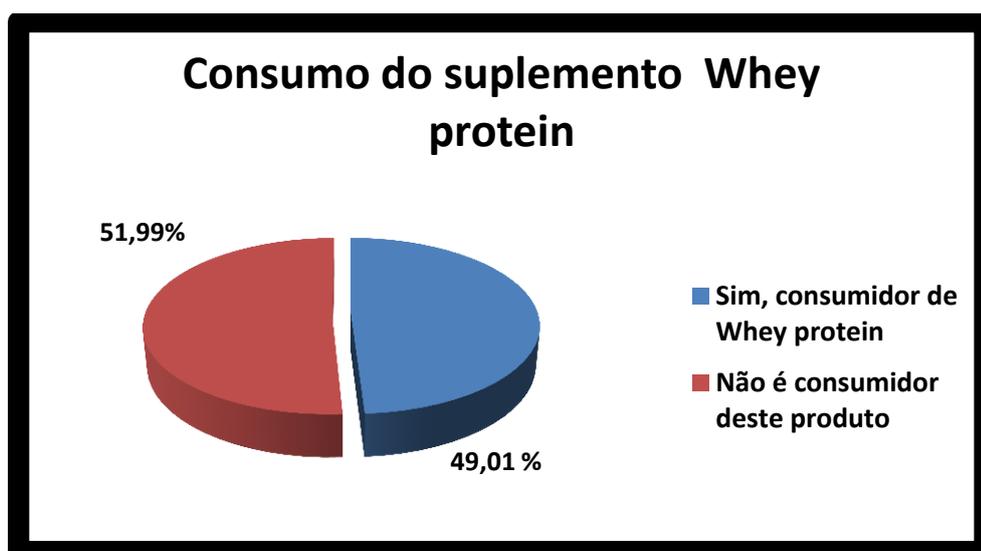


Gráfico 10- Relação de consumidores que fazem uso de suplemento do tipo Whey Protein

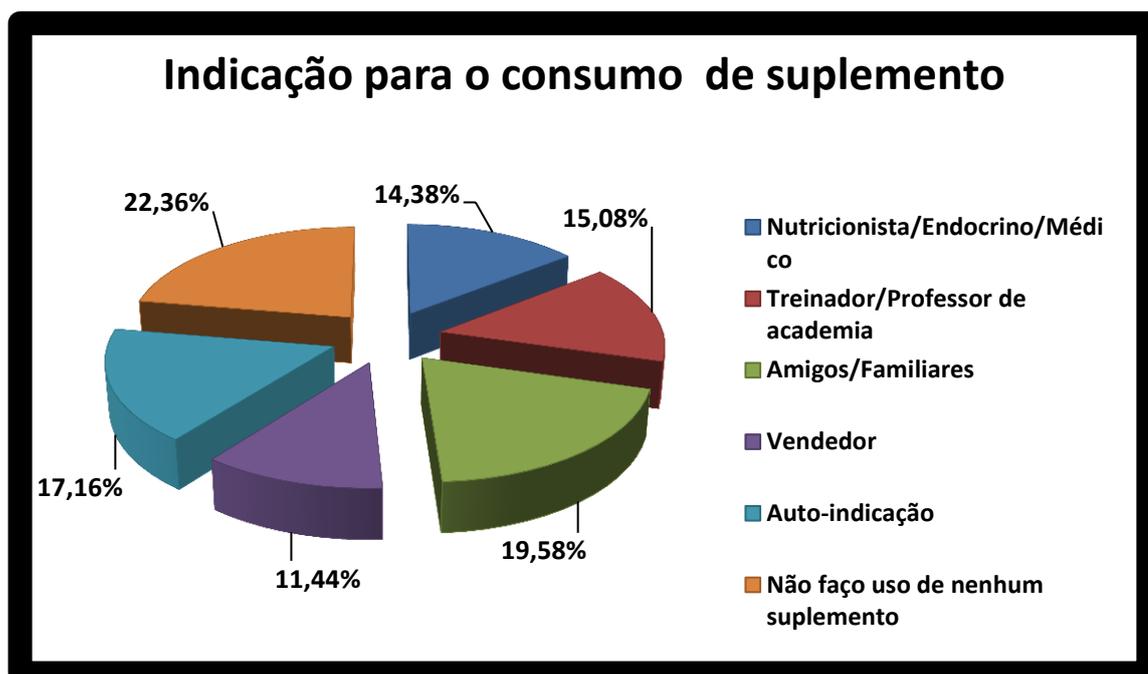


Gráfico 11- Relação da indicação para o consumo de Whey Protein

A pesquisa realizada para este trabalho vai ao encontro dos dados recolhido em bibliografia, em que a grande maioria dos consumidores de suplementos alimentares (63,26%) não faz uso por recomendação médica, como prevê a legislação brasileira, gráfico 5.

A maior parte de freqüentadores de academia são mulheres e o publico alvo majoritário é entre 18-35 anos.

Mais de 70% dos freqüentadores de academia fazem uso de algum tipo de suplemento alimentar, podendo ser cafeína, vitaminas, pós treinos entre outros. Entre os consumidores de suplementos alimentares variados (905 respostas), 49,01% é consumidor de suplemento alimentar do tipo *Whey Protein*.

O investimento financeiro aplicado para o consumo do *Whey Protein* varia entre 85-473 reais, dependendo da marca escolhida e o tipo de proteína (WPC, WPH, WPI).

## 4.2 Umidade

Não é obrigatória a indicação de umidade nos rótulos de produtos industrializados. A umidade é importante para aumentar a conservação de alimentos, o recomendado é que os alimentos tenham menos de 15% de umidade em sua constituição, (ANVISA, 2012).

No teste de umidade ocorre a perda de produtos voláteis e água. Alguns voláteis podem ser determinados com uma abertura da amostra em recipiente fechado e a água ligada será determinada por diferença de porcentagem no produto final, sendo quantificado somente a água livre e a água de adsorção.

Na regulamentação da ANVISA a água livre e a água de adsorção não são diferenciadas. O ensaio de atividade de água não foi realizado por falta de equipamento e por falta de necessidade desse tipo de análise para este trabalho. A atividade de água ( $A_w$ ) corresponde à água disponível para que microrganismos possam crescer e se desenvolver, portanto é uma análise essencial para o estudo de conservação do alimento, mas é opcional para o estudo de constituição do alimento.

As cinco marcas diferentes de suplemento foram identificadas como A, B, C, D, e E, Sendo que para cada marca foi realizado um ensaio em triplicatas sendo referidas no contexto como A-1, A-2, A-3, B-1, B-2, B-3, C-1, C-2, C-3, D-1, D-2, D-3, E-1, E-2 e E-3.

Para realizar o cálculo de umidade utilizamos da equação 3 e 4. A amostra em seu estado natural, como é comercializada, é dita como amostra úmida, enquanto que a massa depois do processo de estufa é dita como amostra seca.

#### Equação 16- porcentagem de umidade na amostra

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{Massa seca} - \text{Massa úmida}) \times 100}{\text{Massa úmida}}$$

#### Equação 17- Massa da amostra volatilizada no processo de determinação de umidade

$$\text{Massa seca} - \text{Massa úmida} = \text{Massa da Amostra Volatilizada}$$

Tabela 1- Teste de umidade

Umidade			
Amostra	Massa de amostra úmida (g)	Massa de amostra volatilizada (g)	Umidade (%) da amostra
A-1	1,0022	0,0581	5,80
A-2	1,0020	0,0582	5,81
A-3	1,0020	0,0579	5,78
B-1	1,0004	0,0699	6,99

<b>B-2</b>	1,0016	0,0694	6,93
<b>B-3</b>	1,0014	0,0696	6,95
<b>C-1</b>	1,001	0,0687	6,86
<b>C-2</b>	1,0016	0,0632	6,31
<b>C-3</b>	1,0013	0,064	6,39
<b>D-1</b>	1,0008	0,0669	6,68
<b>D-2</b>	1,0017	0,0706	7,05
<b>D-3</b>	1,0008	0,0667	6,66
<b>E-1</b>	1,0014	0,0589	5,88
<b>E-2</b>	1,0012	0,0592	5,91
<b>E-3</b>	1,0012	0,0591	5,90

Entre os suplementos alimentares estudados, todas as amostras apresentaram porcentagens de umidade próximas a valores encontrados em produtos lácteos liofilizados. Entre as triplicadas somente as marcas C e D apresentaram valores divergentes (C1 e D2) considerando a legislação RCD Nº 232 que indica que a diferença porcentual entre as amostra não deve ser maior do que 5%, portanto deveriam ser descartadas.

### 4.3 Carboidratos

A análise por espectrofotometria de UV-Vis necessita de uma curva de calibração. O ideal é utilizar um produto similar ao que esperamos encontrar na análise, no caso a glicose.

Em teoria a lactose é a substância mais abundante que deveria ser encontrada na classe de carboidrato do *Whey Protein* concentrado, porém o método de análise se baseia na reação em que a lactose em meio básico sofre uma reação, gerando uma molécula de glicose e galactose. (MORRISON,2011).

A curva analítica foi realizada utilizando o reagente de glicose padrão, com pureza de 99,9%, nas concentrações pré-determinadas na metodologia.

**Tabela 2- Curva analítica da solução de glicose**

<b>Curva Analítica</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Concentração(Mol/L)</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Absorbância real</b>
<b>Branco</b>	0	0,054	0
<b>1</b>	0,2	0,209	0,155
<b>2</b>	0,4	0,397	0,343
<b>3</b>	0,6	0,595	0,541
<b>4</b>	0,8	0,731	0,677
<b>5</b>	1	0,908	0,854

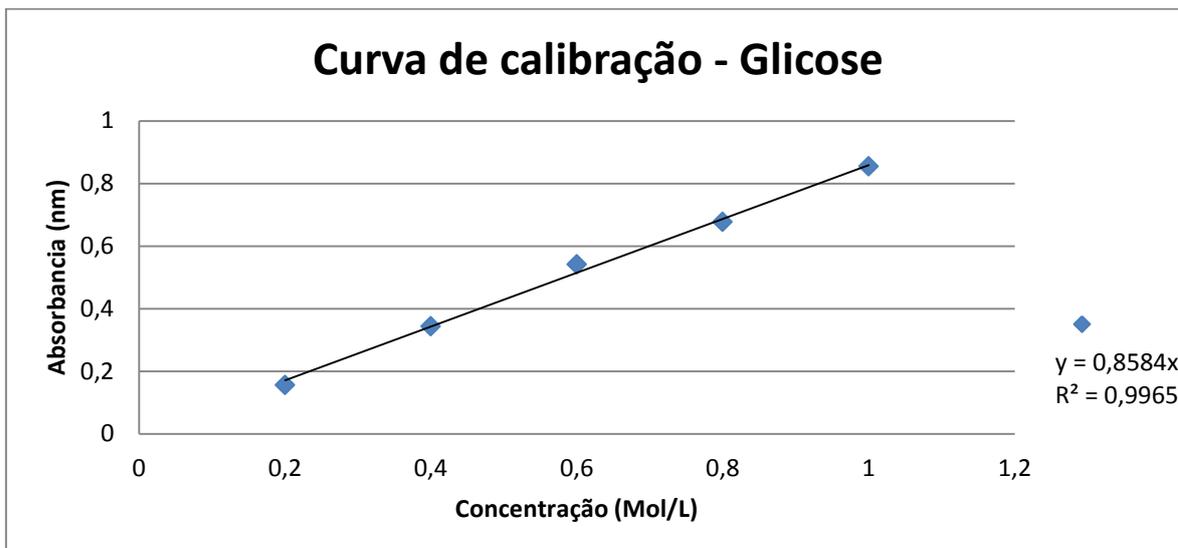


Gráfico 12- Curva de calibração da solução de glicose, comprimento de onda em 490nm:

Tendo como equação de reta;

**Equação 18- Equação da reta referente à curva da solução de glicose**

$$Y = 0,08584x \quad R^2 = 0,9965$$

O valor da absorvidade molar é único para cada substância e deve ser calculado utilizando a equação 6.

**Equação 19- Fórmula de absorvidade molar**

$$A = \epsilon \cdot c \cdot L$$

O tamanho da cubeta foi mantido durante toda a análise (1,00 cm) do material quartzo, portanto a absorvidade será dada como o coeficiente angular da reta – 0,8584 (L/mol. cm).

A concentração das amostras é calcula pela equação 7. A equação 8 é com o valor da absorvidade e tamanho da cubeta ajustados e que o valor de absorção, detectado no equipamento descontado o valor do branco( absorção real), deve ser substituído para que a concentração de carboidratos seja conhecida.

**Equação 20- Concentração prática de carboidratos da amostra**

$$\text{Concentração Prática} = \frac{A}{L \times E}$$

**Equação 21- concentração prática de carboidratos da amostra com o valor de absorvidade.**

$$\text{Concentração Experimental} = \frac{A}{0,8584 \text{ (L/mol*cm)}}$$

**Equação 22- Porcentagem de carboidratos na amostra**

$$\text{Carboidratos (\%)} = \frac{\text{Concentração Experimental} \times 0,25 \times 100}{\text{Massa da amostra analisada}}$$

Sendo que na equação 8, temos 0,25 como o volume do balão utilizado para o preparo da solução das amostras de carboidratos.

Os testes de açúcares são baseados em reações de óxido– redução pelo grupo hidroxílico hemiacetálico do monossacarídeo, que pode reagir com íons e formar complexos coloridos ou por reações coloridas provenientes da condensação de produtos de degradação dos açúcares em ácidos fortes com vários compostos orgânicos como fenol e antrona.

Os monossacarídeos são açúcares redutores, o teste de DNS (ácido dinitrossalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrossalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor.

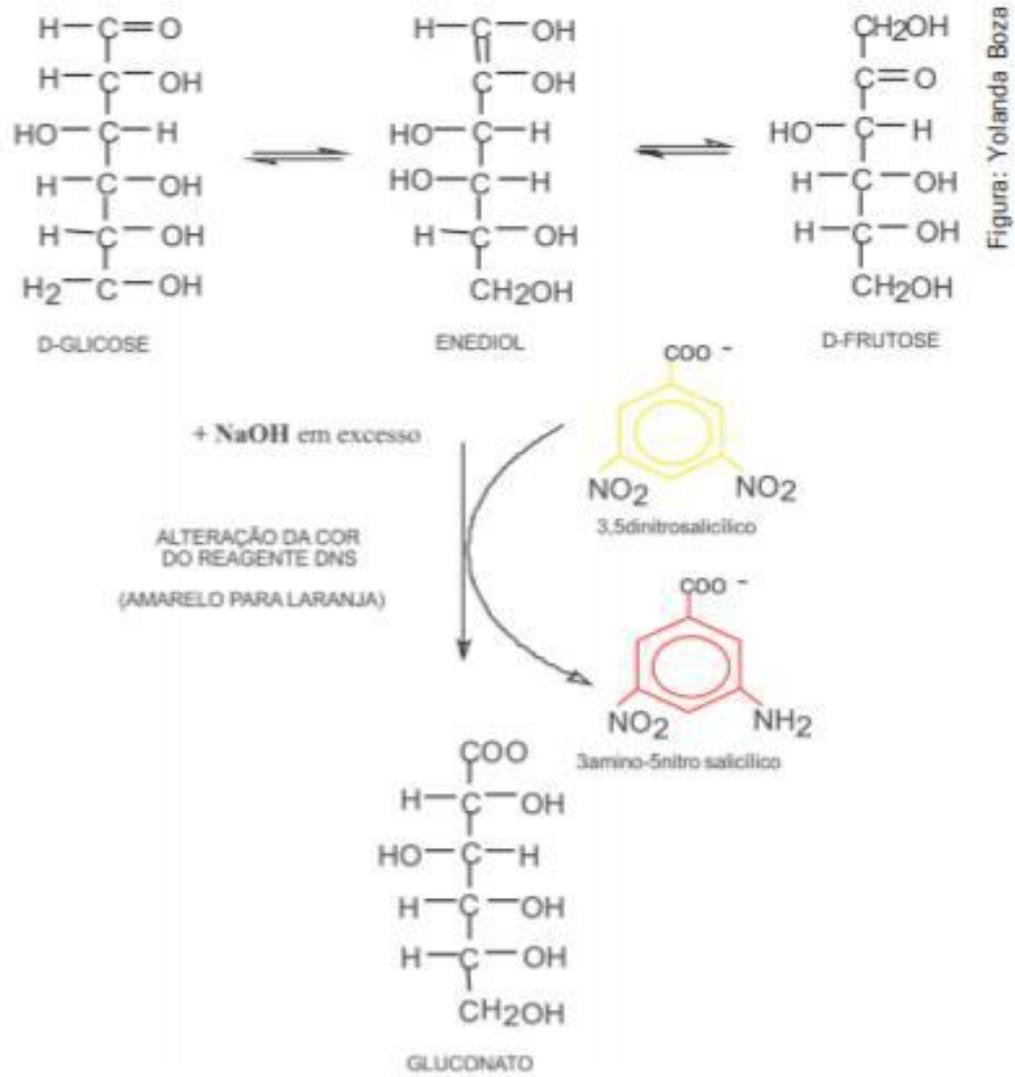


Figura 47- Reação de identificação do açúcar com DNS



Figura 48- Imagem da curva de calibração da solução de glicose antes de ser analisada em espectrofotômetro.

Tabela 3- Resultados experimentais de carboidratos

Carboidratos					
Amostra	Absorbância	Absorbância real	pH	Concentração prática	Carboidratos (%)
<b>Branco</b>	0,055	-	6,92	-	-
<b>A-1</b>	0,492	0,437	6,09	0,5091	63,01
<b>A-2</b>	0,496	0,441	6,09	0,5137	63,18
<b>A-3</b>	0,491	0,436	6,1	0,5079	63,49
<b>B-1</b>	0,549	0,494	6,2	0,4310	53,29
<b>B-2</b>	0,533	0,478	6,2	0,4287	53,27
<b>B-3</b>	0,531	0,476	6,3	0,4287	53,08
<b>C-1</b>	0,536	0,481	6,01	0,4438	54,80
<b>C-2</b>	0,536	0,481	6,05	0,4438	54,72
<b>C-3</b>	0,532	0,477	6,05	0,4392	54,65
<b>D-1</b>	0,581	0,526	6,31	0,4963	61,15
<b>D-2</b>	0,581	0,526	6,32	0,4963	61,09
<b>D-3</b>	0,58	0,525	6,35	0,4951	61,12
<b>/E-1</b>	0,527	0,472	6,00	0,4334	52,82
<b>E-2</b>	0,532	0,477	6,01	0,4392	52,86
<b>E-3</b>	0,519	0,464	6,05	0,4240	52,77

#### 4.4 Fibras

Tabela 3- Resultados da análise de Fibras

Amostras	Adição de NaOH (0,3 N)	Adição de HCl (0,5 N)	Adição de etanol 95%
A	-	-	-
B	-	-	-
C	-	-	-
D	-	-	-
E	-	-	-

Não foi qualificado detectado nem quantificado em nenhuma amostra, estando de acordo com o rótulo dos produtos.

Sua análise é importante para a verificação de amido presente na amostra. Em casos de amostras que são vendidas por peso do produto a adição de produtos com uma maior massa e sem nenhum fim alimentar é comum em alimentos. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.5 Lipídios

A quantidade de amostra próximo de 3 g deve ser pesada em capsula de algodão em balança analítica. Essa cápsula foi anexada no equipamento de extração lipídica. Por ser um estudo gravimétrico o copo de extração também deve ser pesado, pois é uma técnica de diferença de massas.

O solvente é evaporado do balão e a gordura por ser não ser volátil permanece no recipiente, para a realização da análise utilizou-se o solvente etoxietano com ciclo de 90 minutos para cada etapa do procedimento (extração e refluxo).



**Figura 49- Equipamento de extração de lipídios**

Utilizando a equação 10, podemos calcular a porcentagem de lipídios presente na amostra inicial.

**Equação 23- Porcentagem de lipídios da amostra**

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{\text{Massa de lipídios} \times 100}{\text{Massa da amostra}}$$

**Tabela 4- Resultados da análise de lipídios**

<b>Lipídios</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Massa inicial(g)</b>	<b>Massa de lipídios(g)</b>	<b>Lipídios (%)</b>
<b>Branco</b>	0	0,0001	0
<b>A-1</b>	3,024	0,1106	3,66
<b>A-2</b>	3,0238	0,1114	3,68
<b>A-3</b>	3,0269	0,1125	3,72
<b>B-1</b>	3,0037	0,527	17,55
<b>B-2</b>	3,0073	0,522	17,36
<b>B-3</b>	3,001	0,528	17,59
<b>C-1</b>	3,0057	0,1264	4,21
<b>C-2</b>	3,0004	0,1264	4,21
<b>C-3</b>	3,0011	0,1275	4,25

D-1	3,0017	0,168	5,60
D-2	3,0038	0,179	5,96
D-3	3,0008	0,181	6,03
E-1	3,0012	0,481	16,03
E-2	3,0063	0,482	16,03
E-3	3,0009	0,479	15,96

Somente a primeira triplicata da amostra D (D1), possui um desvio significativo quanto à porcentagem de lipídios, sendo superior a de 5% e não podendo ser utilizada para comparação com os valores teóricos de análise de acordo com a legislação RDC Nº 232.

#### 4.6 Proteínas

As proteínas são macromoléculas constituídas por uma cadeia ou mais de aminoácidos. Existem 23 tipos de aminoácidos que são classificados em grupos, sendo os aminoácidos essenciais os obtidos exclusivamente por alimentação de proteínas que os contenham.

A união estabelecida entre dois aminoácidos adjacentes numa molécula recebe o nome de ligação peptídica. Esse tipo de ligação ocorre sempre por meio da reação entre o grupo amina de um aminoácido e o grupo carboxila do outro.

No momento em que a proteína está sendo sintetizada e as ligações peptídicas estão se formando, o radical carboxila perde um grupamento –OH (hidroxila), deixando uma ligação livre. Simultaneamente, o radical amina de outro aminoácido perde um átomo de hidrogênio (–H), ficando, também, com uma ligação livre. Já que existem duas ligações livres, os aminoácidos tendem a se unir gerando uma molécula de água.

A reação de condensação (ou síntese por desidratação) para a formação da proteína ocorre efetivamente entre o carbono (C) de um aminoácido e o nitrogênio (N) do aminoácido vizinho, classificada como ligação covalente (C-N).

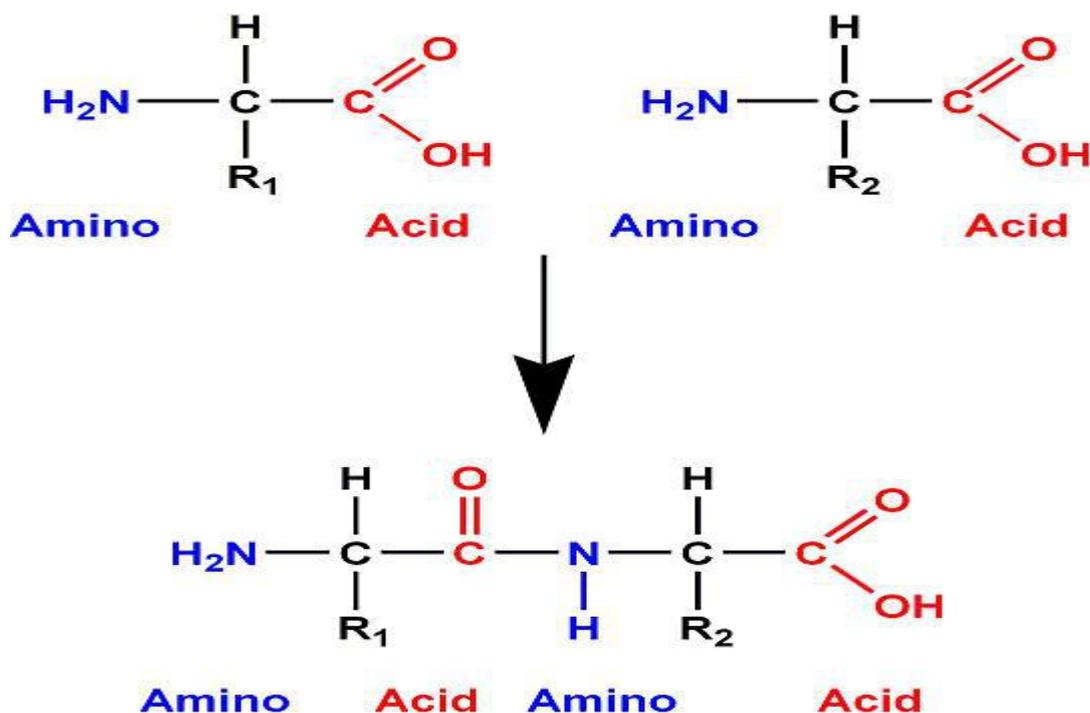


Figura 50- Formação de uma ligação peptídica (Purgatto, 2014).

A ligação peptídica apresenta uma estrutura planar. Para romper uma ligação peptídica, é necessário ocorrer uma hidrólise, dessa forma é possível identificar e quantificar os aminoácidos presentes nesta ligação.

Na reação de quantificação de proteína total opta-se por estudar a quantidade de nitrogênio na amostra e utilizar um fator de conversão para determinar a porcentagem de proteínas.

No método de Kjeldhal, durante a digestão da amostra como indica a figura 27, elimina-se quase que por completo a matéria orgânica, restando apenas amônio que formará um sal, sulfato de amônio, sendo que o nitrogênio do sulfato de amônio é proveniente das moléculas de aminoácidos. Em meio básico e com aquecimento ocorre o rompimento da protonação do o amônio, convertendo-se em amoníaco (NH<sub>3</sub>) que é um gás, sendo utilizado o equipamento da figura 29.

A reação do gás amoníaco em ácido bórico produz borato de amônio, que em contato com o indicador Tashiro visualmente apresenta uma cor verde. Durante a titulação com ácido clorídrico a solução torna-se roxa indicando o ponto de equivalência, como é exemplificado na figura 28. (Purgatto, 2014).

O indicador Tashiro pode ser adquirido pronto ou pode ser feito. O indicador é a mistura 2:1 dos indicadores vermelho de metil e azul de metileno. O indicador é

sensível para as variações de pH, sendo da cor verde para valores 5,8 ou maiores e roxo para pHs iguais ou menores que 4,4.



Figura 51- Digestão da amostra para análise de proteína



Figura 52- Faixa de cores do indicador Tashiro



Figura 53- Equipamento de destilação utilizado na técnica de proteínas

O ácido clorídrico padronizado ( $0,347\text{Mol/L}$ ) reage com o amônio na proporção 1:1, portanto com base na concentração do ácido clorídrico e na estequiometria da reação é possível estimar a concentração de amônio. O cálculo da porcentagem de

nitrogênio é realizado de forma direta por meio da equação 11, que contempla o volume de ácido utilizado, o fator do nitrogênio de 0,014 e a massa inicial da amostra, enquanto que a porcentagem de proteína é dada pela equação 12.

#### Equação 24- Determinação da porcentagem de nitrogênio nas amostras

$$\text{Nitrogênio (\%)} = \frac{\text{Volume de HCl} \times \text{Concentração HCl} \times 0,014 \times 100}{\text{Massa da amostra}}$$

#### Equação 25- Determinação da porcentagem do teor de proteínas nas amostras

$$\text{Teor de proteínas (\%)} = \text{Fator de nitrogênio} \times \text{Nitrogênio (\%)}$$

O fator de nitrogênio escolhido foi de 6,35, o mesmo utilizado para outros produtos lácteos em relatórios oficiais da ANVISA e Chemical Food. De acordo com a legislação vigente, podemos ter uma diferença percentual no alimento em cada categoria de 12% sem que o mesmo seja considerado irregular de acordo com RDC N° 232. Entre as marcas estudadas, apenas a amostra A encontra-se dentro da variação permitida por legislação. As demais marcas apresentam porcentagens muito inferiores com relação à dosagem de proteínas.

**Tabela 54- Resultados da análise de proteínas**

<b>Amostra</b>	<b>Massa inicial(g)</b>	<b>Volume de HCl (mL)</b>	<b>Nitrogênio (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>
<b>Branco</b>	0	0,1	0	0
<b>A-1</b>	0,5030	31,3	3,4586	22,0656
<b>A-2</b>	0,5026	31,5	3,4834	22,2243
<b>A-3</b>	0,5067	31,5	3,4552	22,0444
<b>B-1</b>	0,5006	38,1	4,2301	26,9882
<b>B-2</b>	0,5030	37,3	4,1215	26,2954
<b>B-3</b>	0,5006	37,3	4,1413	26,4215
<b>C-1</b>	0,5017	45,4	5,0296	32,0886
<b>C-2</b>	0,5001	45,4	5,0457	32,1913
<b>C-3</b>	0,5049	45,8	5,0417	32,1662
<b>D-1</b>	0,5000	38,3	4,2574	27,1624
<b>D-2</b>	0,5030	38,7	4,2762	27,2824
<b>D-3</b>	0,5002	38,3	4,2557	27,1515
<b>E-1</b>	0,5005	38,1	4,2310	26,9936
<b>E-2</b>	0,5002	38,4	4,2668	27,2224
<b>E-3</b>	0,5001	38,4	4,2677	27,2279

## 4.7 Inorgânicos

Uma amostra para ser determinada no equipamento ICP OES é necessário um pré-tratamento, que recebe o nome de abertura, para que não haja acúmulo de material orgânico no equipamento.

Neste estudo foi utilizada uma abertura com uma mistura de ácido nítrico e clorídrico concentrado. A digestão com aquecimento faz com que toda a matéria orgânica transforme-se em gás e água, mantendo somente os analitos inorgânicos em uma solução ácida.

Durante a abertura há um risco considerável de contaminação ou perda do analito, conduzindo assim a resultados inexatos ou “suspeitos” . Para este controle, foi realizada uma abertura com uma mistura de sais que continham os analitos de interesse em concentração conhecida nomeadas de ” P+”.

A análise em ICP-OES fornece os resultados em concentração de miligramas por litro, na tabela 6 compreendem os resultados do branco em triplicata (Br- teste dos reagentes utilizados), os valores das triplicatas de amostra positiva (P+, amostras com o acréscimo intencional de sais) e os resultados das amostras.

No anexo 4, temos os resultados tratados. O tratamento de dados consiste em descontar das amostras os valores das médias dos brancos e multiplicar a concentração da amostra pela porcentagem média de perda dos analitos, como indicado na equação 13. Sendo CRA a concentração real de analitos, CAE a concentração do analitos experimentais, MCTB a meda da concentração das triplicatas do branco e o PMP porcentagem média dos positivos.

### Equação 26- Concentração real dos analitos

$$CRA = (CAE - MCTB) \times PMP + (CAE - MCTB)$$

A tabela 6 apresenta os valores em miligramas indicado no rótulo dos suplementos e o redimensionamento para a quantidade de amostra que foi utilizado para esta análise.

Os resultados finais são indicados na tabela 8, em que são apresentadas as porcentagens das diferenças entre o teórico (rótulo dos suplementos) e os valores encontrados durante a análise em ICP-OES.

Em algumas amostras a diferença é maior do que 300%, porém nenhuma amostra apresentou em sua constituição valores superiores aos limites de metais pesados da legislação vigente. (ANVISA, 2012).

**Tabela 6- Dados teóricos da análise de ICP-OES**

Valores teóricos	A	B	C	D	E
Mg (mg)	0,0383	0,2702	0,3549	0,1715	0,2251
Ca (mg)	5,6008	17,4157	10,71289	15,896	12,5682
Cd (mg)	0	0	0	0	0
Co (mg)	0	0	0	0	0
Cr(mg)	0,0917	0,2803	0,335585	0,183	0,3439
Cu (mg)	0,0017	0,0038	0,00871	0,0065	0,0067
Fe(mg)	0,0867	0,2152	0,1484316	0,1029	0,1688
K(mg)	1,3502	3,2029	3,355845	2,4016	2,3135
Mn(mg)	0,006	0,0155	0,02259	0,02	0,0231
Mo(mg)	0,0001	0,0003	0,0004324	0,0004	0
Na(mg)	7,4678	1,126	3,0331	1,4867	1,3131
Se(mg)	0,0001	0,0004	0,000329	0,0002	0,0002
Sr(mg)	0,0001	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
Zn(mg)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002

**Tabela 7- Dados experimentais tratados**

Médias experimentais	A	B	C	D	E
Mg (mg)	0,1721	0,3466	0,3349	0,2685	0,2704
Ca (mg)	37,1438	36,7949	34,375	38,0937	33,5434
Cd (mg)	0	0,0011	0	0,0004	0,001
Co (mg)	0	0	0	0	0
Cr(mg)	0,0106	0,0162	0,0184	0,0187	0,0152
Cu (mg)	0,0227	0,031	0,0275	0,0129	0,0285
Fe(mg)	0,4002	0,1817	0,305	0,1226	0,26
K(mg)	45,2845	54,4051	67,3388	52,0203	45,6326
Mn(mg)	0,0498	0,0148	0,0267	0,0023	0,0027
Mo(mg)	0,0033	0,002	0,0053	0,0038	0,0003
Na(mg)	30,5764	21,3909	43,1892	23,0983	16,6076
Se(mg)	0,4729	0,0731	0,0351	0,0284	0,0318
Sr(mg)	0,0484	0,0356	0,0446	0,0277	0,0366
Zn(mg)	0,244	0,085	0,1206	0,0822	0,2311

Tabela 8- Diferença entre os dados teóricos e experimentais

Diferença (%)	A	B	C	D	E
Mg (mg)	348,9952	28,250253	-5,6474249	56,505902	20,139537
Ca (mg)	563,182	111,2751	220,8747	139,6425	166,8919
Cd (mg)	0	0	0	0	0
Co (mg)	0	0	0	0	0
Cr(mg)	-88,4606	-94,2105	-94,5283	-89,7772	-95,5659
Cu (mg)	1220,4	726,192	215,505	98,3866	326,33
Fe(mg)	361,75129	-15,577126	105,5101	19,084106	54,023689
K(mg)	3253,906	1598,63	1906,613	2066,104	1872,415
Mn(mg)	729,702	-4,4276	18,3194	-88,632	-88,358
Mo(mg)	2810,1722	500,51923	1121,6581	962,18055	1572,7636
Na(mg)	309,44397	1799,7068	1323,896	1453,6802	1164,7693
Se(mg)	545489	20180,87	10568,09	14113,86	14452,39
Sr(mg)	60340,2	17716,8	22184,4	13759	18199,8
Zn(mg)	406571	141647	120508,6	102598,2	115458,3

#### 4.8 Cafeína

Para ser analisada em HPLC, com os parâmetros definidos em metodologia, a cafeína precisa ser extraída da amostra por desprotonação com solução de hidróxido de potássio e posterior extração com o solvente TBME.

A desprotonação da cafeína faz com que a molécula se torne quase que insolúvel em água e altamente solúvel no solvente orgânico.

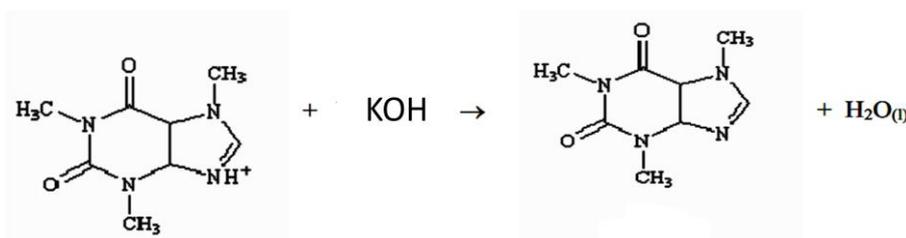
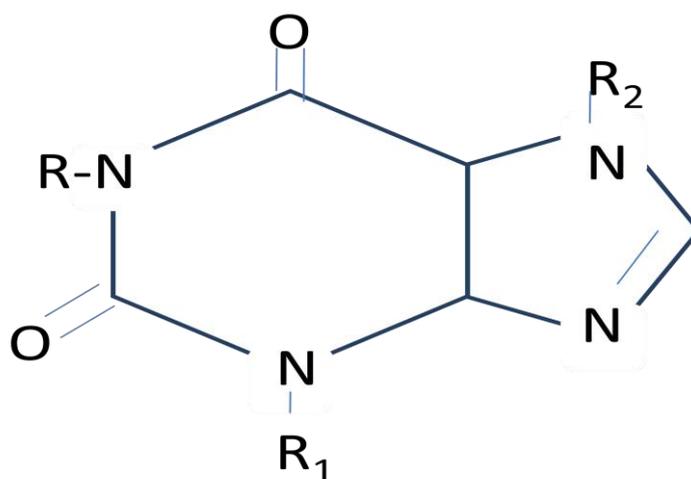


Figura 54- Reação de desprotonação.

Classes de substâncias com efeitos similares a cafeína (metilxantinas) também são extraídas para o solvente orgânico, visto que sofrem a mesma reação.



1-Cafeína:  $R=R_1=R_2=CH_3$

2-Xantina:  $R=R_1=R_2=H$

3-Teofilina:  $R=R_1=CH_3; R_2=H$

4-Teobromina:  $R=H; R_1=R_2=CH_3$

**Figura 55- Estruturas de metilxantinas**

Por ser uma análise comparativa é necessário utilizar uma solução padrão para que se possa estabelecer uma relação entre área do pico gerado pela análise em HPLC e a concentração real da amostra.

Na a injeção foi escolhido um padrão da marca Haber, que gerou os seguintes dados do cromatograma:

**Tabela 9- Resultados do cromatograma da injeção do padrão cafeína, teofilina e teobromina.**

Pico	Tempo (min)	Área	Concentração (ppm)
1	3.324	355453	10
2	4.171	325531	10
3	5.931	259389	10

Sendo o pico 1 a teobromina, pico 2 teofilina e o pico 3 a cafeína, figura 32. Cada pico no cromatograma possui um espectro de absorção único, sendo o espectro de absorção da cafeína em 272nm sendo representado na figura 33.

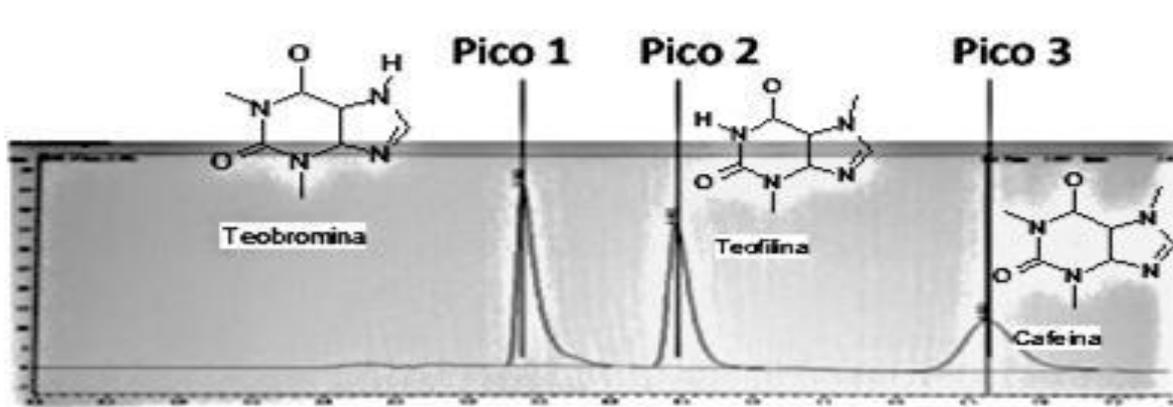


Figura 56- Cromatograma do padrão

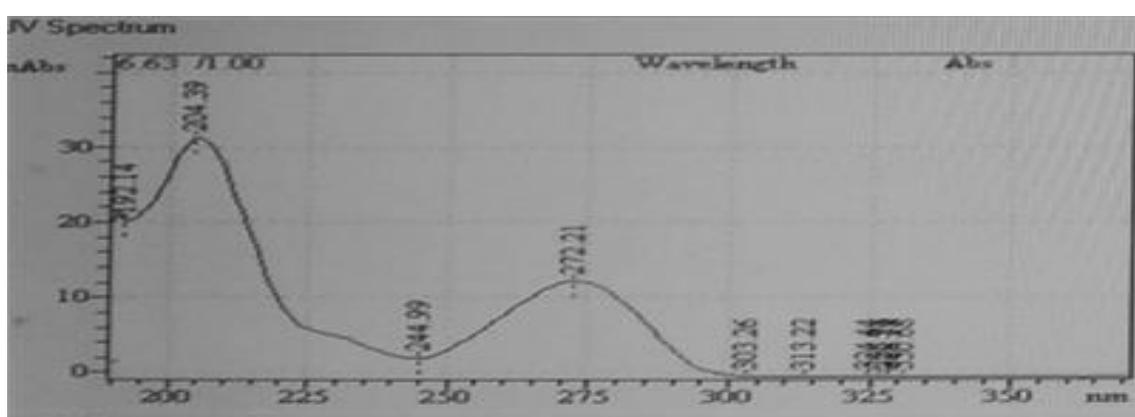


Figura 57- Espectro de absorção do pico de padrão de cafeína no comprimento de onda 272nm

#### 4.8.1 Tabela de resultados

Tabela 10- Valores do cromatograma das amostras

Amostra	Presença de cafeína	Área do pico	Tempo (minuto)	Concentração (ppm)
Branco	-	-	-	-
Padrão	+	259389	5,931	10
A-1	+	16258626	6,156	626,8048
A-2	+	17054593	5,935	657,4910
A-3	-	-	-	-
B-1	-	-	-	-
B-2	+	9094516	6,091	350,6130

<b>B-3</b>	+	9336574	9,213	359,9449
<b>C-1</b>	+	129312	5,965	4,9853
<b>C-2</b>	+	131888	5,884	5,0846
<b>C-3</b>	+	128948	10,337	4,9712
<b>D-1</b>	-	-	-	-
<b>D-2</b>	+	126790	5,28	4,8880
<b>D-3</b>	+	127466	9,541	4,9141
<b>E-1</b>	+	19226141	5,672	741,2088
<b>E-2</b>	+	19597010	8,758	755,5066
<b>E-3</b>	+	19230153	7,208	741,3635

#### 4.8.2 Cromatogramas

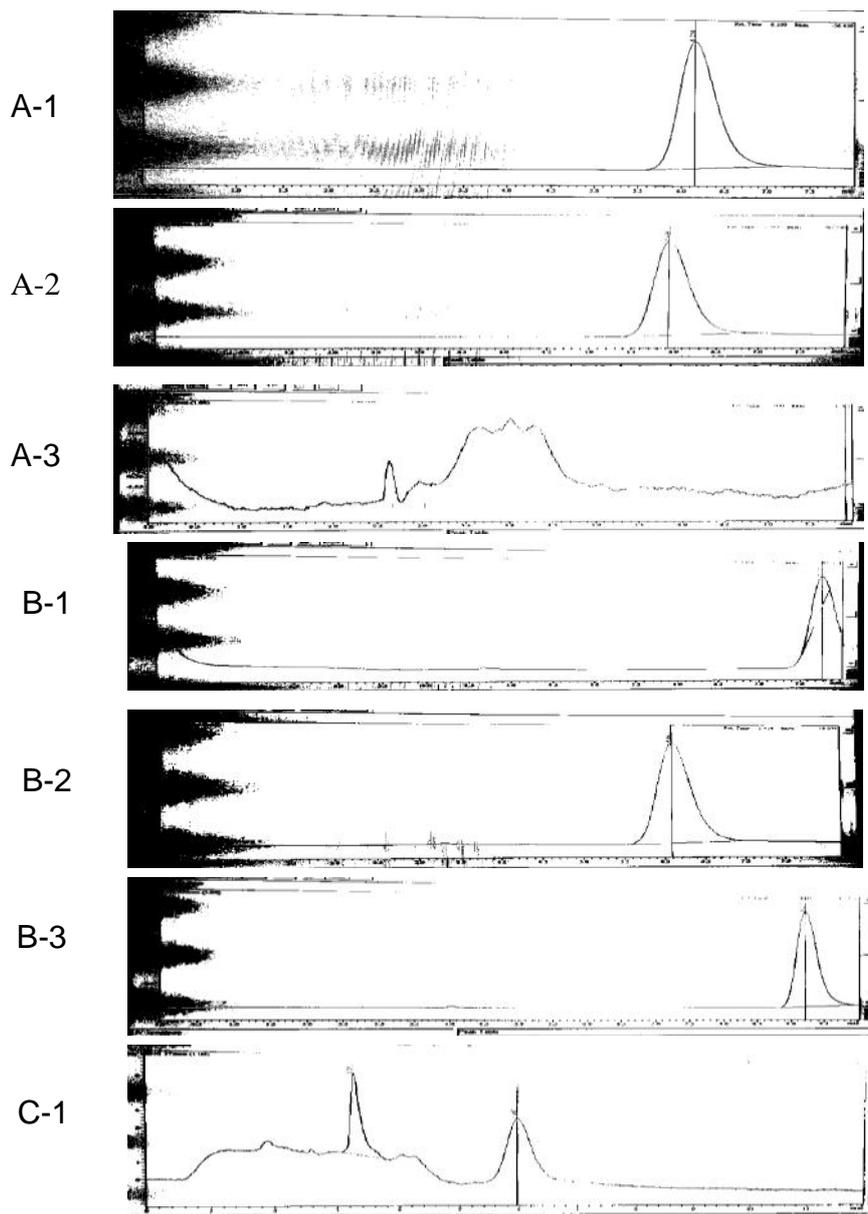
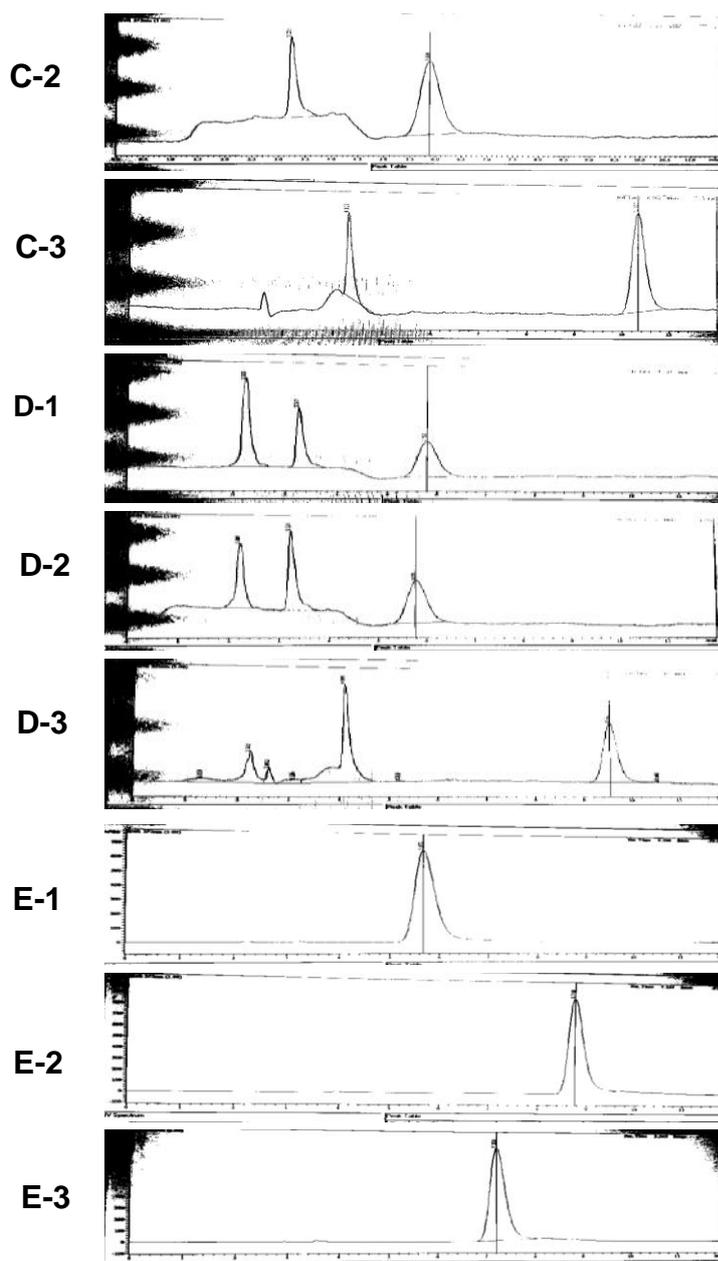


Figura 58- Cromatograma das amostras (1)



**Figura 59- Cromatograma das amostras (2)**

A amostra A-3, B-1 e D-1 não apresentaram picos definidos ou que tivessem espectros de absorção compatíveis com o da cafeína, portanto não foi realizada a integração da área de nenhum pico.

Amostras A-1,A-2,B-2,B-3,E-1,E-2 e E-3, apresentaram cromatogramas com picos únicos, bem formados e com espectros totalmente compatíveis entre si e com o padrão.

O pico da amostra B-1 não foi integrado pois a análise terminou antes que o pico fosse completamente formado. A extrapolação da integração da sua área não

representaria adequadamente a concentração de cafeína nessa amostra. A amostra A-3 foi desconsiderada por apresentar um cromatograma e um espectro de absorção não definidos para a cafeína.

C-1, C-2, D-1, D-2 e D-3 apresentaram cromatogramas compatíveis entre si, porém bem diferentes das demais amostras. Os espectros de absorção referentes ao último pico foram iguais aos do padrão. Provavelmente a amostra apresenta uma mistura de metilxantinas ou outra substância por isso a presença dos primeiros picos do cromatograma.

#### 4.9 Quantificação geral da amostra

Tabela 11- comparação teórica e experimental de carboidratos

Amostra	Carboidrato (%) experimental	Carboidrato (%) teórico	Diferença
A	63,22	63,31	9,00
B	53,21	9,75	445,74
C	54,72	12,90	324,18
D	61,12	11,71	421,94
E	52,82	10,31	412,32

Tabela 12- Comparação entre a porcentagem teórica e experimental de proteína nas amostras

Amostra	Proteínas (%) experimental	Proteínas (%) teóricas	Diferença
A	22,11	25,83	14,40
B	26,56	77,9	65,90
C	32,15	77,41	58,46
D	27,19	71,42	61,92
E	27,15	75,00	63,80

Tabela 13- Comparação entre a porcentagem teórica e experimental de lipídios

Amostra	Lipídios (%) Experimental	Lipídios (%) teórica	Diferença
A	3,69	2,83	30,38
B	17,50	11,00	59,09
C	4,22	6,45	34,57
D	5,86	6,57	10,80
E	16,00	11,56	38,40

Tabela 145- Valores do rótulo dos produtos

Amostra	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	Inorgânicos	Umidade	Total
A	25,83	2,83	63,31	0,000878	-	91,97

<b>B</b>	77,90	11,00	9,75	0,00045	-	98,65
<b>C</b>	77,41	6,45	12,90	0,000279	-	96,76
<b>D</b>	71,42	6,57	11,71	0,000354	-	89,70
<b>E</b>	75,00	11,56	10,31	0,000271	-	96,87

abela  
15-

Valores médios do produto considerando as análises realizadas

Amostra	Proteínas	Lipídios	Carboídratos	Inorgânicos	Umidade	Total
<b>A</b>	22,11	3,69	63,22	0,0007	5,79	94,81
<b>B</b>	26,56	17,50	53,21	0,0011	6,95	104,22
<b>C</b>	32,15	4,22	54,72	0,0009	6,35	97,44
<b>D</b>	27,19	5,86	61,12	0,0010	6,67	100,84
<b>E</b>	27,15	16	52,82	0,0008	5,89	101,86

#### 4.10 Embalagem do produto

Para que a embalagem esteja de acordo com a legislação brasileira deve apresentar todas as informações nutricionais, informação de substâncias coadjuvantes, indicação de corante, ingredientes, responsável técnico, nome da empresa, data de validade, lote, modo de conservação do produto, modo de uso do produto, número de contato da empresa e localização da indústria (ANVISA, 2012).

Quando qualquer um destes itens está em desacordo com a legislação o produto pode ser confiscado pela vigilância sanitária, além da empresa e do comerciante poderem receber uma multa.

Tabela 16- Conformidade do Rotulo dos produtos

Requisitos	A	B	C	D	E
<b>Informação nutricional</b>	-	-	-	-	-
<b>Substancia coadjuvantes</b>	-	-	-	-	-
<b>Corante</b>	+	+	+	-	+
<b>Ingredientes</b>	-	-	-	-	-
<b>Responsável técnico</b>	+	+	+	+	+
<b>Nome da empresa</b>	+	+	+	+	+
<b>Data de validade</b>	+	+	+	+	+
<b>Lote</b>	+	+	+	+	+
<b>Modo de conservação</b>	+	-	-	+	+
<b>Modo de uso do produto</b>	-	-	-	-	-
<b>Contato da empresa</b>	+	+	+	+	+
<b>Localização da empresa</b>	+	+	+	-	-

## 5 Conclusão

O estudo do perfil de freqüentadores de academia, demonstrou uma maior proporção de mulheres, sendo que a faixa de idade de freqüentadores é maior entre 18-35 anos. O perfil de consumidores de algum tipo de suplemento alimentar supera

os 70% =, sendo que 49,01% destes consumidores fazem uso de algum tipo de suplemento do tipo *Whey Protein*. Assim como nas pesquisas de BRITO entre 2013 e 2016, a indicação incorreta de consumo de suplemento alimentar é muito superior ao da indicação médica, estando então de desacordo com a lei 8.234.

Todas as amostras apresentaram irregularidades no mínimo em um quesito analisado neste trabalho.

Em relação às quantidades de proteínas, que é o principal motivo do consumo deste produto, as amostras se apresentaram inadequadas, pois apresentaram valores muito menores em porcentagem de proteína do que as informadas nas embalagens, sendo a exceção à marca A.

Como era o esperado, a diferença negativa encontrada na classe de proteínas, foi quase que o mesmo encontrado na diferença positiva da quantidade de carboidratos nas amostras. Essa diferença não pode ser considerada adulteração somente com base na análise destes lotes, pois todas as alíquotas pertencem ao mesmo lote. A quantidade de carboidrato fora da referência pode ser um erro durante as filtrações do processo de produção do suplemento.

Para caracterizar adulteração de produtos, vários lotes do mesmo deveriam ser estudados e sendo encontrados valores padronizados entre as análises. Quando é realizada uma análise e irregularidades são encontradas a empresa recebe um aviso, se as irregularidades persistirem a empresa deverá ser multada sendo órgão responsável por isso o IMETRO respeitando a legislação imposta pela ANVISA.

A quantidade de lipídios teve pequenas flutuações em relação ao esperado, também podem estar ligadas a um erro no processo de separação de proteínas, gordura e água da produção de *Whey Protein* ou na produção do soro leite. A identificação de lipídios presentes na amostra, análise em HPLC, poderia fornecer uma indicação de onde ocorreu o erro na produção do suplemento.

O estudo de fibras durante este trabalho foi ao encontro do declarado no rótulo dos produtos, ou seja, não apresentaram quantidades significativas de sua presença no suplemento utilizando a técnica de enzimo-gravimétrica.

A análise de inorgânicos apresentou resultados alarmantes. Amostras com mais de 300% de variação em relação à descrição do rótulo. Mesmo extrapolando os valores encontrados para a quantidade indicada de consumo deste suplemento (60g/dia),

nenhum analito de nenhuma amostra ultrapassa valores descritos como limites pela ANVISA, não sendo prejudiciais para a saúde.

Alguns analitos apresentaram valores mais discrepantes, como o sódio, potássio, zinco e molibdênio.

O sódio e o potássio são importantes reguladores no organismo humano, muitas empresas diminuem a presença de sódio em seus alimentos devido a grande popularidade negativa do mesmo, porém para compensar o efeito de conservante o sódio é substituído por potássio.

O potássio teve uma das maiores variações entre os valores teóricos e os práticos. A maior parte da população desconhece os efeitos malignos deste analito na corrente sanguínea, passando assim, despercebido a grande massa de consumidores.

O molibdênio possui limite de consumo por ser um metal potencialmente tóxico, mas também é importante para metabolismo humano. É presente em solos e plantas, podem compor rações de animais devido a sua importância de diminuir o acúmulo de sulfitos e toxinas, importantes para a qualidade do leite bovino.

A presença de cafeína não é proibida em alimentos e suplementos alimentares, tão pouco se exige receita médica para o seu consumo, mas existe a obrigação de indicação visual e descritiva na embalagem e rótulo do produto, respectivamente, quando presente.

Foram utilizados *Whey Protein* com base de baunilha, evitando qualquer possibilidade de positivo de teobromina devido à presença de cacau nas amostras, mesmo assim as amostras em quantidades bem diferentes indicaram a presença de cafeína durante o estudo no HPLC.

As concentrações de cafeína, determinadas pela análise em HPLC, variaram de 5ppm até 300ppm entre as amostras avaliadas.

A divergência dos tempos entre os picos de uma mesma amostra foi um erro do equipamento que apresentou variação de fluxo de solvente durante a análise, erro que pode ser corrigido utilizando outro equipamento, mas que não compromete a identificação da cafeína, visto que sua identificação utilizou além da correspondência do cromatograma, a correspondência do espectro de absorção no comprimento de onda 272 nm.

De acordo com a pesquisa (ZANARDO, 2018), 6,4% de usuários de suplementos fazem uso de cafeína. O consumo combinado do suplemento de cafeína e

do suplemento de *Whey Protein* com cafeína podem causar arritmia cardíaca, descontrole emocional e físico, irregularidades de sono entre outros.

Na tabela 17 pode-se observar que nenhuma amostra está em conformidade total, sendo o sinal negativo inconformidade e o positivo conformidade.

Tabela 17- Conformidade geral das amostras

Amostra	Carboidratos	Proteínas	Lipídios	Fibras	Inorgânicos	Cafeína
A	+	+	-	+	-	-
B	-	-	-	+	-	-
C	-	-	+	+	-	-
D	-	-	+	+	-	-
E	-	-	-	+	-	-

Entre as marcas analisadas e os seus resultados experimentais a amostra A é mais indicada para o consumo, por apresentar maior regularidade entre o indicado no rótulo do produto e os resultados determinados neste estudo.

O aumento do consumo de alimentos do tipo *Whey Protein* cresceu na mesma proporção que a sua produção. Marcas novas surgem todos os dias no mercado e o controle destas vendas e qualidade dos produtos são ineficientes.

A legislação criada em julho de 2018 para a classe de suplementos foi de grande importância, mas é necessário que o seu controle seja rígido para que tenha efeitos positivos. As marcas que produzem ou revendem suplementos alimentares, devem condicionar os seus produtos as novas regras até julho de 2023, para que não sejam multadas ou proibidas temporariamente de realizar a distribuição do produto, garantindo o direito ao consumo de produtos sem adulterações.

## 6 Bibliografia

AIR PRODUCTS, Aplicações em laboratórios de análise.plasma por acoplamento indutivo (ICP) e ICP com espectrômetro de massa (ICP-MS), 2018. <<https://www.airproducts.com.br/industries/inductively-coupled-plasma-icp-analytical-laboratories.asp3d>>. Acesso em 29 de julho de 2019.

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,

v.38, n.2, p. 237-243, abril/jun.,2002.

ALVES, MAURA PINHEIRO. MOREIRA, RENAM DE OLIVEIRA, JÚNIOR, PAULO HENRIQUE RODRIGUES. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. doi: 10.14295/2238-6416.v69i3.341.2013

ALVES, SHIRLEI CRISTIANE RODRIGUES; NAVARRO, FRANCISCO. O uso de suplementos alimentares por frequentadores de academias de potim-sp. Revista Brasileira de Nutrição Esportiva, São Paulo. V. 4, n. 20, p. 139-146, março/abril. 2010.

ATKINS, P and JONES, Loretta (1997). Chemistry:Molecules,matter and change, 3rd ed, ed W.H.Freeman New York.

ANVISA, Portaria nº 19, de 15 de março de 1995, Diário Oficial da Nação.

ANVISA, Instrução normativa, nº28, 26 de julho de 2018, Diário oficial da união.

ANVISA, Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 243, de 26 de julho de 2018,Diário oficial da união .

ANVISA, Resolução da diretoria colegiada RDC nº 239, de 26 de julho de 2018,Diario oficial da união.

ANVISA, Resolução da diretoria colegiada RDC nº 242, de 26 de julho de 2018,Diário oficial da união.

ANVISA,Resolução da diretoria colegiada, nº144, 27 de julho de 2018, Diário Oficial da União.

ANVISA, Resolução da diretoria colegiada, nº18, 27 de abril de 2010, Diário Oficial da União.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC international. 16th Ed. Washington, 1999. V. 2.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC international. 16th Ed. Washington, 1997. V. 2.

ARAÚJO, A.C.M.; SOARES, Y.N.G. Perfil de utilização de repositores protéicos nas academia de Belém do Pará. rev. nutr., campinas. vol. 12. num. 1. janeiro/abril 1999. p. 5-19.

ASMUS, CARMEN ILDES R. FRÓES. Metais. Universidade Federal do Rio de Janeiro Instituto de Estudos de Saúde Coletiva -IESC/UFRJ, 2015.

ATRA, R. ET AL. Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. journal of food engineering, v. 67, n. 3, p. 325-332, 2005.

AVILA-CAMPOS, MARIO JULIO. Metais pesados: um perigo eminente. Laboratório de anaeróbios, 2017.

<[http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com\\_content&view=article&id=33&itemid=56&lang=br](http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=33&itemid=56&lang=br)> Acesso em 02 de agosto de 2019.

BACURAU, R.F. Nutrição e suplementação esportiva. 5ª edição. Ed phorte, São Paulo – sp, 2007.

BRASIL, C, F. Resolução cfn nº 390/2006. Regulamenta a prescrição dietética de suplementos nutricionais pelo nutricionista e dá outras providências. Diário oficial da união, Brasília, 27/10/2006, seção 1, p. 104-105. Acessos em: 13 out. 2018.

Brasil, RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 13 junhos. 2019.

BRENELLI, EUGÊNIA CRISTINA SOUZA. A extração de cafeína em bebidas estimulantes - uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. Quím. Nova vol.26 no.1 São Paulo jan./feb. 2003.

BRITO, DIRCEU SANTOS; LIBERALI, RAFAELA. Perfil do consumo de suplemento nutricional por praticantes de exercício físico nas academias da cidade de vitória da conquista – ba. Revista

Brasileira de Nutrição Esportiva, São Paulo. v. 6, n. 31, p. 66-7, janeiro/fevereiro, 2012.

BRITO.D.S; LIBERLI.R.Perfil do consumo de suplemento nutricional por praticantes de exercício físico nas academias da cidade de vitória da conquista – ba. rbne - Revista Brasileira de Nutrição Esportiva. v. 6. n. 31 .São Paulo,2016. disponível em: < file:///d:/downloads/263-1036-3-pb%20(1).pdf>. Acessos em: 20 out. 2018.

BRITO.D.S; NOGUEIRA G.F,SOUZA,P.R. LIBERLI.R. Perfil do consumo de suplemento nutricional por praticantes de exercício físico nas academias da cidade de vitória da conquista – ba. rbne - Revista Brasileira de Nutrição Esportiva. v. 6. n. 31 .São Paulo,2013. Disponível em: < file:///d:/downloads/263-1036-3-pb%20(1).pdf>. Acessos em: 20 out. 2018.

BROSNAN, J Interorgan Amino Acid Transport And Its Regulation. Jornal de Nutrição, v. 12. n. 68, Junho de 2003.

CARDOSO, MAYARA.Ligação peptídica. aula de proteínas, 2018. <[http://www.iq.usp.br/chsfarah/aula2/aula2\\_estrutura\\_proteinas.htm](http://www.iq.usp.br/chsfarah/aula2/aula2_estrutura_proteinas.htm).> Acesso em 09 de agosto de 2019.

CASTRO, T. R. ET AL. Obtenção de suco clarificado de caju (*anacardiumoccidentali*, l) utilizando processos de separação por membranas. Ciência agrônômica, v. 38, n. 2, p. 164-168, 2007.

CAULCUTT, R., BODDY, R. Estatísticas para Análises Químicas. 1. Ed, 1983; p. 201-205.

CICCO, L.H.S. Saúde Animal gaturamo-bandeira. Disponível em: <[www.saudeanimal.com.br/gaturamo\\_bandeira\\_print.htm](http://www.saudeanimal.com.br/gaturamo_bandeira_print.htm)>>>. Acessado em: 07 de agosto de 2019.

CHRISTIAN, G. D., Análise Química, 5ed, editora Jhon Wiley & Sons, Inc., New York-EUA, 1994.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: editora da Unicamp, 2006.

COOPER, Terrance G. (1977). The tools of Biochemistry ed Jonh Wiley and Sons, New York.

CUNHA, HUMBERTO VINÍCIUS FARIA. A diferença entre atividade de água (aw) e o teor de umidade nos alimentos. Food Safety Brazil.. Junho de 2018. <<https://foodsafetybrazil.org/diferenca-entre-atividade-de-agua-aw-e-o-teor-de-umidade-nos-alimentos/>>. Acesso em 05 de agosto de 2019.

DC.TECH. Análise de determinação e quantificação de metais pesados. Aplicação,espectrômetro. <<https://www.dctech.com.br/determinacao-e-quantificacao-de-metais-por-espectrofotometria-de-absorcao-atmica/>> Acesso em 29 de julho de 2019.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. Química Nova, v. 30, n. 1, p. 99-105,2007.

DILLIN, ANDREIA GF. Determinação de Lipídios em Alimentos,Apostila de Bromatologia básica,Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, 2015.

Determination of eigallocatechingallate (egcg), epicatechin (ec), catechin (c) and caffeine (caf) in green tea using HPLC.Rev. Ciência E Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26(2), p. 394-400, 2006.

DOMINGUES, SF; MARINS, JCB. Utilização de recursos ergogênico e suplementos alimentares por praticantes de musculação em belo horizonte – mg. fit perf j., v. 6, n. 4, p. 218-226, 2007.

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL/USP, espectrofotometria uv-visível. Departamento de engenharia química – DEQUI.

FELTRE, RICARDO. Química Orgânica, vol 3,2004.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

FERNANDES, GISLAINE. Extração e purificação da cafeína da casca de café. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 1ed, 37p. 2014

FERNÁNDEZ-NOVALES, J.; LÓPEZ, M. I.; SÁNCHEZ, M. T.; MORALES, J.; GONZÁLEZ-CABALLERO, V. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. Food Research International, Ottawa, v. 42, p. 285-291, 2009

FOLHA DE SÃO PAULO, ANVISA Aprova novas regras para suplementos alimentares no país. Folha de São Paulo.

<<https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2018/07/anvisa-aprova-novas-regras-para-suplementos-alimentares-no-pais.shtml>> Acesso em 15 de agosto de 2018.

FREITAS, ARLAN SILVA. Teores de lipídios totais, ácidos graxos e colesterol em resíduos desidratados de camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus Kroyeri*, Heller 1862) capturado no Estado do Rio De Janeiro. Food Chemical, 8ed, 2017.

GALO ,ANDRÉ LUIZ. COLOMBO, MÁRCIO FRANCISCO. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa-UV-Vis. Química Nova, vol. 32, no. 2, 488-492, 2009.

GOSTON, JANAINA LAVALLI. CORREIA, MARIA ISABEL TOULSON DAVISSON . Suplementos nutricionais: histórico, classificação, legislação e uso em ambiente esportivo. Revista Nutrição em Pauta, 10 ed, 2009.

GUILLAUME, Y.; GUINCHARD, C. Method to study the separation of eight p- hydroxybenzoic esters by gas chromatography. Jornal de Cromatografia, v. 727, p. 93-96, 1995.

HARRIS, DANIEL C., Análise Química Quantitativa, 6ª Edição, LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro-RJ, 2005.

HU, R.; LIN, L.; LIU, T.; OUYANG, P.; HE, B.; LIU, S. Reducing sugar content in hemicellulose hydrolysate by dns method: Rev. Jornal de materias biologicos e bioenergeticos, Santa Clarita, v. 2, n. 2, p. 156-161, 2008.

HYVÖNEN, L. Approach to fat analysis of foods. Química de Alimentos, Oxford, v. 57, n. 1, p. 23-26, 1996.

INMETRO, MINISTÉRIO do DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA e COMÉRCIO EXTERIOR INSTITUTO NACIONAL de METROLOGIA, QUALIDADE e TECNOLOGIA –, Relatório Final Sobre A Análise Em Suplementos Protéicos Para Atletas – *Whey Protein*, 2017

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4 ed., 1 Ed digital. 1020 p. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Normalização e qualidade, 6 ed, 19 de Junho de 2016.

JOLLIS, ANA.RP. Proteína fitness de soro de leite ou *Whey Protein*. Rev. ma.músculo. 17p, 2 ed., 2016.

KARADJOVA, I. ET AL. Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in milk, cheese and chocolate. Microchim. Acta, v. 134, n. 3-4, p. 185-191, 2000.

KASVI. Espectrofotometria – princípios e aplicações. Rev.Kasvi, 29 de junho de 2016. <<https://kasvi.com.br/espectrofotometria-principios-aplicacoes/>> Acesso em 08 de julho de 2019.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL. Métodos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: ii – Métodos físicos e químicos. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.

LANAGRO, Determinação de lipídios em leite e derivados lácteos pelo método de roese-gottlieb. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Emissão: 26/08/2013.

LANAGRO, Determinação de nitrogênio total em leite e derivados lácteos pelo método de Micro-Kjedahl. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Método de Ensaio – met. Emissão: 28/11/2013.

LOURETE, MARIA P. Fundamentos da espectrofotometria. Apostila de Instrumental, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

LOVETT, G.M., TEAR, T.H., EVERS, D.C., FINDLAY, S.E.G., COSBY B.J., DUNSCOMB, J.K., DRISCOLL, C.T., And weathers k.c. effects of air pollution on ecosystems and biological diversity in the eastern united states. the year in ecology and conservation biology. Rev Cientifica Academica Ann. n.y., ed 1162, 99–135p, 2009

MAGACHO, PEDRO HENRIQUE. Determinação de metais por ICP-MS e ICP OES em diferentes matrizes ambientais. Departamento de Química, PUC-Rio-2013) <[http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio\\_resumo2013/relatorios\\_pdf/ctc/qui/qui-pedro%20henrique%20magacho%20de%20paula.pdf](http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio_resumo2013/relatorios_pdf/ctc/qui/qui-pedro%20henrique%20magacho%20de%20paula.pdf)>. Acesso em 05 de agosto de 2019.

MALDONADE, IRIANI R. CARVALHO, PATRÍCIA G. B. FERREIRA, NATHALIE A. Protocolo para Determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Embrapa. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81580/1/cot-85.pdf>. Acesso em 3 de agosto de 2019.

MENDES, PAULO BATISTA. Estudo de diferentes condições de preparo de amostra na determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. Química orgânica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2011. 1510 p.

MOURA, ANDRÉA. MBA, Proteínas do soro de leite. revista-fib. jan/fev- 2010. <http://revista-fi.com.br/artigos/proteinas-de-soro-de-leite/proteinas-do-soro-de-leite>. Acesso em 03 de junho 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. LEHNINGER: Princípios de bioquímica. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: artmed, 2014. 1328 p.

PASSARI, Livia Maria Zambrozi Garcia; SOARES, Patricia Kaori. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Quím.Nova vol.34 no.5 São Paulo 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G.; Introduction to Organic Laboratory Techniques: Small Scale Approach, Saunders college Publishing: forth worth, 1998, p. 71.

PEREIRA, CAROLINA VASCONCELLOS. Perfil do uso de Whey Protein nas academias de Curitiba-pr. Revista Brasileira de nutrição esportiva ISSN 1981-9927-p.423. Acesso em: 10 de junho de 2019.

PURGATTO, EDUARDO. Análise de Proteínas. Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental FCF – USP. Junho 2014.

PURGATTO, EDUARDO E LYSENKO, BEATRIZ ROSANA CORDENUNSI. Fibra Alimentar, Análise. Bromatologia, 2017.

SAITO, S. T.; WELZEL, A.; SUYENAGA, E. S.; BUENO, F. Análise da Metodologia rápida de Fermentação de SAMPAIO, FABRICIA; ALCANTARA, LUANDA, Universidade Estadual do Ceará, Tecnologia de Alimentos, 07 de junho, 2015.

SANTOS, ANGELA ALVES. DEOTI, JUNIOR ROMEO. MÜLLER, GABRIELA. Dosagem de Açúcares Redutores com o Reativo DNS em microplaca. Jornal Brasileiro De Tecnologia De Alimentos v. 20, e20151113, 2017.

SARAN, LUCIANA MARIA. Fundamentos de Espectroscopia Molecular UV-Visível, Apostila de Instrumental, FCVA/ UNESP Jaboticabal, 2015.

SARAN, LUCIANA MARIA. Espectroscopia UV-VIS . Apostila de Instrumental Instituto de Química USP ,2015.

SCHUCK, P.; JEANTET, R.; CARVALHO, A. F. Lactose Crystallization and Drying of Whey. Viçosa, MG: UFV, 2010. Curso Ministrado na disciplina tal 795 Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

SKOOG, HOLLER, NIEMAN, Princípios de Análise Instrumental, 5ª Edição, Editora Bookman, São Paulo-SP, 2002.

TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. S. Amino Acids Interference on the Quantification of Reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. carbohydrate research, Amsterdam, v. 363, p. 33-37, 2012.

TONIAL, IVANE BENEDETTI. Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca. Archivos Latinoamericanos De Nutricion. vol. 59 nº 1, 2009.

VASCONCELOS, CHRISTIANE MILEIB. Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo Método Enzimático-Gravimétrico E Cromatografia Líquida De Alta Eficiência. Artigos Originais, RIALA6/1276.2016.

VELOSO, ANA CRISTINA A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. Quim. Nova, vol. 25, no. 4, 609-615, 2002.

VIEIRA, IONARA FR. Proteínas em alimentos. Análises bromatológicas. abril/maio, 2017. <<https://slideplayer.com.br/slide/5638569/>> Acesso em 17 de julho de 2019.

VOGEL, Análise Química Quantitativa, 6ª Edição, LTC Editora, Rio de Janeiro-RJ, 2002.

WELTER, SINARA QUELI. Extração e quantificação de cafeína em energéticos através de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria. Apostila de Química Orgânica

Universidade Tecnológica Federal do Paraná coordenação de química curso de bacharelado em química-2018.

XIAO, L.; MJOS, S. A.; HAUGSGJERD, B. O. Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. *journal of food composition and analysis*, oxford, v. 25, n. 2, p. 198-207, 2012.

ZANARDO, ADRIANA DA ROCHA. Caracterização do consumo e conhecimento sobre o uso de suplementos nutricionais por freqüentadores de uma academia de ginástica do município de Santo André, São Paulo <efdeportes.com>, *Revista Digital*. Buenos Aires, ano 17, nº 173, outubro de 2017, < <http://www.efdeportes.com> > Acesso em : 10 de julho de 2019.

ZIMBERG, IONÁ ZALCMAN ET AL. Avaliação dos rótulos de suplementos de carboidrato. *Revista Brasileira de nutrição Esportiva Brazilian*. v. 1, n. 1, p. 16-20, mar. 2012.

## **7 Apêndice**

## Apêndice 1- Dados experimentais do ICP OES sem tratamento

Amostra	Mg	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mn	Mo	Na	Se	Sr	Zn
Br teórico	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Br1	0	0,0022	0	0	0,007	0,0014	0,0058	0	0	0	0,0154	0	0	0
Br2	0	0,0021	0	0	0,0009	0,0026	0,0064	0	0	0	0,0112	0	0	0
Br3	0	0,0038	0	0	0,0004	0,0001	0,0008	0	0	0	0,0118	0	0	0
Média dos brancos	0	0,0027	0	0	0,002767	0,0014	0,00433	0	0	0	0,0128	0	0	0
P+ Teórico	0,5	1	0,005	0	0,05	0,05	0,2	1,5	0,005	0,005	15	1000	0,005	0,1
P1	0,4829	0,9759	0,0043	0,0000	0,0478	0,0476	0,1909	1,4786	0,0045	0,0048	6,5582	0,0540	0,0046	0,1000
P2	0,4861	0,9796	0,0054	0,0000	0,0467	0,0486	0,1918	1,4107	0,0050	0,0047	14,9116	901,2312	0,0044	0,0967
P3	0,4587	0,9784	0,0047	0	0,0472	0,0484	0,1954	1,4023	0,0048	0,0048	14,9007	904,2684	0,0049	0,0909
Média dos +	0,4759	0,9780	0,0048	0,0000	0,0472	0,0482	0,1927	1,4305	0,0048	0,0048	14,9062	902,7498	0,0046	0,0959
Perda na abertura	0,0241	0,0220	0,0002	0,0000	0,0028	0,0018	0,0073	0,0695	0,0002	0,0002	0,0938	97,2502	0,0004	0,0041
% de perda	4,82	2,2033	4	0	5,333333	3,6	3,65	4,6311	4,66667	4,66667	6,257	9,7250	7,33333	4,13333
A-1	0,6546	145,3342	0,0000	0,0000	0,0421	0,0889	1,5489	171,8905	0,1918	0,0176	121,3528	1,7957	0,1807	0,9304
A-2	0,6569	145,5911	0,0000	0,0000	0,0488	0,0986	1,5054	173,1207	0,1835	0,0128	121,9380	1,6008	0,1778	0,9373
A-3	0,6758	145,3752	0,0000	0,0000	0,0428	0,0881	1,5518	179,0288	0,1904	0,0127	121,5579	1,7240	0,1802	0,9373
B-1	1,3211	141,1108	0,0019	0,0000	0,0642	0,1211	0,7054	207,6764	0,0567	0,0077	83,1893	0,2810	0,1328	0,3277
B-2	1,4066	144,0100	0,0009	0,0000	0,0696	0,1280	0,7254	208,8568	0,0567	0,0077	85,0445	0,2540	0,1357	0,3235
B-3	1,3226	144,0796	0,0011	0,0003	0,0600	0,1197	0,6089	207,9882	0,0577	0,0091	85,8442	0,2664	0,1295	0,3267
C-1	1,2780	134,0842	0,0000	0,0015	0,0723	0,1075	1,1067	256,4898	0,1021	0,0168	171,6952	0,1298	0,1661	0,4633
C-2	1,3243	139,3565	0,0000	0,0004	0,0781	0,1167	1,1986	257,7782	0,1052	0,0202	172,1109	0,1280	0,1755	0,5352
C-3	1,2477	134,5387	0,0000	0,0005	0,0595	0,0990	1,1815	257,4333	0,1022	0,0207	171,6470	0,1173	0,1651	0,4622
D-1	1,0280	149,0929	0,0000	0,0000	0,0609	0,0513	0,4755	198,8032	0,0087	0,0144	91,8313	0,1064	0,1031	0,2909
D-2	0,9994	148,4383	0,0004	0,0000	0,0736	0,0435	0,4773	200,9378	0,0087	0,0145	91,8095	0,1009	0,1072	0,3156
D-3	1,0245	149,4256	0,0027	0,0000	0,0736	0,0596	0,4818	198,8712	0,0092	0,0139	92,2871	0,1037	0,1033	0,3166
E-1	1,0355	131,2528	0,0012	0,0000	0,0590	0,1115	1,0078	174,4515	0,0097	0,0015	66,0254	0,1157	0,1364	0,8832
E-2	1,0301	131,5698	0,0010	0,0000	0,0605	0,1124	1,0081	174,4872	0,0103	0,0009	66,0300	0,1161	0,1345	0,8904
E-3	1,0320	131,2841	0,0006	0,0000	0,0609	0,1109	1,0064	174,4191	0,0108	0,0012	66,0301	0,1166	0,1374	0,8878

## Apêndice 2: Valores teóricos das amostras

Amostra	Mg (mg)	Ca (mg)	Cd (mg)	Co (mg)	Cr(mg)	Cu (mg)	Fe(mg)	K(mg)	Mn(mg)	Na(mg)	Se(mg)	Sr(mg)	Zn(mg)	Porção
A	2,3	336	0	0	5,5	0,103	5,2	81	0,36	0,0069	448	0,0052	0,0053	120
B	5,4	348	0	0	5,6	0,075	4,3	64	0,31	0,0067	22,5	0,0072	0,0032	40
C	5,5	166	0	0	5,2	0,135	2,3	52	0,35	0,0067	47	0,0051	0,0037	31
D	3	278	0	0	3,2	0,114	1,8	42	0,35	0,0062	26	0,0031	0,0029	35
E	3,6	201	0	0	5,5	0,107	2,7	37	0,37	0,0003	21	0,0035	0,0038	32

## Apêndice 3: Valores teóricos considerando a amostra inicial

Amostras	Massa	Mg (mg)	Ca (mg)	Cd (mg)	Co (mg)	Cr(mg)	Cu (mg)	Fe(mg)	K(mg)	Mn(mg)	Na(mg)	Se(mg)	Sr(mg)	Zn(mg)
A-1	2,0001	0,0383	5,6003	0,0000	0,0000	0,0917	0,0017	0,0867	1,3501	0,0060	0,0001	7,4670	0,0001	0,0001
A-2	2,0003	0,0383	5,6008	0,0000	0,0000	0,0917	0,0017	0,0867	1,3502	0,0060	0,0001	7,4678	0,0001	0,0001
A-3	2,0006	0,0383	5,6017	0,0000	0,0000	0,0917	0,0017	0,0867	1,3504	0,0060	0,0001	7,4689	0,0001	0,0001
B-1	2,0022	0,2703	17,4191	0,0000	0,0000	0,2803	0,0038	0,2152	3,2035	0,0155	0,0003	1,1262	0,0004	0,0002
B-2	2,0014	0,2702	17,4122	0,0000	0,0000	0,2802	0,0038	0,2152	3,2022	0,0155	0,0003	1,1258	0,0004	0,0002
B-3	2,0018	0,2702	17,4157	0,0000	0,0000	0,2803	0,0038	0,2152	3,2029	0,0155	0,0003	1,1260	0,0004	0,0002
C-1	2,0006	0,3549	10,7129	0,0000	0,0000	0,3356	0,0087	0,1484	3,3558	0,0226	0,0004	3,0332	0,0003	0,0002
C-2	2,0012	0,3551	10,7161	0,0000	0,0000	0,3357	0,0087	0,1485	3,3569	0,0226	0,0004	3,0341	0,0003	0,0002
C-3	2,0003	0,3549	10,7113	0,0000	0,0000	0,3355	0,0087	0,1484	3,3553	0,0226	0,0004	3,0327	0,0003	0,0002
D-1	2,0014	0,1715	15,8968	0,0000	0,0000	0,1830	0,0065	0,1029	2,4017	0,0200	0,0004	1,4868	0,0002	0,0002
D-2	2,0008	0,1715	15,8921	0,0000	0,0000	0,1829	0,0065	0,1029	2,4010	0,0200	0,0004	1,4863	0,0002	0,0002
D-3	2,0013	0,1715	15,8960	0,0000	0,0000	0,1830	0,0065	0,1029	2,4016	0,0200	0,0004	1,4867	0,0002	0,0002
E-1	2,0007	0,2251	12,5669	0,0000	0,0000	0,3439	0,0067	0,1688	2,3133	0,0231	0,0000	1,3130	0,0002	0,0002
E-2	2,001	0,2251	12,5688	0,0000	0,0000	0,3439	0,0067	0,1688	2,3137	0,0231	0,0000	1,3132	0,0002	0,0002
E-3	2,0009	0,2251	12,5682	0,0000	0,0000	0,3439	0,0067	0,1688	2,3135	0,0231	0,0001	1,3131	0,0002	0,0002

Apêndice 4: Dados experimentais tratados

Amostra	Mg	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mn	Mo	Na	Se	Sr	Zn
Br Teórico	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Br1	0	0,0022	0	0	0,007	0,0014	0,0058	0	0	0	0,0154	0	0	0
Br2	0	0,0021	0	0	0,0009	0,0026	0,0064	0	0	0	0,0112	0	0	0
Br3	0	0,0038	0	0	0,0004	0,0001	0,0008	0	0	0	0,0118	0	0	0
Média dos brancos	0	0,0027	0	0	0,002767	0,001367	0,00433	0	0	0	0,0128	0	0	0
P+ teórico	0,5	1	0,005	0	0,05	0,05	0,2	1,5	0,005	0,005	15	1000	0,005	0,1
P1	0,4829	0,9759	0,0043	0,0000	0,0478	0,0476	0,1909	1,4786	0,0045	0,0048	6,5582	0,0540	0,0046	0,1000
P2	0,4861	0,9796	0,0054	0,0000	0,0467	0,0486	0,1918	1,4107	0,0050	0,0047	14,9116	901,2312	0,0044	0,0967
P3	0,4587	0,9784	0,0047	0	0,0472	0,0484	0,1954	1,4023	0,0048	0,0048	14,9007	904,2684	0,0049	0,0909
Média dos +	0,4759	0,9780	0,0048	0,0000	0,0472	0,0482	0,1927	1,4305	0,0048	0,0048	14,9062	902,7498	0,0046	0,0959
Perda na abertura	0,0241	0,0220	0,0002	0,0000	0,0028	0,0018	0,0073	0,0695	0,0002	0,0002	0,0938	97,2502	0,0004	0,0041
% de perda	4,82	2,2033	4	0	5,533333	3,6	3,65	4,6311	4,66667	4,66667	0,6257	9,7250	7,33333	4,13333
A-1	0,1715	37,1333	0,0000	0,0000	0,0104	0,0227	0,4002	44,9627	0,0502	0,0046	30,5248	0,4926	0,0485	0,2422
A-2	0,1721	37,1989	0,0000	0,0000	0,0122	0,0252	0,3890	45,2845	0,0480	0,0033	30,6720	0,4391	0,0477	0,2440
A-3	0,1771	37,1438	0,0000	0,0000	0,0106	0,0225	0,4010	46,8300	0,0498	0,0033	30,5764	0,4729	0,0484	0,2440
B-1	0,3462	36,0542	0,0019	0,0000	0,0162	0,0310	0,1817	54,3235	0,0148	0,0020	20,9242	0,0771	0,0356	0,0853
B-2	0,3686	36,7949	0,0009	0,0000	0,0176	0,0328	0,1869	54,6323	0,0148	0,0020	21,3909	0,0697	0,0364	0,0842
B-3	0,3466	36,8127	0,0011	0,0000	0,0151	0,0306	0,1567	54,4051	0,0151	0,0024	21,5921	0,0731	0,0347	0,0850
C-1	0,3349	34,2588	0,0000	0,0000	0,0184	0,0275	0,2857	67,0920	0,0267	0,0044	43,1892	0,0356	0,0446	0,1206
C-2	0,3470	35,6059	0,0000	0,0000	0,0199	0,0299	0,3095	67,4290	0,0275	0,0053	43,2937	0,0351	0,0471	0,1393
C-3	0,3270	34,3750	0,0000	0,0000	0,0150	0,0253	0,3050	67,3388	0,0267	0,0054	43,1770	0,0322	0,0443	0,1203
D-1	0,2694	38,0937	0,0000	0,0000	0,0154	0,0129	0,1221	52,0025	0,0023	0,0038	23,0983	0,0292	0,0277	0,0757
D-2	0,2619	37,9264	0,0004	0,0000	0,0187	0,0109	0,1226	52,5609	0,0023	0,0038	23,0928	0,0277	0,0288	0,0822
D-3	0,2685	38,1787	0,0027	0,0000	0,0187	0,0151	0,1237	52,0203	0,0024	0,0036	23,2129	0,0284	0,0277	0,0824
E-1	0,2714	33,5354	0,0012	0,0000	0,0149	0,0285	0,2600	45,6326	0,0025	0,0004	16,6064	0,0317	0,0366	0,2299
E-2	0,2699	33,6164	0,0010	0,0000	0,0152	0,0288	0,2601	45,6420	0,0027	0,0002	16,6076	0,0318	0,0361	0,2318
E-3	0,2704	33,5434	0,0006	0,0000	0,0154	0,0284	0,2597	45,6242	0,0028	0,0003	16,6076	0,0320	0,0369	0,2311