

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

CRISTINE COUTO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS À
BASE DE WHEY PROTEIN

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

Niterói, RJ

2014

CRISTINE COUTO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS À BASE DE WHEY PROTEIN

EVALUATION OF NUTRITIONAL SUPPLEMENTS MANUFACTURED WITH WHEY
PROTEINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária da
Faculdade de Veterinária da Universidade
Federal Fluminense. Área de concentração:
Higiene Veterinária e Processamento
Tecnológico de Produtos de Origem Animal,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ADAM CONTE JÚNIOR

Co-orientador: Prof. Dr. THIAGO DA SILVEIRA ALVARES

Niterói, RJ

2014

CRISTINE COUTO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS À BASE DE WHEY PROTEIN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Aprovada em ____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior – Orientador – UFF

Prof. Dr. Thiago da Silveira Alvares – Co-orientador – UFRJ

Prof^a. Dra. Carla Silva Carneiro – UFRJ

Dr. Bruno Reis Carneiro da Costa Lima – PNPD/CAPES

Dra. Anna Carolina Vilhena da Cruz Silva Canto – PDJ/CNPq

Niterói, RJ

2014

*Dedico este trabalho a minha família, pelo
carinho e atenção, e ao meu companheiro e
amigo Bernardo pelo amor e carinho que,
em nenhuma ocasião, deixou de estar
presente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Agradeço aos meus pais, Maria Lucinda Couto de Almeida e Nélcio de Almeida, por ter me ensinado a arte de pensar e agir sempre tendo como pilar a disciplina, meus eternos agradecimentos.

Aos meus avós Elvira Jurema do Couto, Manuel do Couto (*in memoriam*), Dina Rosa de Almeida (*in memoriam*) e Poli Cardoso de Almeida (*in memoriam*), por transmitirem a ideia correta de vida.

Aos meus irmãos, Priscila Couto de Almeida e Bruno Couto de Almeida, pelo carinho, amizade, incentivo e atenção que sempre tiveram comigo, e aos meus sobrinhos Isaac e Leonardo pelos momentos de descontração e amor.

Em especial ao meu namorado, Bernardo Araújo de Almeida, pelo amor, companheirismo, compreensão, e pela paciência nos momentos de desabafos.

Ao orientador Carlos Adam Conte Júnior e co-orientador Thiago Silveira Alvares pelo apoio, auxílio e paciência com que passaram seus conhecimentos.

Aos pós-doutorandos do laboratório de Controle Físico-Químico (UFF), que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial atenção aos doutores Maria Lúcia Monteiro e Bruno da Costa Lima, o qual me co-orientaram nesta trajetória final, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Gostaria de agradecer especialmente a amizade e companheirismo profissional dos amigos, Marion da Costa (UFF), Júlia Vasconcelos (UFRJ), Davi da Silva (UFRJ) e Carolina Hood (UFF) que contribuíram para o aprendizado da técnica e na realização das análises.

Aos amigos da pós-graduação, mestrandos e doutorandos, e aos meus amigos “reativos” que contribuíram com sua amizade, pensamento positivo e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho.

A equipe da Pós-Graduação Drausio, Mariana e André pela atenção e ajuda durante a realização do Curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho
que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho.”*

Abraham Lincoln

*“A vida é para quem topa qualquer parada.
Não para quem para em qualquer topada.”*

Bob Marley

RESUMO

O mercado de alimentos com propriedades funcionais está em crescente expansão. Esse segmento está relacionado às inovações, pois além dos tradicionais produtos funcionais, ganham espaço no mercado de suplementos nutricionais produtos inovadores como bebidas especiais para esportistas fabricados a partir do soro de leite, mais conhecido como Whey Protein (WP). Além da atuação sobre a síntese protéica muscular, estes suplementos protéicos estão se inserindo em áreas como a da nutrição clínica, por se revelarem uma importante fonte de aminoácidos de elevado valor nutricional. Mesmo com o aumento da popularidade destes suplementos, estes por serem categorizados como alimentos para atletas, são dispensados da obrigatoriedade de registro, o que os torna de qualidade nutricional questionável, sendo apenas avaliados através de denúncias. Desta forma, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a qualidade das proteínas presentes em suplementos à base de WP, fabricados por empresas brasileiras e norte-americanas. O presente estudo foi realizado em duas etapas: (1) Comparar o conteúdo total de proteínas entre as marcas nacionais e importadas, correlacionando o conteúdo encontrado com o descrito nos respectivos rótulos; identificar e quantificar as frações protéicas majoritárias (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), e quantificar o conteúdo de aminoácidos essenciais livres (EAA), enfatizando os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA). (Artigo I); os resultados demonstraram que os suplementos importados apresentaram melhores resultados para o conteúdo total de proteínas, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, EAA livres e BCAA livres, em relação aos suplementos nacionais. Dentre as marcas avaliadas, quatro marcas de WP suplementos importados e sete marcas de WP suplementos nacionais obtiveram percentual de proteína abaixo do descrito nos seus respectivos rótulos. (2) Investigar a qualidade protéica através da digestibilidade *in vitro*, composição de EAA e através do escore químico de aminoácidos e o escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS). (Artigo II); de acordo com os resultados encontrados, as proteínas presentes nos produtos fabricados por empresas norte-americanas apresentaram melhor valor de digestibilidade quando comparado às contidas em suplementos fabricados por empresas brasileiras. Nenhum dos produtos apresentou aminoácidos essenciais limitantes quando comparados com o padrão da FAO/WHO/UNU para adultos não atletas, evidenciando valores de PDCAAS acima de 1,0, no entanto, quando o escore químico e o PDCAAS foram calculados com base no requerimento para um adulto atleta, ambos indicaram estarem abaixo do ideal. Baseado nos dados obtidos nas duas etapas do trabalho pode-se concluir que os suplementos fabricados por empresas norte-americanas apresentaram melhor qualidade em relação ao conteúdo total de proteína, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, EAA livre, BCAA livre e digestibilidade, comparados aos suplementos fabricados por empresas brasileiras. No entanto, apesar de ambos apresentarem um adequado conteúdo de EAA para adultos não atletas, quando avaliados, levando-se em consideração o sugerido para um adulto atleta, nenhum dos suplementos alcançou o mínimo requerido.

Palavras-chave: Alimentos para atletas, Qualidade protéica, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, Aminoácidos essenciais, Digestibilidade.

ABSTRACT

Foods with functional properties are receiving increased attention in the worldwide market. This novel food industry segment is gaining market space in the nutritional supplements as special sports drinks prepared from Whey Protein (WP). Besides the property on muscle protein synthesis, these protein supplements are interesting for clinical nutrition, due to their proved source of amino acids and there high nutritional value. Nevertheless, is categorized as dietary supplements, being exempt from registration; thus the control of manufacturing process, marketing, as well as the nutritional quality of this type of product is uncertain. In this context, the aim of this study was to investigate the protein quality of WP supplements produced by U.S. (WP-USA) and Brazilian (WP-BRA) companies. The current research was separated into two different steps: (1) Compared the total protein (TP) content between Brazilian and U.S. supplements, correlating protein content with the label described on the products; identify and quantify the majority protein fractions (α -lactalbumin - α -La and β -lactoglobulin - β -Lg), and quantify the content of free essential amino acids (free EAA) and free branched-chain amino acids (free BCAA), between WP-USA and WP-BRA. (Paper I); There were significant greater concentrations of TP, α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA in the WP-USA supplements, as compared to the WP-BRA supplements. Of all products evaluated, four WP-USA and seven WP-BRA had significantly lower values of TP than those specified on the label. (2) Evaluate the protein quality through in vitro protein digestibility, contents of essential amino acid (EAA), the amino acid score (AAS) and protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) (Paper II); WP-USA supplements exhibited greater IVPD than WP-BRA supplements. Considering the WHO/FAO/UNU protein standard for non-athletic adult, the WP-USA and WP-BRA supplements scored high AAS, showing PDCAAS above 1.0; however, when the calculated AAS and PDCAAS was based on the suggestion for adult athletes were considered, both supplements exhibited suboptimal score values for several EAA. Based on the results obtained during these steps of these work, concludes that the WP-USA supplements had greater nutritional quality, as evaluated through contents of TP, α -LA, β -Lg, free EAA, free BCAA and digestibility comparing with WP-BRA supplements. Although both provided the appropriate content for non-athletic adult, when evaluated, suggested for an athletic adult, no supplements reached the minimum required.

Keywords: Dietary supplements, Protein quality, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, Essential amino acid, Digestibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Posição relativa dos suplementos alimentares entre os alimentos e os fármacos, p. 28

Figura 2: Total protein (%) of WP-USA (A) and WP-BRA (B) supplements, p. 48

Figura 3: Representative protein profile of the 8 WP-BRA supplements evaluated by SDS-PAGE, p. 49

Figura 4: Content of α -La (A) and β -Lg (B) of WP-USA and WP-BRA supplements, p. 50

Figura 5: Representative chromatogram of one of the WP-USA brand, p. 51

Figura 6: The in vitro protein digestibility values (%) of WP-USA and WP-BRA supplements, p. 70

Figura 7: The in vitro protein digestibility values (%) of WP-USA, WP-BRA, soy isolate and caseinate isolate supplements, p. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades e concentração das proteínas do soro de leite, p. 18

Tabela 2: Concentration (mg/100g) of essential amino acid (EAA) and the branch-chain amino acids (BCAA) of WP-USA and WP-BRA brands, p. 52

Tabela 3: Essential amino acids (EAA) content, amino acid score (AAS) and the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) values calculated for WP-USA supplements and WP-BRA supplements, p. 68

Tabela 4: Amino acid (AAS) and protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) scores of WP-USA and WP-BRA supplements calculated for adult athletes, p. 69

SUMÁRIO

RESUMO, p. 8

ABSTRACT, p. 9

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 10

LISTA DE TABELAS, p. 11

1 INTRODUÇÃO, p. 14

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 16

2.1 SORO DE LEITE, p. 16

2.2 PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE, p.17

2.2.1 β -Lactoglobulina (β -Lg), p. 18

2.2.2 α -Lactalbumina (α -La), p. 19

2.2.3 Glico-macropéptido (GMP), p. 20

2.2.4 Albumina do soro bovino (BSA), p. 20

2.2.5 Imunoglobulinas (Ig), p. 20

2.2.6 Lactoferrina, p. 21

2.2.7 Lactoperoxidase, p. 21

2.2.8 Proteose-Peptonas, p. 22

2.3 MÉTODOS TECNOLÓGICOS APLICADOS PARA OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE, p. 22

2.4 PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DO WHEY PROTEIN, p. 23

2.4.1 Benefício à Atividade Esportiva, p. 23

2.4.2 Atividade Imunomoduladora, p. 25

2.4.3 Atividade Antimicrobiana e Antiviral, p. 25

2.4.4 Atividade Anticarcinogênica, p. 26

2.4.5 Proteção ao Sistema Cardiovascular, p. 26

2.4.6 Outros Benefícios, p. 27

2.5 SUPLEMENTOS ALIMENTARES, p. 27

2.5.1 Definição e regulamentação, p. 27

2.5.2 Mercado Nacional e Internacional, p. 29

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA, p. 29

3 DESENVOLVIMENTO, p. 31

3.1 ARTIGO 1: COMPARISON OF PROTEIN AND AMINO ACID PROFILES OF DIFFERENT WHEY PROTEIN SUPPLEMENTS. Submitted to Journal of Dairy Science (Paper I), p. 31

3.2 ARTIGO 2: *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF COMMERCIAL WHEY PROTEIN SUPPLEMENTS. Submitted to Food Science and Technology (Paper II), p. 52

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 72

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA, P. 73

6 ANEXOS, p. 82

6.1 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1, p. 82

6.2 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2, p. 83

1 INTRODUÇÃO

Evidência científica sobre a correlação entre a utilização de suplementos alimentares e a saúde levou ao surgimento de um mercado de alimentos diferenciados e de rápido crescimento. Esta tendência vem acompanhada do aumento da procura por produtos com propriedades funcionais, que possam fornecer benefícios adicionais aos da alimentação (BORSHEIM, 2002; BARBAROS & HUSEYIN, 2010). Dentre os mais populares encontram-se as bebidas protéicas prontas para o consumo, obtidas a partir do soro de leite, mais conhecido como Whey Protein (WP).

Baseado em tendências europeias e norte-americanas para o segmento esportivo, as bebidas para esportistas, reivindicam aplicabilidade do soro como suplemento, com efeito sobre a síntese protéica muscular e melhora no desempenho físico (BALDISSERA et al., 2011; PHILLIPS, 2011). Empresas especializadas na análise de mercado sustentam um grande potencial para este segmento, como público alvo não somente os adeptos das academias, mas também, idosos, jovens e pacientes com necessidades nutricionais especiais (ABENUTRI, 2014; EUROMONITOR, 2014).

O WP é o resultado da purificação do soro de leite, subproduto das indústrias de laticínios que há pouco tempo era descartado como efluente o que era considerado um forte agravante devido a sua alta demanda biológica de oxigênio (WALSTRA et al., 2006). Após a descoberta do elevado valor biológico das frações protéicas solúveis neste subproduto, tornou-se de grande interesse para as indústrias de alimentos nutricionais, utilizá-los como matéria-prima na elaboração de novos produtos com características especiais e com valor agregado (URISTA et al., 2011).

As proteínas de origem animal são componentes importantes na dieta humana, uma vez que constituem a principal fonte de nitrogênio e de aminoácidos essenciais (LOWERY et al., 2012). A qualidade nutricional de uma proteína depende da sua composição, digestibilidade, absorção, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e de nitrogênios totais, sendo a digestibilidade o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização protéica na dieta, portanto, pode ser considerado um condicionante de qualidade (LEMON et al., 2002; TANG et al., 2009).

Avanços na tecnologia de processamento resultaram no desenvolvimento de diferentes formas de apresentação dos WP suplementos (VOSWINKEL & KULOZIK, 2014). Esta variedade está relacionada ao teor de proteína presente no produto. O whey protein concentrado (WPC) dependendo do fabricante pode variar de 25% a 80% de proteína, enquanto o whey protein isolado (WPI) possui cerca de 90% de proteína. Já o whey protein hidrolisado (WPH) é o whey isolado, após uma hidrólise enzimática, formado por peptídeos de 3 a 4 aminoácidos (CARUNCHIA et al., 2005; URISTA et al., 2011).

Mesmo com o aumento da popularidade destes suplementos, estes por serem categorizados como alimentos para atletas, são dispensados da obrigatoriedade de registro, o que os torna de qualidade nutricional questionável, sendo apenas avaliados através de denúncias (BRASIL, 2010). Análises recentes de algumas marcas de suplementos geraram uma grande repercussão no Brasil e no exterior, levando ao conhecimento público os laudos com as marcas reprovadas para consumo, por apresentarem irregularidades na sua formulação, o que caracteriza fraude contra o consumidor (CONSUMER REPORT, 2014; CONSUMER LAB, 2014; PROTESTE, 2014). Tendo em vista a sua elevada demanda, almeja-se pelos consumidores que os efeitos fisiológicos pretendidos sejam alcançados. Desta forma, o objetivo geral da presente pesquisa foi avaliar a qualidade das proteínas presentes em suplementos elaborados a partir das proteínas do soro de leite (whey protein), produzidos tanto por empresas brasileiras e norte-americanas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SORO DE LEITE

O soro de leite, também conhecido como soro lácteo, soro de queijo ou lactossoro, é o líquido residual, de cor amarelo-esverdeada, obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos, de caseína ou de produtos similares (CODEX ALIMENTARIUS, 2011). É um subproduto de importância relevante na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional; 10 litros de leite produzem cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro; neste volume encontra-se cerca da metade dos sólidos do leite, sobretudo lactose, proteínas solúveis e sais minerais (WALSTRA et al., 2006).

A composição e o tipo de soro de leite produzido industrialmente dependem do tipo de coagulação a qual a caseína é submetida durante a fabricação de queijos, possuindo assim duas tipologias: o soro doce, obtido pela coagulação enzimática da caseína, e o soro ácido, obtido pela coagulação por bactérias lácticas ou pela adição de ácidos ao leite (ETZEL, 2004; WALSTRA et al., 2006).

Tradicionalmente, o soro era considerado pelos produtores de queijo como um subproduto da fabricação, com baixo ou nenhum valor comercial. Seu destino principal foi por muito tempo adicionado a ração animal, ou muitas vezes descartado diretamente nos efluentes (WALZEN et al., 2002). Porém, esta visão mudou com a descoberta das propriedades funcionais e bioativas de seus componentes protéicos, tornando-se uma importante matéria prima para a elaboração de produtos com valor agregado, voltados tanto para a nutrição clínica quanto para a nutrição esportiva (MARSHALL, 2004; GLOBALFOOD, 2014).

Apesar de ser composto em grande parte por água, o soro de leite é um reservatório de componentes do leite de elevado valor nutricional, pois contém cerca de metade dos nutrientes encontrados no leite integral (BOSCHI, 2006). A composição do soro fresco liberado do coágulo

durante a fabricação de queijo possui cerca de 94,2% de água, 0,8% de proteínas do soro, 4,3% de lactose, 0,5% de minerais e 0,1% de gordura. Ou seja, 5,7% de sólidos, dos quais aproximadamente 13% são compostos por proteínas (ALMEIDA et al., 2013). Contudo, essa composição pode variar entre as espécies, sendo influenciado pela raça, estágio de lactação, alimentação, clima, paridade, estação do ano e pela saúde do animal (WALSTRA et al., 2006; PARK et al., 2007).

As proteínas remanescentes do soro possuem excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Em contrapartida, apresentam também excepcionais propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, geleificação e formação de filmes (SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006; PIRES et al., 2006; RENHE, 2008; SOUSA et al., 2012).

2.2 PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

No soro estão presentes, um grupo heterogêneo de proteínas que permanecem solúveis após a precipitação das caseínas, sendo caracterizados por mutações genéticas que normalmente se traduzem em substituição de um ou mais resíduos de aminoácido na sua sequência peptídica original (HERNÁNDEZ et al., 2008). Essas frações são representadas por proteínas globulares, sendo elas: β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig), lactoferrina, lactoperoxidase, glicomacropéptídeos (GMP), proteose-peptona, entre outras (HARAGUCHI et al., 2006; YÜKSEL & ERDEM, 2009; SOUSA et al., 2012).

As proteínas do soro em maior concentração são a β -Lg e α -La, elas constituem de 70 a 80% das proteínas totais do soro (SAARELA, 2007). A Tabela 1 apresenta as propriedades das proteínas do soro, tais como: peso molecular, ponto isoelétrico e as concentrações médias no soro.

Tabela 1. Propriedades e concentração das proteínas do soro de leite

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	Concentração (g.L ⁻¹)	Resíduos de aminoácidos
β-Lg	18,3	5,2	2,0 – 4,0	162
α-La	14,1	4,2 – 4,8	0,6 – 1,7	123
BSA	66,0	4,7 – 4,9	0,1 – 0,4	582
Ig	15,0 – 160,0	5,5 – 8,3	0,6 – 1,0	-
Proteose-Peptona	4,1 – 80,0	3,3 – 3,7	1,4	-
Lactoferrina	78,0	9	0,1	612
Lactoperoxidase	89,0	9,5	0,02	64
Glicomacropeptídeo	7,0	-	0,01	689

Fonte: adaptada de ETZEL (2004); ALMEIDA et al., (2013).

2.2.1 β-Lactoglobulina (β-Lg)

A β-Lg é a proteína mais abundante no soro de leite, representando aproximadamente 50% dos constituintes do soro. É a proteína que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada, com cerca de 30%. Estes peptídeos contêm usualmente de 3 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula, e a sua função é definida pela sua sequência primária. Sua molécula contém 162 aminoácidos dispostos em uma cadeia simples de peptídeos, sendo sensíveis a pH ácido e elevadas temperaturas; apresenta peso molecular entre 18- 36 KDa, o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas estomacais, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. Além de ser uma rica fonte de cisteína, aminoácido precursor na síntese de glutathione, responsáveis pelos principais efeitos fisiológicos proporcionados por estas proteínas (SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006; KRISSANSEN, 2007; HERNÁNDEZ et al., 2008; RENHE, 2008).

Existem diferentes variantes da β-Lg, sendo as principais a A e a B. A variante A difere da variante B em apenas dois aminoácidos: aspartato-64 e valina-118 (HERNÁNDEZ et al., 2008). Segundo WONG et al. (1999) existem estudos que destacam a presença de outras variantes genéticas: C, D, E com diferentes mobilidades eletroforética.

As principais propriedades biológicas dos peptídeos derivados da β -Lg são: anti-hipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, imunoestimulante e hipocolesterolêmico (STEIJNS & HOOIJDONK, 2000; RODRIGUES, 2001; SGARBIERI, 2005; HERNÁNDEZ et al., 2008).

2.2.2 α -Lactalbumina (α -La)

A α -La é a segunda maior fração protéica presente no soro do leite. Constitui cerca de 13% das proteínas totais sendo a única fração capaz de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, afetando positivamente sua absorção intestinal. É rico em aminoácidos essenciais, principalmente o triptofano, e sua molécula é formada por 123 resíduos de aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 14 KDa. São resistentes termicamente, pois conseguem renaturar-se a baixas temperaturas (SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006; KRISSANSEN, 2007; RENHE, 2008).

A α -La é uma metalo-proteína com um átomo de cálcio que lhe possibilita a ligação a outras proteínas. A α -La, de todas as proteínas do soro é a mais estável termicamente, devido à presença do cálcio que promove a formação de ligações iônicas intermoleculares que tendem a fazer a molécula resistente ao desdobramento térmico (YADA, 2004). Segundo Ziegler & Sgarbieri (2009), o fato do perfil aminoacídico da α -La se assemelhar ao do presente no leite humano, por conseguinte é largamente utilizada na formulação de produtos para nutrição infantil.

As propriedades biológicas dos peptídeos derivados da α -La são: anticancerígenos, antimicrobiano contra bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonia* e, além de ser rica em triptofano, precursor da niacina e da serotonina (HARAGUCHI et al., 2006; SANTOS et al., 2011).

2.2.3 Glico-macropéptídeo (GMP)

O glico-macropéptídeo (GMP) é um péptídeo derivado da digestão da kappa-caseína, pela ação da quimosina durante a coagulação do queijo. Esta fração está presente em um tipo de proteína do soro, conhecida como whey rennet. Esta molécula apresenta peso molecular aproximado de 6-7 KDa, sendo um péptídeo com alto teor de aminoácidos essenciais, sendo resistentes ao calor e a mudanças de pH. Apresenta alta carga negativa, que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal. Oferecem proteção contra infecções, pois estimula a produção de linfócitos, além de possuir efeito inibidor sobre as secreções de ácido gástrico e atividade imunossupressora (RODRIGUES, 2001; HARAGUCHI et al., 2006; KRISSANSEN, 2007).

2.2.4 Albumina do soro bovino (BSA)

É um polipeptídeo contendo cerca de 582 aminoácidos, com alto peso molecular (66KDa), representando cerca de 0,7 a 1,3% de todas as proteínas do soro do leite. A BSA possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos favorecendo seu transporte na corrente sanguínea, sendo assim, têm importante papel nas atividades fisiológicas e funcionais. É uma das precursoras da síntese de glutathione, substrato essencial para as atividades imunológicas de indivíduos com HIV, além de conferirem atividade anticancerígena (CRIBB et al., 2002; PACHECO et al., 2005; HARAGUCHI et al., 2006; KRISSANSEN, 2007; RENHE, 2008; SANTOS et al., 2011).

2.2.5 Imunoglobulinas (Ig)

Entre as quatro classes de imunoglobulinas presentes no leite bovino (IgG, IgA, IgM e IgE), a principal é a IgG, constituindo cerca de 80% do total, e é a única que permanece presente no leite mesmo depois da fase do colostro. As imunoglobulinas apresentam elevado peso molecular

variando de 150-1.000 KDa (HARAGUCHI et al., 2006; GEORGE et al., 2013). Como principais ações biológicas incluem a imunidade passiva e atividade antioxidante, oferecendo proteção contra infecções, pois estimulam a produção de linfócitos. Segundo Santos et al. (2011), também são responsáveis pela indução da apoptose de células tumorais e atividade antiviral.

2.2.6 Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína multifuncional pertencente à família da transferrina. É formada por 989 aminoácidos, com peso molecular variando de 78-80 KDa. É uma glicoproteína de ligação com ferro, portanto desempenha importante papel no transporte de ferro, sendo responsável por diversas funções biológicas, como na atividade imunomoduladora, ação antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana, além de estar relacionada além do aumento da absorção de ferro na dieta (WIT, 1998; STEIJNS & HOOIJDONK, 2000; RODRIGUES, 2001; KRISSANSEN, 2007).

2.2.7 Lactoperoxidase

As lactoperoxidasas consistem de uma única cadeia polipeptídica contendo 612 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 78 KDa. Faz parte da família das peroxidases, grupo de enzimas responsáveis por catalisar a oxidação de certas moléculas, sendo responsáveis pela ação antimicrobiana, atividades antioxidante e antiviral, porém estudos demonstraram que esta enzima pode ser desnaturada quando alcançam temperaturas acima de 70°C (WIT, 1998; RODRIGUES, 2001; KUSSENDRAGER & HOOIJDONK, 2010; SANTOS et al., 2011).

2.2.8 Proteose-Peptonas

São resultantes da proteólise das caseínas pelas enzimas do leite. Aproximadamente 1,1% da proteína do leite total consistem em proteose-peptonas, esta fração pode ser dividida em três componentes principais: PP3, PP5 e PP8 (YADA, 2004).

2.3 MÉTODOS TECNOLÓGICOS APLICADOS PARA OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

O componente mais valioso no soro de leite são as proteínas, mas estas se encontram inicialmente em concentrações reduzidas no soro líquido. Portanto, tornam-se necessárias etapas para concentração das proteínas (PAGNO, 2009). O desenvolvimento de técnicas de fracionamento, de modificação e preservação das proteínas do soro contribuiu para a recuperação desse valioso nutriente (HARAGUCHI et al., 2008; KHANAM et al., 2013).

Os produtos obtidos a partir do soro são classificados de acordo com o seu processamento. Sendo denominado de soro líquido, soro em pó, soro em pó parcialmente deslactosado, soro em pó parcialmente desmineralizado (< 7% cinzas), soro em pó deslactosado e desmineralizado, soro em pó desmineralizado (< 1,5% cinzas), isolados proteicos de soro (> 90% proteína seca) e concentrados proteicos de soro (> 25% proteína seca) (RODRIGUES, 2001).

A tecnologia utilizada no processamento do soro progrediu nos últimos anos devido ao desenvolvimento de novas técnicas de purificação. Existem diferentes tecnologias utilizadas para enriquecer ou concentrar as diferentes frações do soro de leite, sendo os mais populares: cross flow microfiltração (CFM[®]), osmose reversa, filtração por membrana dinâmica, cromatografia de troca iônica, eletro-ultrafiltração, cromatografia de fluxo radial e nanofiltração. As vantagens nestas tecnologias são o mínimo de desnaturação protéica, preservação das frações biológicas e um melhor perfil de aminoácidos (MULLER et al., 2003; VOSWINKEL & KULOZIK, 2014).

Estão presentes no mercado, diferentes formas de apresentação do WP, sendo classificados de acordo com o percentual de macro nutriente (HEEBOLL-NIELSEN et al., 2004). Esta variedade esta relacionada ao teor de proteína presente no produto, e pela presença de outros constituintes do soro, como a lactose (URISTA et al., 2011; MAUGHAN, 2013). O whey protein concentrado (WPC) dependendo do fabricante pode variar de 25% a 80% de proteína e uma considerável quantidade de lactose. O whey protein isolado (WPI) possui cerca de 90% de proteína e um percentual muito baixo de lactose. O whey protein hidrolisado (WPH) é o whey isolado, mas que passou por uma hidrólise enzimática, formado basicamente por peptídeos de 3 a 4 aminoácidos (CARUNCHIA et al., 2005).

2.4 PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DO WHEY PROTEIN

As proteínas do soro possuem elevado valor funcional e nutricional. Estudos realizados em diferentes modelos experimentais, utilizando as proteínas do soro de leite, comprovam a eficácia deste produto na redução e/ou prevenção do desenvolvimento de diversas doenças, assim como no condicionamento de indivíduos fisicamente ativos (PACHECO et al., 2005; PIHLANTO, 2011).

2.4.1 Benefício à Atividade Esportiva

Com base em várias propriedades funcionais das proteínas do soro do leite, ressalta-se a vantagem e os benefícios de seu uso como suplemento alimentar para atletas e esportistas. Normalmente, estes indivíduos não conseguem através da alimentação diária atender suas necessidades nutricionais, por isto, uma dieta suplementada com mistura de proteínas torna-se necessário (HA et al., 2003, TERADA, 2009).

Exercícios intermitente, moderados ou de alta intensidade, causam a redução do glicogênio muscular. Como este é o combustível essencial para o desempenho do exercício, são necessárias

estratégias nutricionais que maximizem o armazenamento de glicogênio antes do exercício (FISCHBORN, 2009). A nível molecular, a estimulação da síntese de proteínas e a redução ao mínimo da degradação protéica são os dois processos essenciais para a recuperação eficiente após exercícios (PHILLIPS, 2011). No entanto, a capacidade de uma proteína de promover estas funções vai depender da sua digestibilidade e da composição em aminoácidos (HOFFMAN et al. 2008; HULMI et al., 2010). Pesquisas científicas comparando diferentes fontes protéicas demonstram que as proteínas do soro são uma fonte eficaz na recuperação muscular (TANG et al., 2009; PHILLIPS, 2011).

Considerando que o exercício físico exaustivo causa depressão imunológica, produção de radicais livres e catabolismo protéico e que as proteínas do soro de leite e seus hidrolisados agem estimulando o sistema imune (celular e humoral) através do estímulo linfocitário e produção de anticorpos; além de possuírem ação antioxidante e sequestrantes de radicais livres, serem rapidamente digeridas e absorvidas e possuírem composição de aminoácidos que favorecem a síntese de proteínas musculares (BCAAs) é de se esperar que sua ação seja altamente benéfica ao organismo humano e animal, antes, durante e após períodos de exercícios intensos e/ou prolongados (SGARBIERI, 2004).

Sabe-se que o excesso de gordura corporal é considerado em todo o mundo um problema de saúde. De acordo com Oliveira et al., (2012), é comprovado cientificamente que o alto teor de aminoácidos essenciais das proteínas do soro afeta os processos metabólicos da regulação energética, de forma a favorecer o controle e a redução da gordura corporal. Segundo pesquisa realizada pelo mesmo autor, foi constatado que as dietas que apresentam maior relação proteína/carboidrato são mais eficientes para o controle da glicemia e da insulina pós-prandial, situação que favorece a redução da gordura corporal e a preservação da massa muscular durante a perda de peso.

2.4.2 Atividade Imunomoduladora

As imunoglobulinas do leite desempenham função importante, não somente no sistema gastrointestinal, mas sistemicamente em todo o organismo (CRIBB et al., 2002; MICHAELIDEOU & STEIJNS, 2006). Pesquisas desenvolvidas, (PACHECO et al., 2005) mostraram que dietas à base de concentrados de proteínas do soro de leite bovino, promoveu estímulos imunológicos superior a outras fontes de proteínas isoladas testadas comparativamente, quanto ao poder de estimular a produção de imunoglobulina M.

A eficácia das proteínas isoladas do soro de leite no sentido de melhorar a atuação do sistema imunológico foi também testada em humanos portadores do vírus HIV (MARSHALL, 2004). Embora com número reduzido de sujeitos, 3 e 4 indivíduos, respectivamente, a administração de 10g a 40g diárias de proteínas de soro a esses indivíduos portadores de HIV elevou a concentração de glutathione nos linfócitos e o número de linfócitos, melhorando as condições gerais dos pacientes (METTE et al., 2007).

Além dos efeitos proporcionados pela ação imunoestimulatória tem sido demonstrada para outras proteínas isoladas do soro, como a imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase e glicomacropéptido. Além de estar presente no soro, a lactoferrina é secretada por neutrófilos, podendo estimular o crescimento de vários tipos de células do sistema imune como linfócitos, macrófagos/monócitos, além de estimular a resposta imune humoral na produção de anticorpos (BRUNETTO et al., 2007).

2.4.3 Atividade Antimicrobiana e Antiviral

As proteínas responsáveis por esta atividade são: lactoferrina, lactoperoxidase, α -lactoalbumina e as imunoglobulinas. A lactoferrina, bem como seus peptídeos lactoferricina, inibem a proliferação e o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como leveduras

fungos e protozoários por sequestrar o ferro disponível no ambiente. A lactoperoxidase tem propriedade bactericida através da oxidação de tiocianatos em presença de peróxido de hidrogênio (ALMEIDA et al., 2013). β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, conferem atividade bactericida, sugerindo que essas proteínas do soro podem exercer efeito antibiótico no organismo após hidrólise enzimática (SGARBIERI, 2004).

2.4.4 Atividade Anticarcinogênico

Tem sido demonstrado que concentrados de proteínas do soro de leite bovino apresentam ação inibitória para diversos tipos de câncer em modelos animais e em culturas de células cancerígenas (CRIBB et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2008). McIntosh & Le Leu (2001) estudaram a ação de várias proteínas da dieta (proteínas do soro de leite, caseína, proteínas da carne bovina e da soja) contra o desenvolvimento de tumores de cólon induzidos pelo carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina. Nestes estudos observaram que dietas contendo as proteínas do soro de leite inibiram o aparecimento e o crescimento de tumores de cólon de forma mais eficaz que a caseína, as proteínas de carne bovina e as de soja, nesta ordem. Logo, os autores concluíram que as proteínas do soro atuaram de maneira mais eficaz no combate à tumorigênese induzida, em roedores, que as demais proteínas testadas.

2.4.5 Proteção ao Sistema Cardiovascular

As proteínas presentes no leite demonstraram exercer efeitos no sistema cardiovascular, principalmente através de suas ações anti-hipertensivas, antitrombóticas e hipocolesterolêmicas (LEE et al, 2007; PAL et al., 2010). A regulação da pressão sanguínea é parcialmente dependente do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A renina atua sobre a angiotensina, liberando a angiotensina I, esta, por sua vez, converte-se em angiotensina II, um potente vaso constritor, pela

ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II inativa a bradicinina, um vasodilatador, aumentando a produção de aldosterona e, conseqüentemente, resultando em diminuição da excreção renal e elevação da retenção de líquidos pelo organismo (LEE et al, 2007). Peptídeos inibidores da ECA estão entre os compostos bioativos mais estudados e, embora diversas proteínas alimentares possam agir como seus precursores, as proteínas lácteas são as mais importantes fontes destes peptídeos (LIGNITTO et al., 2010).

2.4.6 Outros Benefícios

Sendo o triptofano precursor do neurotransmissor serotonina e do hormônio neurosecretor melatonina, alguns autores atribuíram efeitos comportamentais da ingestão dessa proteína no apetite, na saciedade, no humor e na percepção da dor (SGARBIERI, 2004). Félix (2009) considera o soro de leite como o “soro da memória” pelo fato desse subproduto concentrar componentes que atuam sobre os neurônios na formação de suas redes e das sinapses.

2.5 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

2.5.1 Definição e regulamentação

Os suplementos alimentares são definidos como gêneros alimentícios que se destinam a complementar e/ou suplementar o regime alimentar normal, que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias, nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, comercializados em forma doseada, tais como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pó e outras formas semelhantes, que se destinam a ser tomados em doses recomendadas. Desta forma, não são classificados nem como alimentos e nem como fármacos (Figura 1) (GOMES, 2011).

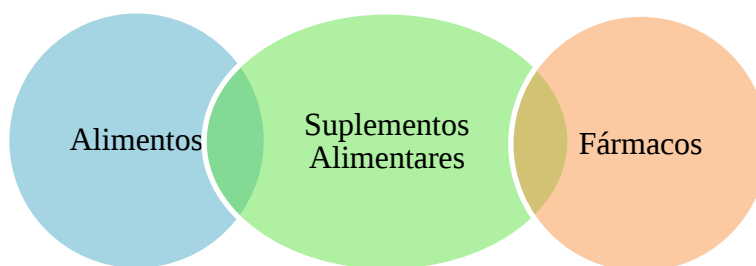


Figura 1. Posição relativa dos suplementos alimentares entre os alimentos e os fármacos (GOMES, 2011).

A legislação brasileira relacionada aos suplementos alimentares para atletas começou a ser determinada em um processo contínuo e dinâmico, desde 1998, que dispunha do conceito dos alimentos para praticantes de atividade física. No processo de melhora da legislação, a consulta pública de 2008 da ANVISA, propôs alterações na categoria de alimentos atualmente denominada “alimentos para praticantes de atividade física”, passando a ser denominados “alimentos para atletas”. Desta forma, em 2010, a resolução RDC n. 18/2010 de 27 de abril, decretou o último posicionamento da ANVISA. Sendo assim, este regulamento se aplica aos alimentos especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades nutricionais específicas e auxiliar no desempenho do exercício. De acordo com esta resolução suplementos protéicos para atletas devem atender aos seguintes requisitos: (I) o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 10 g de proteína na porção; (II) o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 50% do valor energético total proveniente das proteínas; (III) este produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais; (IV) este produto não pode ser adicionado de fibras alimentares e de não nutrientes. Quanto ao requisito de proteínas, referente ao inciso II, a composição protéica do produto deve apresentar PDCAAS acima de 90%. Sendo que a determinação do PDCAAS deve estar de acordo com a metodologia de avaliação recomendada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO/UNU) (BRASIL, 2010).

2.5.2 Mercado Nacional e Internacional

O mercado de suplementos alimentares e nutricionais no Brasil e no mundo tem crescido solidamente, em ritmo muito mais acelerado do que o de outros setores econômicos. Mesmo durante a crise econômica global iniciada em 2009, o setor de suplementos alimentares manteve ritmo acelerado de crescimento. O avanço das tecnologias no setor da saúde bem como a ampliação do conhecimento sobre os benefícios que os suplementos alimentares podem trazer à saúde das pessoas também contribuiu bastante para este crescimento (ABENUTRI, 2014). Estudos desenvolvidos pela Euromonitor International e publicados em julho de 2014 demonstram que cerca de R\$ 461 milhões foram gastos com suplementos para atletas em 2013 (EUROMONITOR, 2014).

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA

O uso da análise proteômica é uma ferramenta poderosa na ciência dos alimentos em termos de otimização de processos e monitoramento da qualidade, rastreabilidade, segurança e avaliação nutricional (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2013). Um grande número de métodos tem sido utilizado no doseamento quantitativo das proteínas do leite, para avaliação do conteúdo de proteína total, caseínas e proteínas do soro. No entanto, como se trata de compostos complexos e cuja quantidade é variável, o seu doseamento é difícil e muitas vezes apenas aproximado. Por outro lado, o grande desenvolvimento e aparecimento de novos tratamentos tecnológicos dos produtos lácteos dificultam ainda mais a sua determinação quantitativa. Nos suplementos a base de soro de leite, a determinação da quantidade de proteínas totais faz-se, normalmente, pelo método de Kjeldahl, método este oficial (FAO/WHO/UNU, 2007).

A cromatografia e a eletroforese têm sido as técnicas mais adequadas para avaliar a qualidade e autenticidade dos produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. A cromatografia é fundamentalmente um processo de separação por migração diferencial entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária, sendo estabelecidas interações entre os solutos e a fase

estacionária, sendo uma metodologia de grande poder informativo nas análises de composição das diferentes frações protéicas encontradas no soro, assim como na composição de aminoácidos (BORDIN et al., 2001; BONFATTI et al., 2008). Já a eletroforese avalia o perfil protéico com base no peso molecular de cada proteína, permitindo assim uma determinação semi-quantitativa das frações protéicas do soro de leite (YOUN-HO & LAWRENCE, 2002; PEDRESCHI et al. 2010).

O valor nutricional de uma proteína alimentar além de depender do tipo e da quantidade de aminoácidos essenciais, depende da sua digestibilidade, ao qual representa a média da eficácia com que pode ser utilizada pelo organismo, ou seja, sua disponibilidade biológica (LEMON et al., 2002; MANNINEN, 2009; BOYE et al., 2012). Uma série de índices podem ser utilizados para medir a qualidade biológica de uma proteína, como os parâmetros: valor biológico – porção de proteína que é retida e absorvida pelo organismo; digestibilidade protéica – porção de proteína do alimento que é digerida pelas enzimas endógenas; utilização protéica líquida – porcentagem de nitrogênio ou proteína dietética que é retida; escore químico de aminoácidos – mede o conteúdo de aminoácidos presentes em uma fonte de proteína e compara os valores com uma proteína tida como referência; e o escore de aminoácidos corrigida pela digestibilidade que é a medida da digestibilidade e disponibilidade de aminoácidos essenciais (WHO/FAO/UNU, 2007). Assim, a qualidade da proteína avaliada pelo escore químico é baseada no aminoácido essencial limitante, no qual valores maiores que 1,0 tanto para o EQ como para o PCDAAS indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades para a dieta de humanos.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 ARTIGO 1: COMPARISON OF PROTEIN AND AMINO ACID PROFILES OF DIFFERENT WHEY PROTEIN SUPPLEMENTS. SUBMITTED TO JOURNAL OF DAIRY SCIENCE (PAPER I)

Comparison of protein and amino acid profiles of different whey protein supplements

Cristine C. Almeida,^{*} Thiago S. Alvares,[†] Marion P. Costa,^{*} and Carlos A. Conte-Junior^{*1}

^{*}Department of Food Technology, Fluminense Federal University, Rio de Janeiro, Brazil. 24230-340.

[†]Nucleus of Basic Nutrition and Dietetics, Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil. 27930-560

¹Author for correspondence:

Carlos Adam Conte Junior

Rua Vital Brazil Filho, n. 64. Santa Rosa

CEP: 24.230-340

Niterói – Rio de Janeiro

Brasil

Phone.: +55 21 2629-9545

E-mail address: carlosconte@id.uff.br (C.A. Conte Junior).

Interpretative summary

Comparison of protein and amino acid profiles of different whey protein supplements. By Almeida et al. Whey protein is a term that encompasses a range of soluble protein fractions found in milk. Dietary supplements derived from these sources are the most commercialized in sports nutrition market due to its high nutritional value. Recent analysis of some Whey Protein brands has generated a globally repercussion, by evidencing irregularities with respect to their protein quality. This study evaluated the protein and essential amino acid contents of different Whey Protein brands manufactured by U.S. and Brazilian companies. Although Whey Protein produced by U.S. companies exhibited greater nutritional quality than Whey Protein produced by Brazilian companies. The results indicated that these products need oversight improvement.

RUNNING HEAD: The nutritional quality of Whey Protein Supplements determined based on protein and essential amino acid profile.

ABSTRACT

Whey protein (WP) supplements have been introduced into the market due to the high nutritional value of the proteins and amino acids they provide. However, some WP supplements may not contain the disclosed amounts of the ingredients listed on the label, which compromising the nutritional quality and the effectiveness of these supplements. The aim of this study was to evaluate and compare the content of total protein (TP), α -lactalbumin (α -LA), β -lactoglobulin (β -LG), free essential amino acids (free EAA) and free branched-chain amino acids (free BCAA), between different brands of WP supplements produced by U.S. companies and by Brazilian companies. Eighteen commercial brands of WP supplements were selected, ten manufactured by U.S. companies (WP-USA) and eight produced by Brazilian companies (WP-BRA). The TP was analyzed using official methods; α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA were analyzed using HPLC system. There were significant higher concentrations of TP, α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA in WP-USA brands, as compared to the WP-BRA brands. Amongst the 18 brands evaluated, four WP-USA and seven WP-BRA had significantly lower values of TP than those specified on the label. In conclusion, the WP-USA supplements showed better nutritional quality as evaluated by TP, α -LA, β -LG, free EAA and free BCAA when compared to WP-BRA.

Keywords: dietary supplement, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, essential amino acid, BCAA.

INTRODUCTION

Whey protein (**WP**) represents almost 20-30% of the total protein in bovine milk, which is a complex mixture of globular protein molecules consisting of α -lactalbumin (**α -La**), β -lactoglobulin (**β -Lg**), and other minor proteins (Urista et al., 2011). The protein fractions α -La and β -Lg (variants A and B) represent almost 70% of the proteins present in whey (Walstra et al., 2006). Both proteins are a valuable source for essential amino acids, and are therefore seen as nutrients that provide important physiological benefits (Toro-Sierra et al., 2013). The WP supplements have been recognized for their high nutritional quality, fast absorption, and as a rich source of essential amino acids (**EAA**), mainly branched-chain amino acids (**BCAA**), such as leucine, isoleucine and valine (Almeida et al., 2013).

In the last few years, the consumption of WP supplements has been recommended to stimulate muscle protein synthesis on physically active individuals (Phillips, 2012). Therefore, the scientific knowledge evidencing the relationship between physical performance, and whey protein consumption promoted the rapid expansion of new dietary supplements manufactured from these proteins (Borsheim, 2002).

According to the Federal Trade Commission, the US consumer protection agency, in recent years hundreds of dietary supplements have been cited with irregularities, including lower quantities of protein than the disclosed values (FTC, 2013). Furthermore, recent analysis of WP supplement generated questioning because some of these products contained high carbohydrates and/or low protein contents than those listed on the ingredients label (Moore, 2010; ConsumerReport, 2014). These observation could be suggestive of lower nutritional quality of the ingredients used (i.e. addition of proteins of low biological value, such as vegetable proteins), the addition of other non-protein ingredients (i.e. carbohydrates), or misleading label description.

Considering the high demand from the physically active population for the use of WP supplements, consumers expect that such products contain a minimum amount of nutrients of high

biological value, necessary to attend the physiological benefits. For these reasons, the aim of this study was to evaluate and compare the content of total protein (**TP**), α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA, between different brands of WP supplements produced by U.S. companies and by Brazilian companies. Furthermore, it was compared the TP content of each WP supplements and the TP value informed on their respective labels.

MATERIAL AND METHODS

Sample selection

The supplements used in the present study were acquired through an online store specialized on nutritional supplements. Eighteen WP supplements were selected from their bestseller list, where 10 WP supplements (WP isolated: n = 5 and WP concentrated and isolated: n = 5) were manufactured by U.S. companies (**WP-USA**) whereas 8 WP supplements (WP isolated: n = 4 and WP concentrated: n = 4) were manufactured by Brazilian companies (**WP-BRA**). All products were within their shelf-life ranging between November 2014 and June 2015.

Total Protein Analysis

The total protein content was evaluated according to the Kjeldahl method and the corresponding nitrogenous materials were converted into % of protein, through the rectifier factor 6.38, according to the AOAC (2012) methods. The analysis was performed in quintuplicate.

Protein Fractions Analysis

A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (**SDS-PAGE**) was performed to identify the main protein fractions in the WP supplements, in order to quantify the majority protein fractions by using an HPLC system. The samples were prepared according to the method described by Criscione et al. (2009), with some modifications, followed by the method developed by Bradford et al. (1976) to estimate the approximate protein concentration in the samples. The stacking gel and resolution gel were 4% and 10% of acrylamide, respectively. The gel was run (120 V, 25 mA for approximately 2 h) after full polymerization and application of 20 μ L of sample (5 mg/mL of protein) in each well. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Blue solution G-250 for 24 h and then destained with a solution of 20% acetic acid, 20% methanol and 60% distilled water until the background was completely clean (Conte-Junior et al., 2006). The destained gels were photographed and the data were evaluated by TotalLab Quant® software to recognize the protein bands by band intensity. The apparent molecular weights were estimated using electrophoresis protein standard.

The quantification of major protein fractions, α -La and β -Lg (variant A and variant B), were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) system. The protein extraction followed the protocol as proposed by Bobe et al. (1998). Before beginning the extraction procedure, all samples were diluted according to the manufacturer's recommendation. After this, 500 μ L of each sample was mixed with 500 μ L of a solution containing 0.1 M BisTris buffer, 6 M Guanidine hydrochloride, 5.37 mM sodium citrate and 19.5 mM d-Dithiothreitol. Each sample was shaken during 10 s and incubated during 1 h at room temperature, and then diluted to 1:3 (v:v) with a solution containing 4.5 M Guanidine hydrochloride. Finally, the sample was filtered through a PVDF membrane of 0.22 μ m.

The HPLC system consisted of a quaternary pump (LC-20AD, Shimadzu Corporation, Japan), analytical column Zorbax 300SB-C8 (4.6 mm ID x 250 mm Agilent Technologies), and a

photodiode array detector monitoring the absorbance at 214 nm (SPD-20A, Shimadzu Corporation, Japan). Elution was carried out at flow rate of $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ using a mixture of two solvents: solvent A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and solvent B was 0.1% TFA in acetonitrile. The total analysis time for per each sample was 45 min. The column temperature was kept at 45°C and the detection wavelength was set at 214 nm. (Bonfatti et al., 2008).

The α -La, β -Lg variant A and β -LG variant B external standards were dissolved with a solvent containing acetonitrile, water, and TFA in a ratio of 100:900:1 (v:v:v) to the final concentrations were $12.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Calibration curve were developed on the basis of six data points (12.5; 6.25; 3.12; 1.56; 0.78; $0.39 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). The samples and standards were conducted in triplicate.

Essential Amino Acids (EAA) Analysis

The free EAA (histidine, threonine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine and lysine) were analyzed as described by Alvares et al. (2012). 50 μL of sample was mixed with 50 μL of 1.5 M HClO_4 in a 1.5 mL microcentrifuge tube. After 2 min at room temperature, 1.125 mL ultrapure water and 25 μL of 2 M K_2CO_3 were added. The tubes were vortexed and centrifuged at 10,000 g for 1 min in a microcentrifuge, and then, 100 μL of the supernatant was diluted with 100 μL of 1.2% benzoic acid and 1.4 mL DD-water. 50 μL of sample was mixed with 50 μL of the o-phthaldialdehyde (OPA) reagent solution (v:v) for 1 min and 50 μL was immediately delivered into the HPLC. The HPLC system was equipped with a quaternary pump (LC-20AD, Shimadzu Corporation, Japan), a 5 μm reversed-phase C18 column (4.6 mm ID x 150 mm from Supelco®) guarded by a 5 μm reversed-phase C18 guard column Ascentis® (4.0 mm ID x 20 mm from Sigma®) and a fluorescence detector (RF-10AXL, Shimadzu Corporation, Japan) monitoring excitation and emission wavelengths at 340 nm and 455 nm, respectively. The samples were separated by gradient using 0.1 M sodium acetate (pH 7.2) and methanol as mobile phase at a flow

of 1.1 mL.min⁻¹. The total running time per sample was 49 min and the column temperature was kept at room temperature.

Statistical analysis

One sample t test was used to identify differences in the content of TP between the brands of WP supplements with the content of TP informed in the respective label. A Mann-Whitney test for independent sample was used to identify differences in TP, α -LA, β -LG, free EAA and free BCAA between the USA and BRA WP supplements. Statistical significance was set at the 0.05 level of confidence. All analyses were performed using a commercially available statistical package (IBM SPSS Statistics version 22 for Mac, Chicago, IL), and the results were expressed as means $\pm$ SD.

RESULTS

Total Protein

The content of total protein of the WP-USA and WP-BRA supplements are shown in the Figure 1. There was a significant difference in TP content between the WP-USA and WP-BRA supplements (72.83 ± 5.8 % vs 63.36 ± 8.4 %).

Among the 10 brands of WP-USA evaluated, the TP content of the 4 brands was significantly lower than that described on their respective labels (WP-USA a: 61.9% vs 74.3%; WP-USA b: 76.6% vs 84.0%; WP-USA d: 79.6% vs 83.3% and WP-USA e: 69.9% vs 81.7%). Regarding the 8 WP-BRA supplements, 7 WP-BRA supplements were significantly lower in TP content than described on the label (WP-BRA a: 75.3% vs 91.7%; WP-BRA b: 62.0% vs 90.0%; WP-BRA d: 67.7% vs 88.7%; WP-BRA e: 58.8% vs 80.0%; WP-BRA f: 72.4% vs 80.0%; WP-BRA g: 60.9% vs 70.0%; WP-BRA h: 62.0% vs 69.7%).

Protein Fractions

The protein profile observed by SDS-PAGE demonstrated that the most expressive bands were viewed in the region with a molecular weight of around 10 and 19 kDa, representing the apparent molecular weight of α -La and β -Lg, respectively, as illustrated in Figure 2.

The content of α -La and β -Lg of the WP-USA and WP-BRA supplements are shown in the Figure 3. There was a significant difference in content of α -La and β -Lg between the WP-USA and WP-BRA supplements (α -La: 5.38 ± 2.0 vs 3.34 ± 2.2 mg/100g; β -Lg: 7.25 ± 4.1 vs 5.43 ± 2.3 mg/100g) (Figure 3). A representative chromatogram of α -La and β -Lg A is shown in the Figure 4.

Amino Acids

The content of free EAA and free BCAA of the WP-USA and WP-BRA supplements are exhibited in the Table 1. There was a significant difference between the WP-USA and WP-BRA supplements for values of total free EAA (378.1 ± 854.9 vs 118.3 ± 183.0 mg/100g) and free BCAA (332.0 ± 816.8 vs 28.9 ± 49.9 mg/100g).

DISCUSSION

The present study was designed with the purpose of evaluating and comparing the content of total protein (TP), α -LA, β -LG, free EAA and free BCAA, among WP supplements produced by U.S. companies and by Brazilian companies. Overall, the result of the study demonstrated that the contents of TP, α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA were greater for WP-USA compared to WP-BRA. In addition, from the 10 WP-USA supplements evaluated, 40% exhibited their total protein

content below that specified on the label; whereas 70% of the 10 WP-BRA supplements showed the same discrepancy.

Tests carried out by Consumer Lab (2014), a private company specialized in the assessment of food quality, also demonstrated similar results: from 24 commercially-produced WP by U.S. companies, 31% of products tests failed in their quality assurance. As reported by Proteste Organization (2014), agency from consumer protection in Brazil, amongst the 28 WP-BRA brands evaluated, 53% exhibited lower values in total protein content as compared to their respective labels.

The difference found in the contents of TP, α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA between WP-USA and WP-BRA supplements may be attributed to the manufacture technology applied in the process of obtaining the WP supplements or in the protein composition of cow milk used for obtaining whey, which can be influenced by the cow's breed, lactation stage or diet (Walstra et al., 2006; Murphy et al., 1993). As describe by Rémond et al. (1999), a gradual and significant decrease in β -Lg and α -La contents during the lactation period can be found in different cow breeds. In study performed by Wu et al. (1994) the supplementation of dairy cows with diets high in fat results in a decrease of protein concentration. According to Jiménez et al. (2012), the chemical additives and factors, such as pressure, temperature, agitation rate and holding time, have been shown to affect pH, protein conformation and the purity of WP supplements.

One another possible explanation for the differences found between and among WP-USA and WP-BRA supplements may be related to the whey protein type. In the present study of the 8 WP-BRA supplements evaluated, 4 were WP isolate (WPI) and 4 WP concentrate (WPC). Of the 10 WP-USA supplements evaluated, 5 were WPI and 5 were WP concentrate and isolate (WPCI). Manufacturing WPC involves ultrafiltration of whey to concentrate proteins and diafiltration to remove most of the lactose, minerals and other low molecular weight components. The retentate is usually further concentrated by evaporation before spray drying to improve the physical properties of the powder, so that the finished dry product contains more than 80% of protein (Carunchia et al.,

2005). WPI is obtained by ion exchange, removing sufficient non-protein constituents from whey so that the finished dry product contains 90% or more protein (Urista et al., 2011). Therefore, WPC should contain at least 80% of protein, WPI more than 90% of protein and WPCI should contain the amount used in each type (Mayyada et al., 2011). In our study of 10 WP-USA, 5 were WPI and 5 were WPCI. Because all of the WP-USA supplements evaluated contained WPI, a better protein and amino acid profile compared to the WP-BRA supplements would be expected, since half of the WP-BRA products analyzed were WPC. However, if we take into account the percentage of protein for each type of WP supplement, none of evaluated brands analyzed achieve the content claimed.

Some manufacturers add specific amino acids such as BCAA in their formulations, to fortify protein supplements, as an alternative to roll back losses caused during processing (Judy et al., 2001). This was observed in two brands of WP-USA and one brand of WP-BRA, which explains the greater values found for valine, leucine and isoleucine in WP-USA. The BCAA (leucine, isoleucine and valine) have been investigated for their anticatabolic and anabolic effects (especially leucine). In skeletal muscle in vitro, increasing the concentration of the three BCAA or L-leucine alone reproduces the effects of increasing the supply of all amino acids in stimulating protein synthesis and inhibiting protein degradation (Miller et al., 2003). Thus, within the context of the potential benefits associated with protein intakes, it is also important to consider the branched chain amino acid (Borsheim et al., 2002; Maughan, 2013). Miller et al. (2003) proposed the existence of a dose-response relation between muscle protein synthesis and amino acid consumption after resistance exercise. They observed a post-exercise stimulation of muscle protein synthesis almost twice as great after ingestion of 6 g compared with only 3 g EAA.

Physical exercise, in general, requires a higher protein intake, which is due to an increased use of amino acids as an energy source in metabolism (Layman, 2003; Ha et al., 2003); however, the variation of amino acid composition in whey protein supplements may influence the intensity of the response expected. Therefore, the nutritional value of a dietary protein should be taken into account, particularly the EAA, responsible for stimulate muscle protein synthesis (Millward, 2008).

Consumers expect that a supplement indeed contains the ingredients and amounts as listed on the label; however, this is not always the case and evidence for poor quality control has been frequently reported (FDA). It is difficult to assess the extent of these problems, because there is no comprehensive testing program for these supplements to ensure the composition and effects of these products; meaning that these supplements can be sold at the manufacturer's discretion (Kreider et al., 2010).

CONCLUSIONS

Overall, the WP supplements analyzed had varying amounts of TP, α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA. The results of the present study indicated that the WP-USA supplements showed better nutritional quality, as evaluated through contents of TP, α -La, β -Lg, free EAA and free BCAA comparing to the brands of WP-BRA. This data emphasize the need to improve the oversight with respect to the quality of WP supplements sold on the market, regardless of the origin of the manufacture.

Acknowledgments

The authors would thank Ricky Toledano for preparing the English version of the manuscript and The Research Foundation of the State of Rio de Janeiro - FAPERJ and National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) by provided financial support for the study (process no. E-26/103.003/2012 and 311361/2013-7, respectively). CA and MC were supported by scholarship from CNPq

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest that are directly relevant to the content of this manuscript.

REFERENCES

- Almeida, C.C.; Conte-Júnior, C.A.; Silva, A.C.O.; Alvares, T.S. 2013. Whey protein: Composition and functional properties. *Encicl. Bio.* 9: 1840—1854.
- Alvares, T.S.; Conte-Júnior, C.A.; Paschoalin, V.M.F.; Silva, J.T.; Meirelles, C.M.; Bhambhani, Y.N.; Gomes, P.S.C. 2012. Acute L-arginine supplementation increases muscle blood volume but not strength performance. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 37: 115—126.
- AOAC International. 2012. Official methods of analysis. 19th ed. AOAC International Gaithersburg, MD.
- Bobe, G.; Beitz, D.C.; Freeman, A.E.; Lindberg, G.L. 1998. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 46: 458—63.
- Bonfatti, V.; Grigoletto, L.; Cecchinato, A.; Gallo, L.; Carnier, P. 2008. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *J. Chromatogr. A*, 1195: 101—106.
- Borsheim, E.; Tipton, K.D.; Wolf, S.E.; Wolfe, R.R. 2002. Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am. J. Physiol.* 283: 648—657.
- Bradford M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248—254.
- Carunchia, W.M.E.; Croissant, A.E.; Drake, M.A. 2005. Characterization of dried whey protein concentrate and isolate flavor. *J. Dairy Sci.* 88: 3826—39.
- ConsumerLab. 2014. Protein Powders and Drinks Review - for Body Building, Sports & Dieting. Accessed Jun. 21, 2014. https://www.consumerlab.com/reviews/Protein_Powders_Shakes_Drinks_Sports_%20Meal_Diet/NutritionDrinks/.

- ConsumerReport.org. 2010. Consumer Reports Magazine. How much protein? Accessed Jun. 23, 2014. <http://www.consumerreports.org/cro/magazine-archive/2010/july/food/protein-drinks/how-much-protein/index.htm>.
- Conte-Junior, C.A.; Golinelli, L.P.; Paschoalin, V.M.; Silva, J.T. 2006. Desarrollo de la técnica de fraccionamiento de proteínas presentes en el suero del calostro por electroforesis bidimensional para su identificación por espectrometría de masa (MALDI-TOF). *Alimentaria*. 373: 120—121.
- Criscione, A.; Cunsolo, V.; Bordonaro, S.; Guastella, A.M.; Saletti, R.; Zuccaro, A.; D’Urso, G.; Marletta, D. 2009. Donkey’s milk protein fraction investigated by eletrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *Int. Dairy J.* 19: 190—197.
- Federal Trade Commission. 2013. Dietary Supplements: An Advertising Guide for Industry. Accessed Jul. 31, 2014 <http://www.business.ftc.gov/documents/bus09-dietary-supplements-advertising-guide-industry>.
- Jiménez, X.T.; Cuenca, A.A.; Jurado, A.T.; Corona, A.A.; Urista, C.R.M. 2012. Traditional Methods for Whey Protein Isolation and Concentration: Effects on Nutritional Properties and Biological Activity. *J. Mex. Chem. Soc.* 4: 369—377.
- Judy, A.D.; Ira W. 2001. Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sport nutrition. *Br. J. Nutr.* 85: 511—512.
- Kreider, R.B.; Wilborn, C.D.; Taylor, L.; Campbell, B.; Anthony, L.A.; Collins, R.; Cooke, M.; Earnest, C.P.; Greenwood, M.; Kalman, D.S.; Kerksick, C.M.; Kleiner, S.M.; Leutholtz, B.; Lopez, H.; Lowery, L.M.; Mendel, R.; Smith, A.; Spano, M.; Wildman, R.; Willoughby, D.S.; Ziegenfuss, T.N.; Antonio, J. 2010. ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 7—7.
- Layman, D.K. 2003. A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women. *J. Nutr.* 133: 411—417.

- Maughan, R.J. 2013. Quality assurance issues in the use of dietary supplements, with special reference to protein supplements. *J. Nutr.* 143: 1843—1847.
- Mayyada, M.H.E.; Howard, A.C. 2011. Trends in whey protein fractionation. *Biotechnol. Lett.* 33: 1501—1511.
- Miller, S.L.; Tipton, K.D.; Chinkes, D.L.; Wolf, S.E.; Wolfe, R.R. 2003. Independent and combined effects of amino acids and glucose after resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35: 449—55.
- Millward, D.J.; Donald, Layman, K.D.; Schaafsma, G. 2008. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. *Am. J. Clin. Nutr.* 87: 1576—1581.
- Moore, J.C.; Spink, J.; Lipp, M. 2012. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 4: 77—82.
- Murphy, J.J.; O'Mara, F. 1993. Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact on the dairy industry. *Livest. Prod. Sci.* 35: 117—134.
- Ha E.; Zemel M.B. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J. Nutr. Biochem.* 14:251—258.
- Phillips, S.M. 2012. Dietary protein requirements and adaptive advantages in athletes. *Br. J. Nutr.* 12: 158—167.
- Proteste.org. Protest Consumers Association. Irregularities in dietary supplements. Accessed: Jul. 23, 2014. <http://www.proteste.org.br/institucional/imprensa/press-release/2014/proteste-encontra-irregularidades-em-suplementos-para-atletas>.
- Rémond, B.; Coulon, J.B.; Nicloux, M.; Levieux, D. 1999. Effect of once-a-day milking in early lactation on milk production and nutritional status of dairy cows. *Ann. Zootech.* 48: 341—352.

- Toro-Sierra, J.J.S.; Ulrich K. 2013. Impact of spray-drying conditions on the particle size of microparticulated whey protein fractions. *Dairy Sci. Technol.* 93: 4—5.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). Available in: <http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/default.htm>
- Urista, M.C.; Álvarez, F.R.; Riera, R.F.; Cuenca, A.A.; Téllez, J.A. 2011. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Sci. Technol. Int.* 4: 293—317.
- Walstra, P.; Wouters, J.T.M.; Geurts, T.J. 2006. *Dairy science and technology*, 2nd ed.; Taylor & Francis Group; New York, EUA, 1: 166—167.
- Wu, Z.; Huber J.T. 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Livest. Prod. Sci.* 39: 141—155.

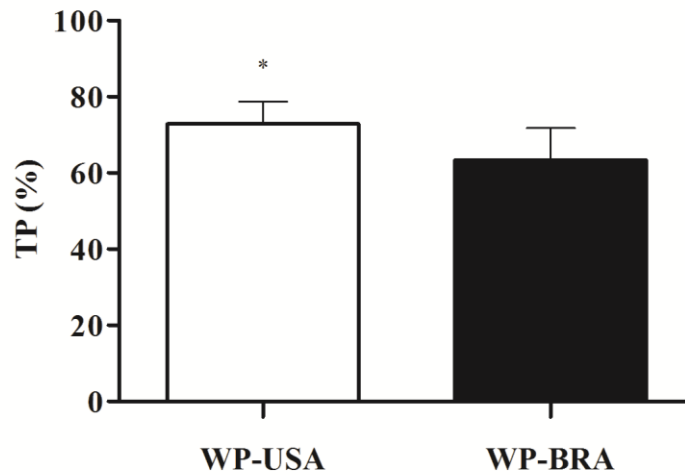


Figure 2. Total protein (%) of WP-USA (A) and WP-BRA (B) supplements. TP = total protein; WP-USA = whey protein supplements produced by U.S. companies; WP-BRA = whey protein supplements produced by Brazilian companies. The symbol * ($P < 0.05$) denotes significantly different from WP-BRA.

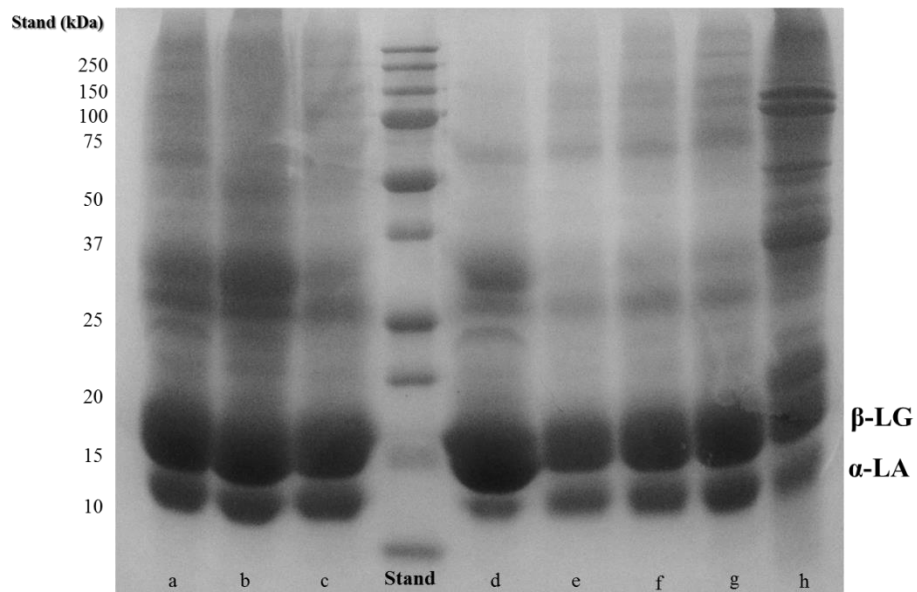


Figure 3. Representative protein profile of the 8 WP-BRA supplements evaluated by SDS-PAGE.

α -LA = α -lactalbumin; β -LG = β -lactoglobulin.

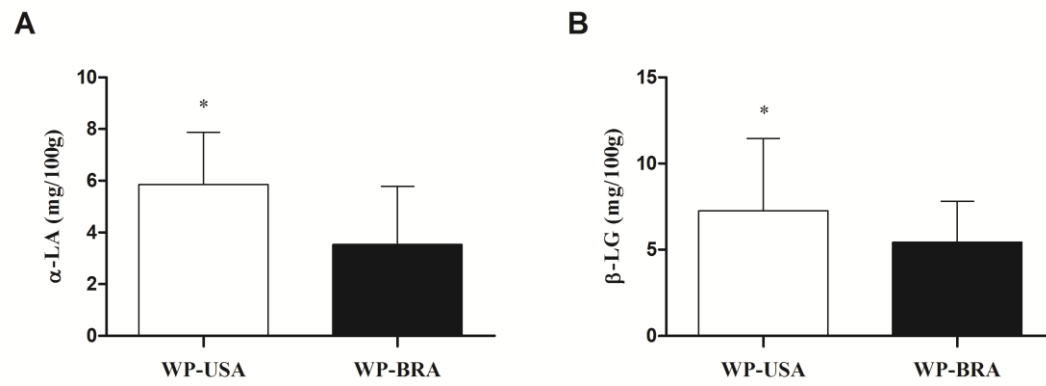


Figure 4. Content of α -LA (A) and β -LG (B) of WP-USA and WP-BRA supplements. α -LA = α -lactalbumin; β -LG = β -lactoglobulin; WP-USA = whey protein supplements produced by U.S. companies; WP-BRA = whey protein supplements produced by Brazilian companies. The symbol * ($P < 0.05$) denotes significantly different from WP-BRA.

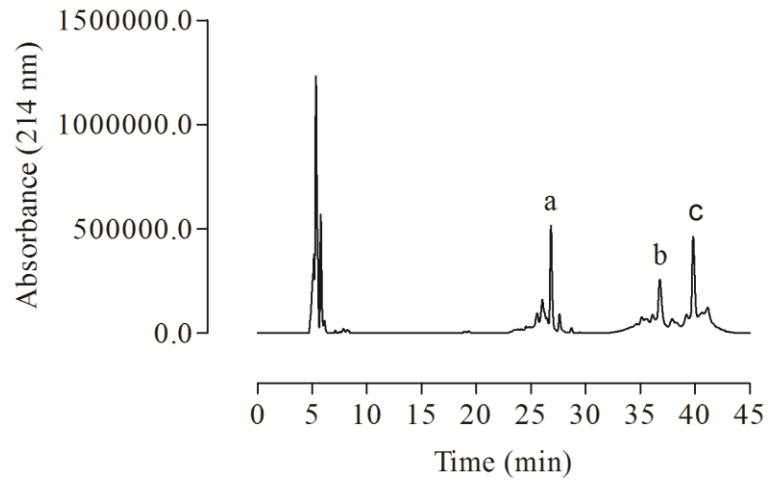


Figure 5. Representative chromatogram of one of the WP-USA brand. α -lactalbumin (a, 26 min); β -lactoglobulin variant A (b, 36 min); β -lactoglobulin variant B (c, 39 min).

Table 2. Concentration (mg/100g) of free essential amino acid (free EAA) and the free branch-chain amino acids (free BCAA) of WP-USA and WP-BRA supplements.

Amino acid	WP-USA	WP-BRA	P value
Histidine	2.73±1.9	11.67±21.8	0.011*
Isoleucine	95.52±232.3	7.88±13.9	0.003*
Leucine	125.61±305.9	11.30±19.0	0.004*
Lysine	21.12±18.5	47.25±61.1	0.004*
Methionine	5.27±8.1	5.12±7.6	0.158
Phenylalanine	13.82±17.5	16.53±28.0	0.945
Threonine	3.13±4.3	9.24±16.7	0.006*
Valine	110.90±278.8	9.76±17.0	0.005*
Σ EAA	378.12±854.9	118.75±183.0	0.011*
Σ BCAA	332.04±816.7	28.95±49.9	0.004*

The values are mean ± standard deviation. WP-USA = whey protein supplements produced by U.S. companies; WP-BRA = whey protein supplements produced by Brazilian companies; BCAA (valine, isoleucine and leucine). The symbol * denotes a significant difference between WP-USA and WP-BRA.

3.2 ARTIGO 2: *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF COMMERCIAL WHEY PROTEIN SUPPLEMENTS. SUBMITTED TO FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY (PAPER II)

***In vitro* digestibility of commercial whey protein supplements**

Cristine Couto Almeida ^{1,*}, Maria Lúcia Guerra Monteiro ¹, Bruno Reis Carneiro da Costa-Lima ¹, Thiago Silveira Alvares ², Carlos Adam Conte-Junior ¹

¹Department of Food Technology, Universidade Federal Fluminense, 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. ²Nucleus of Basic Nutrition and Dietetics, Nutrition Institute, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 27930-560, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil.

* Corresponding author. Telephone number: + 55-021-2629-9545

E-mail address: carlosconte@id.uff.br (C.A. Conte Junior).

HIGHLIGHTS

- WP supplement were investigated using protein digestibility and amino acid content
- U.S. supplements exhibited greater digestibility than Brazilian supplements
- WP supplements contained adequate EAA content for non-athletic adult
- WP supplements were unable to supply adult athlete EAA suggested requirement

ABSTRACT

Amongst the sport dietary supplements, those manufactured with whey protein (WP) represent an important amino acid source especially due to its high biological value. However, as a result of product lack of uniformity, the nutritional quality of this type of product is uncertain. Thus, the aim of this study was to investigate the protein quality of WP supplements ($n = 7$) produced by U.S. (WP-USA), and Brazilian companies (WP-BRA), evaluating the *in vitro* protein digestibility, and the essential amino acid (EAA) composition. In addition, the amino acid (AAS) and protein digestibility-corrected amino acid (PDCAAS) scores were calculated. Although WP-USA supplement exhibited greater ($P < 0.05$) digestibility than WP-BRA counterparts, both WP supplements exhibited greater ($P < 0.05$) digestibility than soy and caseinate isolate supplements, which were used as reference. Considering the WHO/FAO/UNU protein standard for non-athletic adult, the WP-USA and WP-BRA supplements scored high AAS. In addition, the PDCAAS values on both supplement groups were >1.0 , with exception of threonine and valine in WP-USA, and isoleucine and leucine in WP-BRA. However, when the calculated AAS and PDCAAS based on the suggestion for adult athletes were considered, both supplements exhibited suboptimal score values for several EAA. In addition, both WP-USA and WP-BRA supplements were unable to supply the suggested adult athlete EAA requirement.

Keywords: Essential amino acid; Amino acid score; Protein digestibility-corrected amino acid score; protein quality.

1. Introduction

Protein supplements are one of the most widely supplements consumed by athletes and physically active individuals (Phillips, 2012). Amongst the ingredients used to manufacture this type of product (i.e. caseinates, whey, egg, soy, and wheat proteins; Rufián-Henare et al., 2005), the whey protein (WP) are the most commercialized ones in the sports nutrition market due to its high nutritional value when compared to other common dietary proteins (Ha et al., 2003; Haraguchi et al., 2006; Khanam et al., 2013).

Differences on the physico-chemical composition of WP supplements potentially influence its nutritional effect on the human body (Manninen, 2009). Protein quality of WP supplement may be determined by the amino acid composition, bioavailability of essential amino acid, protein digestibility, and physiological utilization of a specific amino acids after digestion and absorption (Lemon et al., 2002).

The amino acid score (AAS) is a rates individual amino acid (non-essential and essential) content in a food matrix. Regarding whey protein supplements, the most important amino acids (EAA) are the essential ones, where the branched-chain amino acids (BCAA) leucine, isoleucine and valine are associated with increase on the skeletal muscle protein synthesis (Rankin & Darragh, 2006).

Moreover, protein digestibility is an important factor to estimate the protein availability for intestinal absorption after digestion reflecting on the efficiency of protein utilization on diet (FAO/WHO/UNU, 2007). The *in vitro* protein digestion assay (IVPD) is a widely used method to determine the digestibility parameter. The IVPD mimics conditions simulated by the digestive processes occurring in the human gastrointestinal tract through proteolytic enzymes (i.e. pepsin-pancreatin enzyme system or papain system), measuring the percentage of proteins which is hydrolyzed by such enzymes (Hur et al., 2011). This method is faster, more affordable, and equally effective than *in vivo* assays (Pires et al., 2006).

The AAS does not consider whether the protein is digestible or not (Mokrane et al., 2010). Therefore, protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) is a recognized and approved method for evaluating protein quality taking into account the AAS and the digestibility parameter of the food matrix. This parameter derives from the AAS, and is corrected based on the digestibility assay of the protein (FAO/WHO/UNU, 2007).

Several reports investigated the technological properties of whey protein as ingredients into a wide variety of products (Bhushan & Etzel, 2009; Urista et al., 2011; Youn-Ho & Lawrence, 2002) such as, infant formula (Jost et al., 1999; Lönnerdal, 2014; ShuAng et al., 2014); in addition, studies were already undertaken to correlate the intake of whey protein supplements with physical performance (Hoffman et al. 2008; Hulmi et al., 2010; Uchida et al., 2008). However, there is limited information regarding the WP supplement protein quality. In this context, the purpose of this study was to investigate the protein quality of commercial WP supplements produced by U.S. and Brazilian companies based on *in vitro* digestibility (IVPD) assay, EAA, AAS and PDCAAS.

2. Material and methods

2.1. Sampling

All samples (WP, soy protein, and caseinate isolate powder) used in the present study were acquired from a commercial retailer specialized on nutritional supplements. Fifteen WP supplements manufactured at different countries were investigated, eight from USA companies (WP-USA), and seven from Brazilian companies (WP-BRA). In addition, supplements manufactured with soy protein and caseinate isolate powder were used as references.

2.2. *In vitro* protein digestibility (IVPD) assay

The *in vitro* protein digestibility was evaluated based on method described by Akesson and Stahmann (1964), with modifications. Briefly, 250 mg of each sample was suspended in 15 mL of 0.1N HCl containing 1.5 mg/ml pepsin (Sigma®, St. Louis, MO, USA), and incubated for 3 h at 37 °C in a water bath. The pepsin hydrolysis ceased after neutralization with the addition of 7.5 mL of 0.5 N of NaOH. Then, the pancreatic digestion initiated with the addition of 10 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 8.0) containing 10 mg of pancreatin (Sigma®, St. Louis, MO, USA) with 1 mL of 0.005 M sodium azide to prevent microbial growth, and were incubated at 37 °C overnight. After the pancreatic hydrolysis, 1 mL of 10% of trichloroacetic acid was added, followed centrifugation at $503 \times g$ for 20 min. The supernatant was collected, and the protein content was estimated based on the nitrogen content using Kjeldahl AOAC method 930.29 (AOAC, 2012). For comparative purpose, supplements manufactured with soy protein and caseinate isolate powder were used as references. The IVPD values were calculated according to the equation:

$$\% \text{Digestibility} = (N_s - N_b) \times 100 \times N_s^{-1}$$

Where N_s and N_b represent the nitrogen content in sample and blank, respectively.

2.3. *Determination of essential amino acids content (EAA)*

The essential amino acids (histidine, threonine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine and lysine) content were analyzed by high-performance liquid chromatography, using method described by Alvares et al. (2012). Briefly, 50 µL of sample previously diluted according to the manufacturer's recommendation, was mixed with 50 µL of 1.5 M perchloric acid (v/v). After 2 min at room temperature, 1.125 mL of ultrapure water and 25 µL of 2 M potassium

carbonate were added. The tubes were centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 min, and then, 100 μ L of the supernatant was diluted with 100 μ L of 1.2% benzoic acid and 1.4 ml of ultrapure water. The amino acids were identified using a pre-column derivation with o-phthaldialdehyde (Sigma®, St. Louis, MO, USA). The HPLC instrument was equipped with a quaternary pump (LC-20AD, Shimadzu Corporation, Japan), a 5 μ m reverse-phase C18 column (4.6 mm ID x 150 mm from Supelco®, Bellefonte, PA, USA) guarded by a 5 μ m reverse-phase C18 guard column Ascentis® (4.0 mm ID x 20 mm from Sigma®, Bellefonte, PA, USA), and a fluorescence detector (RF-10AXL, Shimadzu Corporation, Japan) monitoring excitation and emission wavelengths at 340 nm and 455 nm, respectively. The samples were separated by mobile phase gradient using 0.1 M sodium acetate (pH 7.2), and methanol at 1.1 mL/min flow. The total running time per sample was 49 min and the column temperature was kept at room temperature.

2.4. Amino acid score (AAS) and protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS)

The AAS was calculated for each essential amino acid, and were compared with the reference for amino acid daily requirement for a non-athletic adult (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007), as well as, the value for an athlete adult suggested by Jeukendrup & Gleeson (2009). The PDCAAS were calculated by multiplying the AAS value of each essential amino acid by the protein digestibility.

2.5. Statistical analysis

Different ($n = 7$) WP supplements (eight WP-USA, and seven WP-BRA) were used in this study. Differences on EAA, AAS and PDCAAS values between WP-USA and WP-BRA were evaluated using Student's *t* test. In addition, the difference on IVPD amongst WP supplements (USA and BRA) and supplements manufactured with soy protein and caseinate isolate powders

were investigated using ANOVA followed by Tukey's test. All statistical analyses were performed using Graphpad 5 Prism) (La Jolla, CA, USA) considering 95% of confidence level. The results were expressed as mean $\pm$ standard error.

3. Results and discussion

WP-USA supplements exhibited greater IVPD ($P < 0.05$) than WP-BRA supplements (Figure 1). To the best of our knowledge there is lack of information regarding the digestibility of WP supplements. Nevertheless, this parameter is an important factor to determine the nutritional quality of these products (FAO/WHO/UNU, 2007). The variation on IVPD values is potentially explained by differences on the overall composition of such supplements, particularly with respect to the protein quality (Eriksen et al., 2010; Sindayikengera & Wen-shui, 2006). In addition, differences on protein quality is potentially related to processing conditions, including farm practices, period of lactation, whey extraction method, method of purification (membrane filtration versus ion exchange), and thermal processing (Onwulata et al., 2004; Walstra et al., 2006).

Protein modification plays an important role on food quality and its attributes. Modifications such as amino acid side chain oxidation; protein-protein cross-linking and backbone cleavage can negatively influence product properties including decrease on nutritional value, digestibility, functionality, and health claims (Kerwin & Remmele, 2007).

Amongst the WP supplements available the most widely consumed ones are formulated using whey protein concentrate (WPC), whey protein isolate (WPI), or a blend of concentrate and isolate. The difference between WPC and WPI depends on the processing condition during the protein purification step (Maughan, 2013; Urista et al., 2011), which affects the protein content; WPC and WPI usually contain 35-80%, and $\geq 90\%$ of protein content, respectively (Carunchia et al., 2005).

During the manufacture of WPC and WPI, the thermal processing potentially negatively affect protein quality, biological availability of amino acids, and digestibility (Rufián-Henares et al., 2007). Thus, according to Lacroix et al. (2008) the greater the processing temperature the greater is the negative impact on protein digestibility.

Furthermore, the IVPD value from soy protein powders (55.2 ± 4.0) and caseinate isolate powder (83.73 ± 1.3) were lower ($P < 0.05$) than WP-USA and WP-BRA supplements (Figure 2). Different proteins sources promote distinct positive effects for both protein supplementation, and athletic performance (Hoffman et al., 2004). The consumption of different proteins sources stimulates different anabolic responses depending on the tissue type (Phillips, 2011; Tang et al., 2009). Tang et al. (2009) investigated the influence of isonitrogenous quantities of soy, casein, and whey protein on the stimulation of muscle protein synthesis, and concluded that the ingestion of whey protein promoted greater increase on blood essential and branched-chain amino acids content than either casein or soy. This effect may be related to how quickly whey proteins are digested (Hall et al., 2003).

The IVPD values reported on this study are in agreement with those documented by Mokrane et al. (2010) and Sindayikengera & Wen-shui (2006). Furthermore, Pires et al. (2006) evaluated the influence of protein source on the protein digestibility, and reported that soy protein exhibited the lowest protein digestibility when compared to casein and whey proteins. This observation is potentially attributed to the fact that animal sources have greater protein biological value than vegetable sources due to the lack of one or more essential amino acids in the latter one (Butts, et al., 2012; Lowery et al., 2012). Moreover, anti-nutritional factors also contribute to decrease the protein digestibility on vegetable sources (Pires et al., 2006). In terms of casein proteins, although they exhibit high biological value, the caseins undergo less digested and absorbed than whey proteins (Sindayikengera et al., 2006; Wilson & Wilson, 2006) because of coagulation of caseins at the acidic pH of the digestive tract (Marcus et al., 2010).

Essential amino acid content, AAS and PDCAAS of WP-USA and WP-BRA, calculated based on the reference values suggested by the Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007), are exhibited on Table 1. In terms of individual essential amino acid contents, isoleucine, lysine, and valine exhibited similar ($P > 0.05$) values between WP-USA and WP-BRA. Leucine and phenylalanine were greater ($P < 0.05$) on WP-USA than their counterparts while, histidine, methionine and threonine were greater ($P < 0.05$) on WP-BRA than on WP-USA. Supplements manufactured by USA and Brazilian companies demonstrated elevated scores for the majority of the investigated essential amino acids. However, leucine on WP-BRA supplements demonstrated values lower than 1.0; essential amino acids exhibiting AAS below 1.0 were regarded as a limiting amino acid (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007). Regarding the AAS values, both WP-USA and WP-BRA exhibited similar ($P > 0.05$) scores for isoleucine, lysine, and valine. In addition, leucine and phenylalanine were greater ($P < 0.05$) on WP-USA than their Brazilian counterparts while, histidine, methionine and threonine were greater ($P < 0.05$) on WP-BRA than on WP-USA. Based on the digestibility correction calculation it was observed that the PDCAAS values were numerically lower than 1.0 for threonine and valine on WP-USA; and isoleucine and leucine, on WP-BRA. In addition, WP-BRA exhibited the lowest value for PDCAAS when compared to WP-USA. Because of the greater *in vitro* protein digestibility observed on WP-USA than WP-BRA, its PDCAAS values demonstrated a smaller decrease when compared to their respective AAS values. This observation corroborates the usefulness of PDCAAS to better investigate the amino acidic quality of food products as the food matrix digestibility is considered (Mokrane et al., 2013).

International health agencies established the daily protein intake requirement based on non-athletic individuals as an effort to estimate general population (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007). At cellular level, the increased requirement for protein input on strength-trained athletes reflects the biological adaptation to support muscle protein accretion stimulated by increased protein synthesis rather than protein catabolism; thus, adult athletes potentially require

greater protein intake (up to 125% accretion) than non-athletic individuals (Lemon, 1997; Phillips, 2014). Therefore, to investigate if WP supplements meet suggested adult athlete requirements (Jeukendrup & Gleeson, 2009), it was applied a 2-fold adjustment to the Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007) suggested values.

The AAS and PDCAAS values for WP-USA and WP-BRA calculated based on the suggestion for adult athletes are exhibited on Table 2. Both supplements demonstrated AAS values lower than 1.0 for the majority of the essential amino acids evaluated. However, histidine, lysine, and phenylalanine values on WP-USA, and histidine, lysine, methionine, and phenylalanine values on WP-BRA were above the reference value. In terms of AAS values, leucine and phenylalanine values were greater ($P < 0.05$) on WP-USA than on WP-BRA whereas, histidine, methionine and threonine values were greater ($P < 0.05$) on WP-BRA than on WP-USA. As for PDCAAS values only lysine and phenylalanine on WP-USA; and histidine and lysine on WP-BRA, demonstrated scores above the suggested values for adult athlete. Furthermore, WP-USA and WP-BRA supplements exhibited similar numeric values for isoleucine, lysine, and valine on both AAS and PDCAAS parameters.

The AAS is a ratio between the actual content of individual amino acids in food/diet and the suggested requirement value of such amino acid (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007). This parameter does not consider whether the protein is digestible or not (Mokrane et al., 2010) thus, the PDCAAS was developed to adjust the AAS according to the food protein digestibility, and has being a widely adopted method to evaluate the protein quality of food products (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007). According to Boye et al. (2012), PDCAAS values greater than 1.0, should be truncated thus, their values are considered equal to 1.0 (meaning it is 100% of the daily requirement). In the present study, the essential amino acids with PDCAAS values below 1.0, considering the suggested reference for non-athletic adult, were threonine and valine, and isoleucine and leucine, on WP-USA and on WP-BRA supplements, respectively. However, when the PDCAAS values suggested for adult athletes are considered, only lysine and

threonine in WP-USA, and histidine and lysine on WP-BRA exhibited values higher than the recommended values. According to Phillips (2011), the high-quality protein products (PDCAAS > 1.0) contain increased levels of branched-chain amino acids. Several authors previously reported that the high content of BCAA, particularly leucine, are important stimulating factors for protein synthesis (Hoffman et al. 2008; Hulmi et al., 2010; Uchida et al., 2008). WP-USA supplements contained PDCAAS values of BCAA greater than the required level for non-athletic adult, while on WP-BRA supplements only one BCAAs (valine) score was greater than 1.0. Nevertheless, considering the recommended values for adult athletes, neither WP-USA nor WP-BRA supplements reached the value. According to Judy et al. (2001), the addition of specific amino acids such as BCAA, are frequently used to fortify protein supplements, and is also used as an alternative to nullify or even reverse the loss of these essential amino acids during processing.

4. Conclusion

The present study demonstrated that the protein quality of USA and Brazilian whey protein supplements are different. Although the WP-USA and WP-BRA are appropriate for non-athletic adult, in the case of athletic adult, both supplements exhibited suboptimal score values for several essential amino acids. Whey protein manufactures should revised the processing techniques in order to optimize the protein quality of WP products.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (process no. E-26/103.003/2012, FAPERJ, Brasil) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (process no. 311361/2013-7, CNPq, Brasil) for the financial support. Almeida, C. was supported by CNPq graduate scholarship.

6. References

- Akeson, W. R. & Stahmann, M. A. (1964). A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *Journal of Nutrition*, 83, 257—261.
- Alvares, T. S., Conte-Júnior, C. A., Paschoalin, V. M. F., Silva, J. T., Meirelles, C. M., Bhambhani, Y. N., & Gomes, P. S. C. (2012). Acute L-arginine supplementation increases muscle blood volume but not strength performance. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 37, 115—126.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2012). Official methods of analysis of AOAC (18th ed.). Vol. 1 Gaithersburg, MD, Method 930.29
- Bhushan, S. & Etzel, M. R. (2009). Charged Ultrafiltration Membranes Increase the Selectivity of Whey Protein Separations. *Journal of Food Science*, 74, E131—E139.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108, S183—S211.
- Butts, C. A., Monro, J. A., & Moughan, P. J. (2012). In vitro determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans. *British Journal of Nutrition*, 108, S282—S287.
- Carunchia, W. M. E., Croissant, A. E., & Drake, M. A. (2005). Characterization of dried whey protein concentrate and isolate flavor. *Journal of Dairy Science*, 88, 3826—3839.
- Eriksen, E. K., Halvor, H., Jensen, E., Ragnhild, A., Tove, G. D., Jacobsen, M., & Vegarud, G. E. (2010). Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition*, 104, 374—381.
- Ha, E. & Zemel, M. B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 251—258.

- Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, 89, 239—48.
- Haraguchi, F. K., Abreu, W. C., & Paula, H. (2006). Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. *Revista Brasileira de Nutrição*, 19, 479—488.
- Hoffman, J. R. & Falvo, M. J. (2004). Protein - which is best? *Journal of Sports Science and Medicine*, 3, 118—130.
- Hoffman, N. R., Tranchina, C., Rashti, S., Kang, J., & Faigenbaum, A. (2008). Effects of a pre- and post-exercise whey protein supplement on recovery from an acute resistance training session. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 5, 1—2.
- Hulmi, J. J., Christopher, M. L., & Jeffrey, R. S. (2010). Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & Metabolism*, 51, 1—11.
- Hur, S., Jin, B. O., Lim, E. A., Decker, D., & Julian M. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1—12.
- Jeukendrup, A. & Gleeson, M. (2009). *Sport Nutrition: an introduction to energy production and performance* (2nd ed.). Champaign: Human Kinetics.
- Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. In *World health organization technical report series*, 935 (pp. 1—265).
- Jost, R., Maire, J. C., Maynard, F., & Secretin, M. C. (1999). Aspects of whey protein usage in infant nutrition, a brief review. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 533—542.
- Judy, A.D. & Ira W. (2001). Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sport nutrition. *British Journal of Nutrition*, 85, 511—512.

- Kerwin B. A. & Remmele R. L. J. (2007). Protect from light: Photodegradation and protein biologics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 1468—1479.
- Khanam, A., Kumkum, R. C. G., & Swamylingappa, B. (2013). Functional and nutritional evaluation of supplementary food formulations. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 309—316.
- Lacroix, M., Cyriaque, B., Cécile, B., Joëlle, L., Benamouzig, R., Luengo, C., Fauquant, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2008). Ultra high temperature treatment, but not pasteurization, affects the postprandial kinetics of milk proteins in humans. *Journal of Nutrition*, 138, 2342—2347.
- Lemon, P. W., Berardi, J. M., & Noreen, E. E. (2002). The role of protein and amino acid supplements in the athlete's diet: does type or timing of ingestion matter? *Current Sports Medicine Reports*, 4, 214—221.
- Lönnerdal, B. (2014). Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*, 99, S712—S717.
- Lowery, L., Edel, J. F., & McBride, I. M. (2012). Dietary protein and strength athletes. *Strength and Conditioning Journal*, 34, 26—32.
- Manninen, A. H. (2009). Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutrition & Metabolism*, 6, 1—5.
- Marcus, E. L., Arnon, R., Sheynkman, A., Caine, Y. G., World, J., & Lysy, J. (2010). Esophageal obstruction due to enteral feed bezoar: A case report and literature review. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2, 352—356.
- Maughan, R. J. (2013). Quality assurance issues in the use of dietary supplements, with special reference to protein supplements. *Journal of Nutrition*, 143, S1843—S1847.
- Mokrane, H., Houria A., Naima, B. B., Christophe M.C., Jan A.D., & Boubekour, N. (2010). Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. *Food Chemistry*, 121, 719—723.

- Onwulata, C. I., Konstance, R. P., & Tomasula, P. M. (2004). Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. *Journal of Dairy Science*, 87, 749—756.
- Phillips, S. M. (2011). The science of muscle hypertrophy: making dietary protein count. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70, 100—103.
- Phillips, S. M. (2012). Dietary protein requirements and adaptive advantages in athletes. *British Journal of Nutrition*, 12, S158—S167.
- Phillips, S. M. (2014). A brief review of critical processes in exercise-induced muscular hypertrophy. *Sports Medicine*, 44, S71—S77.
- Pires, C., Vieira, M. G., José, C. R., & Neuza, M. B. C. (2006). Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources. *Food Science and Technology*, 26, 179—187.
- Rankin, D., & Darragh, A. (2006). Dietary protein in an endurance exercise recovery beverage - What is the value of whey? *American Dairy Products Institute*, 22, 13—24.
- Rufián-Henares, J. A., Andrade, C. D., Jiménez-Pérez, S., & Morales, F. J. (2007). Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. *Food Chemistry*, 101, 573—578.
- Shuang, L., Zhang, T., Ming-Ming, C., Huang, B., & Yi-Ping, R. (2014). Evaluation of amino acid conversion method for calculating whey protein content in infant formula powder. *Journal of Food Safety and Quality*, 5, 219—226.
- Sindayikengera, S. & Wen-shui, X. (2006). Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7, 90—98.
- Tang, J. E., Moore, D. R., Kujbida, G. W., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009). Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: Effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *Journal of Applied Physiology*, 107, 987—992.

- Uchida, M. C., Bacurau, A. V. N., Aoki, M. S, & Bacurau, R. F. P. (2008). Branched-chain amino acids ingestion does not affect endurance performance. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 14, 42—45.
- Urista, C. M., Fernández, R. A., Rodriguez, F. R. A, Cuenca, A. A., & Téllez, A. J. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17, 293—317.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy science and technology* (2nd ed.). Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
- Wilson, J. & Wilson, G. J. (2006). Contemporary issues in protein requirements and consumption for resistance trained athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 3, 7—27.
- Youn-Ho, H. & Lawrence K. C. (2002). Changed protein structures of bovine b-lactoglobulin B and a-lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal*, 12, 345—359.

Table 3. Essential amino acids (EAA) content, amino acid score (AAS) and the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) values calculated for WP-USA and WP-BRA supplements.

EAA	Reference ^a	EAA content (mg.kg ⁻¹)		AAS		PDCAAS	
		WP-USA	WP-BRA	WP-USA	WP-BRA	WP-USA	WP-BRA
His	10	17.4±1.9*	24.1±3.9	2.1±0.4*	3.2±0.7	1.9±0.4*	2.7±0.6
Ile	20	22.2±3.0	20.7±3.1	1.2±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	0.9±0.1
Leu	39	58.0±5.0*	30.9±6.3	1.6±0.7*	0.9±0.1	1.4±0.7*	0.7±0.1
Lys	30	119.4±22.6	146.4±44.2	4.3±0.8	5.9±1.0	3.9±0.7	5.3±0.9
Met	10	11.5±0.9*	16.5±2.2	1.2±0.1*	1.9±0.2	1.1±0.1*	1.7±0.2
Phe	25	53.4±10.4*	41.6±8.6	2.3±0.4*	1.9±0.3	2.1±0.4*	1.6±0.3
Thr	15	17.5±1.7*	19.3±1.4	1.0±0.2*	1.7±0.2	0.9±0.3*	1.5±0.3
Val	26	25.0±5.2	25.7±3.7	1.0±0.2	1.2±0.1	0.9±0.2	1.0±0.1

The values are mean ± standard error (n = 7).

* Denotes difference between WP-USA and WP-BRA (P < 0.05).

^a Reference values (mg.kg⁻¹) for daily intake of amino acids for non-athletic adult (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007).

EAA = Essential amino acid; AAS = Amino acid score; PDCAAS = protein digestibility-corrected amino acid score; WP-USA = whey protein supplements produced by USA companies; WP-BRA = whey protein supplements produced by Brazilian companies.

Table 4. Amino acid (AAS) and protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) of WP-USA and WP-BRA supplements calculated for adult athletes.

EAA	Reference ^a	AAS		PDCAAS	
		WP-USA	WP-BRA	WP-USA	WP-BRA
His	20	1.1±0.2*	1.6±0.3	0.9±0.2*	1.4±0.3
Ile	40	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1
Leu	78	0.9±0.3*	0.5±0.1	0.8±0.3*	0.4±0.1
Lys	60	2.1±0.4	3.4±0.9	1.9±0.3	3.0±0.8
Met	20	0.6±0.1*	1.0±0.1	0.5±0.04*	0.8±0.1
Phe	50	1.2±0.2*	1.0±0.1	1.0±0.2*	0.8±0.1
Thr	30	0.6±0.1*	0.8±0.1	0.5±0.1*	0.7±0.1
Val	52	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1

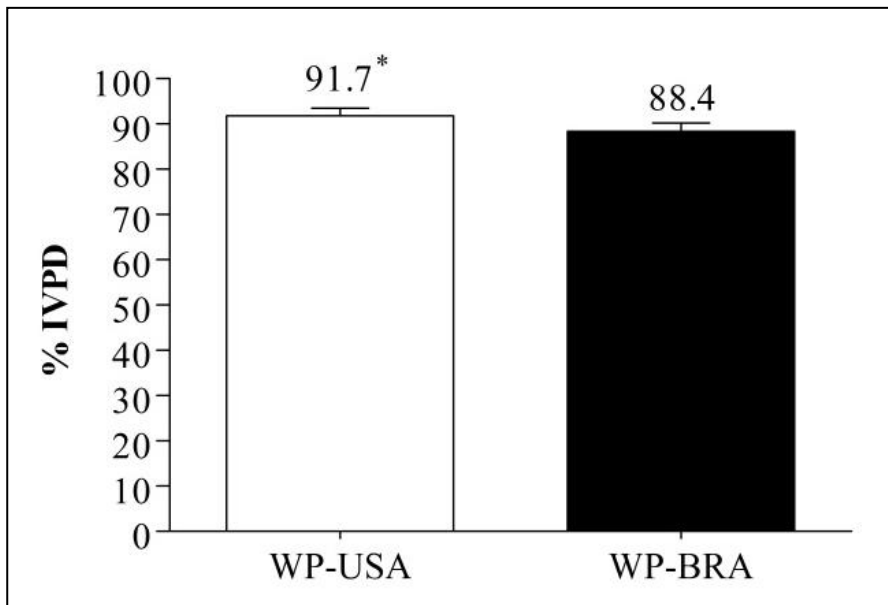
The values are mean ± standard error (n = 7).

* Denotes difference between WP-USA and WP-BRA (P < 0.05).

^a Reference values (mg.kg⁻¹) for adult athlete suggested by Jeukendrup and Gleeson, (2009) based on daily intake of amino acids for non-athletic adult (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007).

AAS = amino acid score; PDCAAS = protein digestibility-corrected amino acid; WP-USA = whey protein supplements manufactured by USA companies; WP-BRA = whey protein supplements manufactured by Brazilian companies.

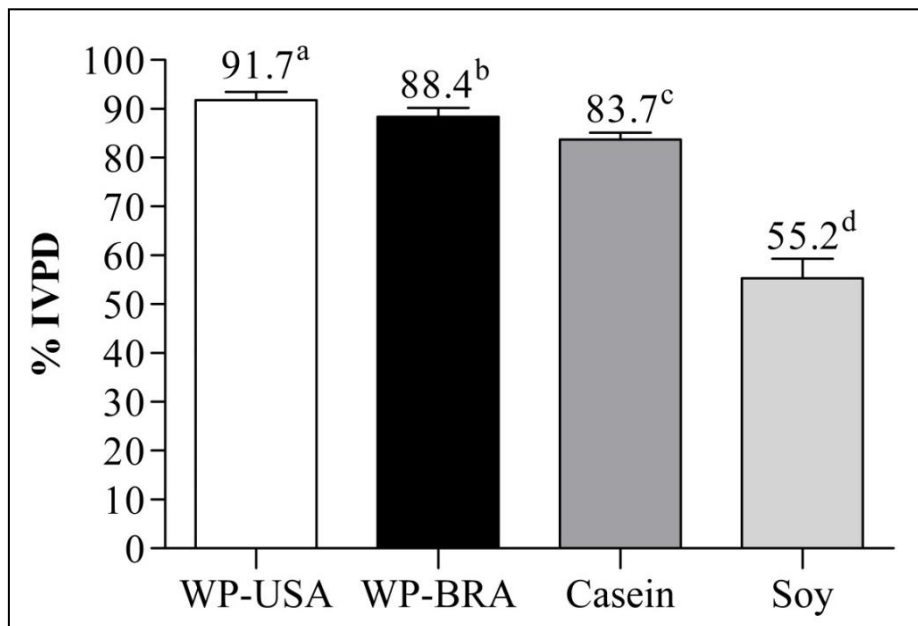
Figure 6. The *in vitro* protein digestibility values (%) of WP-USA and WP-BRA supplements.



* ($P < 0.05$) denotes difference at 95% of confidence level ($n = 7$).

WP-USA = whey protein supplements produced by USA companies; WP-BRA = whey protein supplements produced by Brazilian companies.

Figure 7. The *in vitro* protein digestibility values (%) of WP-USA, WP-BRA, soy isolate and caseinate isolate supplements.



^{a-d} Different letters denote difference at 95% of confidence level ($P < 0.05$) ($n = 7$).

WP-USA = whey protein supplements produced by USA companies; WP-BRA = whey protein supplements produced by Brazilian companies.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que tanto os suplementos produzidos por empresas norte-americanas como os suplementos produzidos por empresas brasileiras, apresentaram diferença na qualidade nutricional em consequência à variação observada na composição destes produtos, no que concerne ao conteúdo total de proteínas, concentração das proteínas majoritárias (α -lactalbumina e β -lactoglobulina), composição de aminoácidos essenciais, e na digestibilidade. No entanto, os suplementos importados apresentaram resultados melhores, em comparação com os suplementos nacionais. Além disso, verificaram-se inconformidades de alguns suplementos em relação à composição descrita no rótulo.

Embora não haja riscos à saúde, alterações na composição nutricional podem fazer com que o atleta não alcance o resultado esperado, principalmente se sua dieta estiver calculada em função dos valores nutricionais fornecidos no rótulo. Desta forma, os dados deste trabalho enfatizam a necessidade de intensificar o controle sobre os suplementos à base de Whey Protein comercializados no mercado, independentemente da origem da sua produção.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENUTRI, 2014 Disponível em: <<http://www.abenutri.org/cepedisa-publica-trabalho-sobre-legislacao-para-suplementos-nutricionais-no-brasil/>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

ALMEIDA, C. C.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; SILVA, A. C. O.; ALVARES, T. S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. *Enciclopédia Biosfera*, v. 9, p. 1840—1854, 2013.

BALDISSERA, A. C.; DELLA BETTA, F.; PENNA, A. L. B.; LINDNER, J. D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. *Ciências Agrárias*, v. 32, n. 4, p. 1497—1512, 2011.

BARBAROS, H. O.; HUSEYIN, A. K. Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*. v. 63, n. 1, p. 1—15, 2010.

BONFATTI, V.; GRIGOLETTO, L.; CECCHINATO, A.; GALLO, L.; CARNIER, P. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *J. Chromatogr. A*, v. 1195, p. 101—106, 2008.

BORDIN, G., CORDEIRO-RAPOSO, F., LA-CALLE, B. A. R. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 928, p. 63—76, 2001.

BORSHEIM, E.; TIPTON, K.D.; WOLF, S.E.; WOLFE, R.R.. Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *American Journal of Physiology*, v. 283, p. 648—657, 2002.

BOSCHI, J. R. Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

BOYE, J., WIJESINHA-BETTONI, R., & BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, v. 108, p. S183—S211, 2012.

BRASIL. Resolução - RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. *Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2010.

BRUNETTO, M. A.; Gomes, M. O. S.; Jeremias, J. T.; Oliveira, L. D.; Carciofi, A. C. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, n.2, p.S230—S232, 2007.

CARUNCHIA, W. M. E.; CROISSANT, A. E.; DRAKE, M. A. Characterization of dried whey protein concentrate and isolate flavor. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 3826—3839, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex Stand 243-2003. Codex Standart for fermented milk. *Codex Alimentarius Comission*. Milk and milk products, 2 ed., 2011.

CONSUMER LAB. Protein powders and drinks review for body building. Disponível em: <https://www.consumerlab.com/reviews/Protein_Powders_Shakes_Drinks_Sports_%20Meal_Diet/NutritionDrinks/.2014>. Acesso em: 21 jun. 2014.

CONSUMER REPORT.ORG. Consumer Reports Magazine. How much protein?. Disponível em: <<http://www.consumerreports.org/cro/magazine-archive/2010/july/food/protein-rinks/how-much-protein/index.htm>>. Acesso em: 23 jun. 2014.

CRIBB, P. J.; WILLIAMS, A. D.; HAYES, A.; CAREY, M. F. The effect of whey isolate on strength, body composition and plasma glutamine. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 34, n. 5, p. 299, 2002.

ETZEL, M. R. Manufacture and use of dairy protein fractions. *American Society tor Nutritional Sciences*, p. 996S—1002S, 2004.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Sports Nutrition Brazil: Euromonitor International: Country Sector Briefing. July 2014. Disponível em: <http://www.euromonitor.com/sports-nutrition-in-brazil/report>. Acesso em: 10 ago. 2014.

FÉLIX, P. A. S. Secagem do soro do leite. *Leite & Derivados*, v. 18, n. 111, p. 6, 2009.

FISCHBORN, S. C. A influência do tempo de ingestão da suplementação de whey protein em relação à atividade física. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo, v. 3, n. 14, p. 132—143, 2009.

GEORGE, P.; KASAPIS, S.; BANNIKOVA, A.; MANTRI, N.; PALMER, M.; MEURER, B.; LUNDIN, L. Effect of high hydrostatic pressure on the structural properties and bioactivity of immunoglobulins extracted from whey protein. *Food Hydrocolloids*, v.32, p. 286—293, 2013.

GLOBAL FOOD. Soro um alimento saudável e base econômica para produtos inovadores. Disponível em: <<http://www.globalfood.com.br>>. Acesso em: 9 ago. 2014.

GOMES, A. F. C. Pesquisa de substâncias ilícitas em suplementos alimentares. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) – Departamento de Química, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2011.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 14, n. 5, p. 251—58, 2003.

HARAGUCHI F. K.; ABREU W. C.; PAULA H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista Brasileira de Nutrição*, v. 19, n. 4, p. 479—488, 2006.

HARAGUCHI, S. K. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 479—488, 2008.

- HEEBOLL-NIELSEN A.; JUSTESEN S. F.; THOMAS O. R. Fracionamento de proteínas de soro de leite com alta capacidade superparamagnéticas trocadores de íons. *Journal of Biotechnology*, v. 113, n.1-3, p. 247—262, 2004.
- HERNÁNDEZ, L. B.; RECIO, I.; AMIGO, L. β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Journal Amino Acids*, v. 35, n. 2, p. 257—265, 2008.
- HOFFMAN, N. R.; TRANCHINA, C.; RASHTI, S.; KANG, J.; FAIGENBAUM, A. Effects of a pre- and post-exercise whey protein supplement on recovery from an acute resistance training session. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, v. 5, p. 1—2, 2008.
- HULMI, J. J.; CHRISTOPHER, M. L.; JEFFREY, R. S. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & Metabolism*, v. 51, p. 1—11, 2010.
- KHANAM, A.; KUMKUM, R. C. G.; Swamylingappa, B. Functional and nutritional evaluation of supplementary food formulations. *Journal of Food Science and Technology*, v. 50, p. 309—316, 2013.
- KRISSANSEN, G. W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 26, n. 6, p. 713—723, 2007.
- KUSSENDRAGER, K. D.; HOOIJDONK, A. C. M. V. Lactoperoxidase: Physicochemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, v. 84, n. 1, p. 19—25, 2010.
- LEE, Y.; SKURK, T.; HENNIG, M.; HAUNER, H. Effect of a milk drink supplemented with whey peptides on blood pressure in patients with mild hypertension. *European Journal of Nutrition*, v. 46, p. 21—27, 2007.
- LEMON, P. W.; BERARDI, J. M.; NOREEN, E. E. The role of protein and amino acid supplements in the athlete's diet: does type or timing of ingestion matter? *Current Sports Medicine Reports*, v. 4, 214—221, 2002.

LIGNITTO, L.; CAVATORTA, V.; BALZAN, S.; GABAI, G.; GALAVERNA G.

Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese. *International Dairy Journal*, v. 20, n. 1, p. 11—17, 2010.

LOWERY, L.; EDEL, J. F.; MCBRIDE, I. M. Dietary protein and strength athletes. *Strength and Conditioning Journal*, v. 34, p. 26—32, 2012.

MANNINEN, A. H. Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutrition & Metabolism*, v. 6, p. 1—5, 2009.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative medicine review*, v. 9 n. 2, p. 136—56, 2004.

MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MIRALLES, GÓMEZ-RUIZ, B. J Proteomics in Foods: Principles and Applications. New York: Springer Science, 2013.

MAUGHAN, R. J. Quality assurance issues in the use of dietary supplements, with special reference to protein supplements. *Journal of Nutrition*, v.143, p. S1843—S1847, 2013.

McINTOSH, G. H.; LE LEU, R. K. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. *Nutrition Research*, v.21, n.7, p.1053—1066, 2001.

METTE, F. O.; ALEMSEGED, A.; PERNILLE, K. Effects of nutritional supplementation for HIV patients starting antiretroviral treatment: randomised controlled trial in Ethiopia. *British Medical Journal*, v. 348, p. 3187, 2014.

MICHAELIDEOU, A.; STEIJNS, J. Nutritional and technology aspects of minor bioactive components in milk and whey: growth factors, vitamins and nucleotides. *International Dairy Journal*. v. 16, p. 1421—1426, 2006.

MULLER, A.; CHAUFER, B.; MERIN, U.; DAUFIN, G. Pre-purification of α -lactalbumin with ultrafiltration ceramic membranes from acid casein whey: study of operating conditions. *Lait*, v. 83, p. 439—451, 2003.

- OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: Um subproduto valioso. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 67, n. 385, p. 64—71, 2012.
- PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI V. L. S.; TANIKAWA C.; SGARBIERI V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 2, p. 333—338, 2005.
- PAGNO, C. H. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. *Alimentos e Nutrição*, v. 2, n. 10 p. 231—239, 2009.
- PAL, S.; ELLIS, V.; HO, S. Acute effects of whey protein isolate on cardio vascular risk factors in overweight, post-menopausal women. *Atherosclerosis*, v. 212, p. 339—344, 2010.
- PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 88—113, 2007.
- PEDRESCHI, R.; HERTOGLI, M.; LILLEY, K.S.; NICOLAIL, B. Proteomics for the food industry: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, p. 680—692, 2010.
- PHILLIPS, S. M. The science of muscle hypertrophy: making dietary protein count. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 70, p. 100—103, 2011.
- PIHLANTO, A. Whey proteins and peptides. Emerging properties to promote health. *NutraFoods*, v. 10, n. 2-3, p. 29—42, 2011.
- PIRES, C.; VIEIRA, M. G.; JOSÉ, C. R.; NEUZA, M. B. C. Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources. *Food Science and Technology*, v. 26, p.179—187, 2006.
- PROTESTE. Protest Consumers Association. Irregularities in dietary supplements. Disponível em: <<http://www.proteste.org.br/institucional/imprensa/press-release/2014/proteste-encontra-irregularidades-em-suplementos-para-atletas>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

RENHE, I. R. T. O papel do leite na nutrição. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 63, n. 363, p. 36—43, 2008.

RODRIGUES, L. R. M. Valorização da fração proteica do soro de queijo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal, 2001.

SAARELA, M. *Functional Dairy Products*. Boca Raton: CRC, 2007. 392p..

SANTOS, M. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 879, n. 7, p. 475—479, 2011.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 397—409, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, n. 1, p. 43—56, 2005.

SOUSA, G. T.; LIRA, F. S.; ROSA J. C.; OLIVEIRA, E. P.; OYAMA, L. M.; SANTOS, R. V.; PIMENTEL, G. D. Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review. *Lipids in Health and Disease*, 2012.

STEIJNS J. M.; HOOIJDONK A. C. M. V. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, v. 84, n. 1, p. 11—17, 2000.

TANG, J. E.; MOORE, D. R.; KUJBIDA, G. W.; TARNOPOLSKY, M. A.; PHILLIPS, S. M. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: Effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *Journal of Applied Physiology*, v. 107, p. 987—992, 2009.

TERADA, L. C. Efeitos metabólicos da suplementação do whey protein em praticantes de exercícios com pesos. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 3, n. 16, p. 295-304, 2009.

- URISTA, M. C.; ÁLVAREZ, F. R.; RIERA, R. F.; CUENCA, A. A.; TÉLLEZ, J. A. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, v. 17, n. 4, p. 293—317, 2011.
- VOSWINKEL, L.; KULOZIK, U. Fractionation of all major and minor whey proteins with radial flow membrane adsorption chromatography at lab and pilot scale. *International Dairy Journal*, v. 39, n. 1, p. 209—214, 2014.
- WALSTRA, P., WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. Dairy science and technology. 2. ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006.
- WALZEN, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 42, p.353—375, 2002.
- WHO - World Health Organization. Protein and aminoacid requirements in human nutrition. Report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series, n. 935. Geneva: WHO Press, 2007.
- WIT, J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 3, p. 597—608, 1998.
- WONG, N. P; JENESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E. H. Fundamentals of Dairy Chemistry. 3. ed., New York: Aspen Publication, 1999. 779 p.
- YADA, R. Y. Protein in Food Processing. 1. ed. New York: CRC Press, 2004.
- YOUN-HO, H. & LAWRENCE K. C. Changed protein structures of bovine b-lactoglobulin B and a-lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 345—359, 2002.
- YÜKSEL, Z.; ERDEM, Y. K. Detection of the milk proteins by RP-HPLC. *Research Araştırma*, v. 3, 2009.

ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. *Revista de Nutrição*, v. 22, n. 1, p. 61—70, 2009.

6 ANEXOS

6.1 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1

31-Jul-2014

Dear Prof. Carlos Conte:

Your manuscript titled "Comparison of protein and amino acid profiles of different whey protein supplements" by Almeida, Cristine; Alvares, Thiago; Costa, Marion; Conte, Carlos has been successfully submitted online and is presently being given consideration for publication in the Journal of Dairy Science. Because publication in the Journal of Dairy Science requires the time and expertise of at least 2 reviewers, all manuscript authors have a responsibility to review submissions from other authors. We hope that you will help the journal and fulfill this obligation if asked by editors.

Please mention the manuscript ID (JDS-14-8686) in all correspondence or when calling the office with questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds> and edit your user information as appropriate. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jds>.

Please complete and return the attached copyright release form to the editorial office by fax (217-378-4083) or e-mail (shaunam@assoqh.org). If authors are at more than one institution, separate forms may be filed by each author. All author signatures are required, but revised

© 2014 Microsoft Termos Privacidade e cookies Desenvolvedores Português (Brasil)

6.2 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: LWT - Food Science and Technology

Corresponding Author: Carlos Conte Junior

Co-Authors: Cristine Almeida; Maria Lucia Monteiro; Bruno Costa-Lima; Thiago Alvares

Title: In vitro digestibility of commercial whey protein supplements

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at carlosconte@id.uff.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

© 2014 Microsoft Termos Privacidade e cookies Desenvolvedores Português (Brasil)