



LUDMILA PINTO SOARES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E
QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM
SUPLEMENTOS PROTEICOS**

LUDMILA PINTO SOARES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E
QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM
SUPLEMENTOS PROTEICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao colegiado de Curso da Engenharia Química
do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da
Universidade Federal do Maranhão, como parte
dos requisitos para obtenção do diploma de
Graduação em Engenharia Química

Orientadora: Prof^a. Dra. Alexandra Martins dos
Santos Soares

São Luís
2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a). Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Pinto Soares, Ludmila.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE
PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM SUPLEMENTOS PROTEICOS / Ludmila

Pinto Soares. - 2023.

32 p.

Orientador(a): Alexandra Martins dos Santos Soares. Curso de Engenharia
Química, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2023.

1. Teor proteico. 2. Contaminação microbiana. 3. Soro do leite. I. Martins dos
Santos Soares, Alexandra. II. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. ALEXANDRA MARTINS DOS SANTOS SOARES
Orientadora – COEQ/CCET/UFMA

Prof. Me. EDILBERTO CORDEIRO DOS SANTOS JUNIOR
CCET/UFMA

Me. WALLYSON ANDRÉ DOS SANTOS BEZERRA
CCBS/UFMA

18 de dezembro de 2023

***Dedico este trabalho à minha família, a base
sólida que sempre esteve ao meu lado.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela força que me foi concedida, pela sabedoria que iluminou meu caminho e pela graça que permeou cada etapa desta jornada acadêmica. Que este trabalho reflita minha sincera gratidão e seja uma contribuição digna ao conhecimento, inspirada por Sua infinita sabedoria.

Aos meus pais, pela incessante fonte de incentivo, amor e colaboração sempre presentes em cada passo da minha jornada acadêmica, obrigada pelo investimento na minha educação ao longo desses anos.

À minha irmã, que sempre acreditou em mim, proporcionando um apoio inestimável e incentivando tanto meu crescimento pessoal quanto acadêmico. Agradeço a todos os meus familiares, cuja torcida ressoa independentemente da distância que nos separa e sei que sempre torcem por mim. Amo vocês!

Ao meu querido namorado Pablo, pelo apoio, carinho e conselhos. Sua presença ao meu lado nesta jornada tem sido uma fonte vital de força e incentivo, tornando cada desafio mais superável. Agradeço por tornar essa caminhada mais leve e por ser a razão de tantos momentos agradáveis ao longo do percurso.

À Cecília, minha amiga incrível, agradeço do fundo do coração por sua presença constante e parceria inabalável nas alegrias e desafios do nosso percurso acadêmico. Sua parceria tornou essa caminhada acadêmica muito mais especial.

À minha orientadora, Alexandra Martins, pelos esclarecimentos, correções e sugestões que desempenharam um papel crucial na realização do meu trabalho. Obrigada por ter me aceitado em seu laboratório e por todos os ensinamentos que tive.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Vegetal da UFMA, que não apenas me auxiliou no momento de capturar as imagens, mas também contribuíram com valiosas sugestões. Um agradecimento especial ao doutorando Wallyson, cuja assistência foi fundamental e teve uma contribuição enorme para a realização dos experimentos.

Expresso minha gratidão aos colegas de curso, cuja amizade e compreensão tornaram os desafios acadêmicos mais leves e as vitórias mais significativas.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta etapa da minha vida. Muito obrigada!

“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração,
como para o Senhor e não para os homens”

Colossenses 3:17

SOARES, L. P. **Avaliação da qualidade microbiológica e quantificação de proteínas solúveis em suplementos proteicos.** 2023. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

RESUMO

Com a crescente busca por qualidade de vida, o consumo de suplementos nutricionais, especialmente os derivados da proteína do soro de leite, tornou-se popular em diversas faixas etárias, incluindo praticantes de atividades físicas e a população idosa, que muitas vezes enfrenta deficiências nutricionais que não são supridas apenas pela alimentação. Este estudo teve como objetivo investigar o teor de proteínas solúveis e a presença de bactérias Gram-negativas em suplementos proteicos. Os suplementos são compostos por nutrientes capazes de reverter a deficiência nutricional, ajudam a promover ganho de massa muscular e atenuam a perda natural de massa muscular com o envelhecimento. Dentre eles, destaca-se o *whey protein*, suplemento feito das proteínas extraídas do soro de leite. Foram adquiridos comercialmente cinco suplementos proteicos distintos, identificados pelas siglas SP (suplemento proteico). A avaliação da presença de bactérias Gram-negativas foi realizada em meio sólido, ágar MacConkey. Controles com água destilada e *Escherichia coli* foram incluídos. A quantificação de proteínas solúveis foi realizada com o reagente de Bradford, utilizando uma curva padrão feita com albumina sérica bovina, com leituras de absorbância a 595 nm. Os resultados revelaram a ausência de crescimento de bactérias Gram-negativas nos suplementos analisados. Quanto ao teor de proteínas solúveis, os suplementos SP1, SP2, SP3, SP4 e SP5 apresentaram, respectivamente, 33,80; 18,23; 27,00; 93,87; e 32,93 gramas por 100 g de suplemento. Concluiu-se que o suplemento SP4 exibiu o maior teor de proteínas solúveis em água entre os suplementos avaliados e que todos eles estavam isentos de contaminação bacteriana nas condições do ensaio.

Palavras-chave: Teor proteico. Contaminação bacteriana. Soro do leite.

SOARES, L. P. **Assessment of microbiological quality and quantification of soluble proteins in protein supplements.** 2023. 33 f. Graduate Work (Graduate in Chemical Engineering) – Curso de Engenharia do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

ABSTRACT

The use of nutritional supplements, especially those derived from whey protein, has become popular among different age groups, including those who practice physical activities and the elderly population, who often face nutritional deficiencies. This study aimed to investigate the content of soluble proteins and the presence of Gram-negative bacteria in protein supplements. Supplements are composed of nutrients capable of reversing nutritional deficiency, helping to promote muscle mass gain and attenuating the natural loss of muscle mass with aging. Among them, whey protein is a supplement made from proteins extracted from whey. Five protein supplements were commercially purchased, identified by the acronym SP (protein supplement). The evaluation of the presence of Gram-negative bacteria was carried out using MacConkey medium. Controls with distilled water and *Escherichia coli* were included. Quantification of soluble proteins was carried out with the Bradford reagent, using a standard curve made with bovine serum albumin, with absorbance readings at 595 nm. The results revealed the absence of growth of Gram-negative bacteria in the supplements analyzed. Regarding the content of soluble proteins, the supplements SP1, SP2, SP3, SP4 and SP5 presented, respectively, 33.80; 18.23; 27.00; 93.87; and 32.93 grams per 100 g of supplement. It was concluded that the SP4 supplement exhibited the highest water-soluble protein content among the supplements evaluated and that all of them were free from bacterial contamination under the test conditions.

Keywords: Protein content. Bacterial contamination. Whey protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma com as principais etapas da metodologia.....	19
Figura 2 – Curva padrão do Bradford.....	23
Figura 3 – Resultados da análise microbiológica dos suplementos proteicos	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações gerais dos suplementos	20
Tabela 2 – Teor de proteínas solúveis de suplementos de diferentes marcas expresso em gramas de proteínas solúveis por 100 g de suplemento (g Ps/100 g suplemento).	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	122
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Proteínas e sua importância industrial.....	14
3.2 Proteína do soro do leite	16
3.3 Quantificação de proteínas	17
3.4 Contaminação microbiológica de alimentos	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 Material	20
4.2 Reagentes.....	20
4.3 Equipamentos	21
4.4 Análise microbiológica	21
4.4.1 Preparo do meio de cultura.....	21
4.4.2 Preparo das amostras	21
4.4.3 Inoculação das amostras	22
4.5 Quantificação de proteínas solúveis.....	22
4.6 Análise estatística	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade de vida teve um notável crescimento desde o início dos anos 2000. A ingestão diária recomendada de proteínas para pessoas sedentárias é de 0,8 grama por quilo corpóreo, enquanto para aqueles que praticam exercícios regularmente, a faixa ideal é de 1,2 a 1,4 gramas por quilo (Hernandez et al., 2009). Segundo as diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a média ideal estipulada é de 50 gramas de proteínas por dia (Brasil, 2005). Diante desse cenário, os suplementos proteicos têm sido amplamente empregados como meio para incrementar a ingestão de proteínas, ao mesmo tempo em que se busca manter um baixo aporte calórico. Tal prática é adotada não apenas por indivíduos engajados em atividades físicas, mas também por aqueles que não as incorporam em sua rotina (Huecker et al., 2019).

Compostos por nutrientes, os suplementos desempenham um papel crucial na reversão de deficiências nutricionais, favorecendo ganhos de massa muscular e prevenindo a perda durante restrição calórica, além de atenuar o declínio natural da massa muscular relacionado ao envelhecimento (Camargo; Doneda; Oliveira, 2020). Dentre os diversos suplementos no mercado, destaca-se o *whey protein*, suplemento feito das proteínas solúveis extraídas do soro de leite (Otero et al., 2022).

O mercado global de suplementos de proteína foi avaliado em U\$ 6,26 bilhões em 2021 e espera-se que atinja U\$ 10,80 bilhões até 2030, sendo mais consolidado nos Estados Unidos, que são os maiores geradores de receita desse produto (Grand View Research, 2021). Na União Europeia, o valor de varejo em suplementos alimentares em 2015 foi liderado pela Itália (€ 1,4 bilhão), seguida pela Alemanha (€ 967 milhões), Rússia (€ 888 milhões) e Reino Unido (€ 737 milhões) (Euromonitor International, 2015).

No contexto brasileiro, o boletim econômico publicado pela Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais (ABIAD) destaca um aumento significativo de 25% no consumo aparente de concentrados de proteínas no contexto brasileiro ao longo do ano de 2022, conforme indicado pela Pesquisa Industrial Mensal - Produção Física (PIM-PF) do IBGE (ABIAD, 2023). Esses suplementos são regulamentados pela ANVISA, seguindo a definição de Alimentos para Atletas. Os alimentos para atletas são classificados como suplemento: energético, hidroeletrólítico, de cafeína, de creatina, proteico e para substituição parcial de refeições (Brasil, 2010).

Não obstante a importância contemporânea, é relevante destacar que até o ano de 1970, o soro do leite era categorizado meramente como um resíduo industrial. Este constituía-se como subproduto do processo de fabricação de queijos, durante o qual o leite é submetido à coagulação para a formação do "coalho", sendo o soro subsequentemente separado (Nunes et al., 2018). Sua composição é formada principalmente por água, lactose, minerais e proteínas de alta qualidade, como a lactoglobulina e a lactoalbumina. Após ser separado, o soro é processado para remover a água e a lactose, obtendo, assim, as proteínas do soro de leite em forma de pó (Phillips; Van Loon, 2013).

As proteínas que se dissolvem facilmente em água ou soluções aquosas são definidas como proteínas solúveis (Yosefi.; Abbasi, 2022). De acordo com a literatura, a proteína solúvel estimula a saciedade, além de ser facilmente digerida, fornecendo aminoácidos essenciais para síntese de proteínas do corpo e possui papel crucial no funcionamento do organismo, fortalecendo a resposta imunológica (Chungchunlam et al., 2017; Adrizal; Amizar; Mahata, 2017; Nakanishi et al., 1999).

Dentro desse contexto alimentar, é relevante destacar que o leite bovino é constituído por duas principais frações proteicas: caseína e proteína do soro de leite (Macedo Mota, 2020). A liberação rápida das proteínas solúveis do leite no estômago contrasta com a coagulação das caseínas em um ambiente de pH ácido, culminando em distintas cinéticas na entrega de aminoácidos ao intestino. Tais variações na entrega de aminoácidos desempenham um papel crucial nos efeitos exercidos sobre o metabolismo proteico. Entretanto, o destino metabólico exato pós-prandial dos aminoácidos e do nitrogênio provenientes da dieta, após a ingestão de caseína ou proteína solúvel no leite, permanece em grande parte indeterminado (Lacroix et al., 2006). Assim, estudos que visem investigar a solubilidade de proteínas de suplementos proteicos em diferentes solventes e pHs, assim como avaliação do destino metabólico delas, é de grande importância.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, em 2005, 1,5 milhão de pessoas morreram por doenças diarreicas, sendo 70% dessas causadas por patógenos de origem alimentar (Buzby; Roberts, 2009). Considerando que os indivíduos utilizam os suplementos proteicos principalmente como forma de auxiliar no desempenho das atividades físicas, é crucial garantir a qualidade desse produto, de modo a evitar resultados opostos aos desejados (Castro et al., 2019).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pela regulamentação dos alimentos. A normatização de suplementos proteicos é estabelecida

pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº18/2010 que visa estabelecer a classificação, designação, requisitos de composição e rotulagem dos alimentos para atletas (Brasil, 2010).

A contaminação microbiológica, geralmente causada por bactérias da classe das Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, pode resultar em intoxicação alimentar, manifestando-se com sintomas como vômitos, diarreia e, em casos extremos, representando uma ameaça séria à saúde pública, podendo levar ao óbito. Essas bactérias podem ser indicadores úteis de contaminação fecal, sugerindo a presença de microrganismos provenientes de fezes humanas ou animais. Além disso, a presença de bactérias Gram-negativas pode indicar falhas nos processos de higiene durante a produção, embalagem ou armazenamento dos suplementos (Forsythe, 2013).

Diante disso, torna-se evidente a necessidade de implementação de medidas de fiscalização, considerando que a contaminação mencionada representa sérios riscos à saúde e alguns estudos já relatam a contaminação microbiológica em suplementos proteicos (Aljaloud et al., 2013; Alhamdan, Ahmad e Baothman, 2021). Além disso, é pertinente ressaltar a escassez de pesquisas sobre o tema, o que reforça a importância de investigações adicionais para ampliar a compreensão acerca dessa problemática específica.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o teor de proteínas solúveis de cinco suplementos proteicos comercializados no Brasil, e avaliar contaminação microbiológica por bactérias Gram-negativas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a contaminação microbiológica e o teor proteico de cinco suplementos proteicos comerciais.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a presença de bactérias Gram-negativas em cinco suplementos proteicos.
- Quantificar as proteínas solúveis dos suplementos proteicos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Proteínas e sua importância industrial

Proteínas são macromoléculas constituídas por uma união de aminoácidos, que formam ligações peptídicas. A estrutura pode variar em níveis de organização, incluindo a sequência de aminoácidos, arranjo tridimensional da molécula e as interações com outras células (Zaha; Ferreira; Passaglia, 2014). Elas são os principais componentes estruturais e funcionais das células vivas, e desempenham um papel fundamental na vida celular, desde a manutenção da integridade estrutural até o controle de processos bioquímicos (Jaenicke, 1990).

Dentre as aplicações das proteínas, atualmente pode-se destacar seu emprego na produção de alimentos alternativos e sustentáveis, como substitutos da carne e produtos lácteos. Isso ocorre devido à necessidade de aumentar a produção alimentar para atender à crescente população mundial e, simultaneamente, reduzir o impacto ambiental dos sistemas agrícolas (Wood; Tavan, 2022).

No âmbito da indústria alimentícia, tais proteínas podem ser empregadas com a finalidade de aprimorar a textura, sabor, estabilidade e valor nutricional dos alimentos, desempenhando um papel significativo como ingredientes em suplementos alimentares (Kårlund et al., 2019). Os suplementos proteicos são amplamente consumidos como forma de complementar a dieta, visto que a ingestão adequada de proteínas contribui para a saúde ideal e previne a perda de massa muscular relacionada à idade (Smeuninx; Greig; Breen, 2020). As aplicações potenciais destes suplementos englobam diversas áreas, tais como aprimoramento do desempenho físico, atividade insulínica, efeito anti-osteoporótico, modulação das propriedades imunológicas e tratamento da sarcopenia (Lam et al., 2019; Stevenson; Allerton, 2018; Kadam et al., 2018; Chun et al., 2019; Griffen, 2022).

As proteínas têm sido amplamente estudadas como uma alternativa promissora na produção de materiais biodegradáveis. O artigo de Shukla e Cheryan (2001) enfatiza que as proteínas podem ser usufruídas na produção de materiais, como fibras, cerâmicas, têxteis e plásticos biodegradáveis. Entretanto, ainda é necessário desenvolver métodos de fabricação de baixo custo para que se torne viável.

De acordo com Ahsan (2019), os peptídeos possuem propriedades fisiopatológicas e têm sido aplicados em produtos para estimular a síntese de colágeno e elastina na pele, melhorando a cicatrização da superfície. O principal benefício das proteínas em cosméticos seria a melhora da hidratação na pele, incrementando as funções da barreira cutânea.

Além disso, as proteínas desempenham importante papel na produção de produtos biológicos, incluindo os anticorpos e vacinas. Durante a pandemia de Covid-19, foram utilizadas para desenvolver testes diagnósticos, como os testes de anticorpos e antígeno, baseados na detecção de proteínas específicas do vírus SARS-CoV-2 (Kumar et al., 2020). Em síntese, trata-se de moléculas versáteis de relevância substancial na indústria, e mediante uma pesquisa contínua, é possível vislumbrar avanços significativos em distintos setores.

3.2 Proteína do soro do leite

O soro de leite, um subproduto gerado durante o processo de fabricação de queijos, desempenha um papel fundamental como matéria-prima em diversas aplicações. A recuperação dos compostos sólidos desse soro é atrativa por permitir o aproveitamento máximo das propriedades nutricionais e funcionais presentes na proteína do soro de leite, porém também serve para reduzir a poluição orgânica gerada pelos resíduos do soro de leite descartado (Ostojić et al., 2005).

A ultrafiltração destaca-se como o método mais frequente para a obtenção de concentrados proteicos, uma vez que possibilita a purificação e concentração por meio da separação seletiva de água e de determinados solutos. Essa técnica é implementada através da passagem do soro por uma membrana semipermeável (Bosch, 2006). Dessa forma, os componentes de alta massa molecular em solução, notadamente as proteínas, são segregados dos componentes de baixa massa molecular.

De acordo com Fangmeier et al. (2019), a qualidade e composição nutricional do soro de leite dependem dos processos de fabricação do queijo, do tipo de leite utilizado e das condições ambientais. Entretanto, o soro de leite em pó é geralmente constituído pelas proteínas solúveis do soro de leite, como a albumina sérica bovina (BSA), a lactoglobulina beta (β -Lg), a lactoalbumina alfa (α -La) e a imunoglobulina (Ig). Essas proteínas são solúveis em água e facilmente separadas da fração insolúvel (caseína) durante o processo de produção do *whey* em pó (Kinsella; Whitehead, 1989).

Os suplementos proteicos emergem como uma das categorias mais amplamente consumidas no atual mercado de suplementos nutricionais, sendo disponibilizados em diferentes categorias de acordo com o grau de processamento e concentração resultante de proteínas: concentrado de proteína, isolado de proteína e hidrolisado de proteína. Adicionalmente, há variantes que combinam essas distintas formas de proteínas, conhecidas como *blends* (Wang, 2022; Klaewkla et al., 2022). A concentração de proteínas no concentrado

pode variar de 35% a 80% (m/m) de proteína. No isolado, a concentração proteica deve ser maior que 90% (Minj; Anand, 2020). Os concentrados e isolados de proteína são denominados hidrolisados, caso as proteínas e peptídeos constituintes passem por processo de pré digestão e hidrólise, o que facilita a absorção em comparação com formas íntegras de proteína, visto que a hidrólise quebra as cadeias proteicas em frações menores (Tunick, 2008).

A concentração de aminoácidos essenciais no soro do leite, em particular a leucina, o torna uma fonte proteica de rápida digestibilidade e altamente absorvível. Isso gera um aumento na concentração de aminoácidos no plasma (Haraguchi; Abreu; Paula, 2006). Garantir um fornecimento de proteínas adequado é essencial para estimular a síntese proteica, sendo a disponibilidade de nutrientes e exercício físico os principais fatores estimuladores (Santos; Nascimento, 2019). A síntese proteica é essencial para manutenção dos organismos vivos. Como exemplo, as enzimas, responsáveis por catalisar centenas de reações biológicas no organismo, são vitais para a sobrevivência. Além disso, a ingestão de proteínas após exercícios de resistência resulta no aumento das taxas de síntese de proteínas musculares, proporcionando um potencializador significativo para os ganhos de massa muscular e força (Rankin; Darragh, 2006).

No contexto brasileiro, os suplementos alimentares são categorizados em duas principais classes: os suplementos vitamínicos e minerais, e os alimentos destinados a atletas, sendo o whey protein enquadrado na última categoria. Conforme estabelecido pela Resolução RDC nº 18/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), esses produtos devem conter, no mínimo, 10 g de proteína por porção (Brasil, 2010).

3.3 Quantificação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas em uma amostra é essencial para avaliar seu valor nutricional e a espectrofotometria é amplamente utilizada dentre os métodos disponíveis.

Um método amplamente utilizado para determinar o teor proteico total em amostras é o método de Kjeldahl. Neste processo, as proteínas são decompostas por meio da digestão com ácido sulfúrico, liberando nitrogênio que é convertido em amônia. A concentração de nitrogênio é então medida e utilizada para calcular o teor de proteínas na amostra, considerando a proporção média de nitrogênio nas proteínas (Kjeldahl, 1883). Embora seja um método robusto, é mais comumente aplicado em análises de alimentos e ingredientes complexos, abordando a totalidade das proteínas presentes.

O método de Lowry et al. (1951) é fundamentado em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, que sofre redução ao reagir com proteínas na presença do catalisador cobre (II), resultando em um composto com absorção máxima em 750 nm. Esse método é empregado para determinar a concentração de proteínas em diversos meios devido à sua alta sensibilidade. Entretanto, é importante destacar que ele é suscetível a muitos interferentes e possui um tempo de análise prolongado.

A quantificação de proteínas baseada no método de Bradford, (1976), é amplamente utilizada para a quantificação de proteínas solúveis. O método utiliza uma reação colorimétrica entre proteínas e o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*. As interações hidrofóbicas e iônicas com as proteínas estabilizam a forma aniônica do corante, resultando em uma coloração azul proporcional ao teor de proteína. A intensidade da cor azul é mensurada espectrofotometricamente em 595 nm, onde a diferença de absorbância entre as formas coloridas do corante é mais significativa (Compton; Jones, 1985).

Considerando a necessidade de avaliar as proteínas solúveis presentes nos suplementos proteicos, optou-se pelo método de Bradford, uma vez que oferece sensibilidade e eficiência na detecção de proteínas solúveis, permitindo uma análise mais específica e detalhada da fração solúvel do suplemento.

3.4 Contaminação microbiológica de alimentos

A preocupação com a segurança microbiológica dos alimentos se destaca como um assunto de suma importância, considerando que as doenças transmitidas por alimentos desempenham um papel significativo na morbidade em nações da América Latina e do Caribe. A qualidade higiênico-sanitária tem sido amplamente estudada como um fator de prevenção dessas doenças. Segundo o Comitê WHO/FAO, as doenças decorrentes de alimentos contaminados são provavelmente o maior problema de saúde atualmente (World Health Organization et al., 1984).

O termo coliforme designa bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes, também reconhecidas como grupo coli-aerogenes. Este conjunto engloba espécies dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, incluindo a *E. coli*, sendo tradicionalmente utilizado como indicador de contaminação fecal em água doce, indicando a eventual presença de patógenos entéricos (Forsythe, 2013).

A presença elevada de coliformes em alimentos processados pode indicar um processamento inadequado ou a proliferação microbiana resultante da deficiência na prática de

higiene durante a manipulação, contaminação da matéria-prima e presença de sujeira nos equipamentos. Considerando que a presença de proteínas e lipídios apresenta efeito protetor sobre os microrganismos, os alimentos com alto teor proteico irão requer uma rigorosa intervenção térmica (Franco; Landgraf, 2003).

Para assegurar a qualidade microbiológica do soro de leite, é imperativo que ele seja refrigerado e manuseado de maneira apropriada. Na usina de processamento do soro em pó, o soro de leite é submetido a uma sequência de operações, que incluem tratamentos térmicos, concentração e secagem. Estas etapas têm como objetivo inibir a multiplicação microbiana e eliminar os microrganismos presentes, contribuindo assim para a preservação microbiológica do produto (Carvalho, 2016). Além disso, as etapas de processamento, como a filtração e a secagem, podem oferecer condições propícias para o crescimento microbiano caso não estejam adequadas. Portanto, é essencial implementar protocolos rigorosos de limpeza e desinfecção em todas as fases do processo, além de realizar testes microbiológicos regulares para identificar e controlar possíveis contaminações.

4 METODOLOGIA

As principais etapas do procedimento experimental foram sumarizadas na Figura 1.

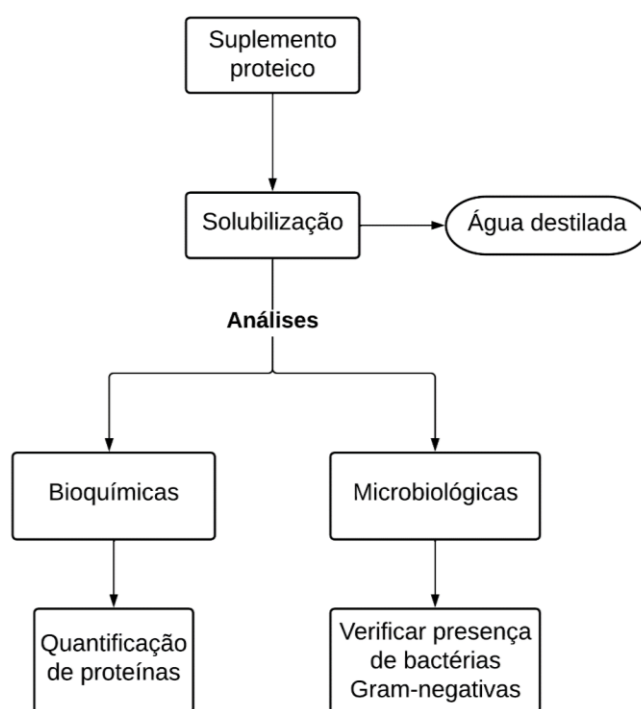


Figura 1. Fluxograma com os principais passos da metodologia.
Fonte: Própria autora (2023).

4.1 Material

Foram adquiridos comercialmente os seguintes sachês de suplementos proteicos: (SP1) Delicious 3Wheyninho da marca FTW (blend de proteínas do soro de leite concentrada, isolada e hidrolisada); (SP2) 3Whey Top Taste sabor baunilha da marca *Bodyaction* (blend de proteínas do soro de leite concentrada, isolada e hidrolisada); (SP3) 100% Whey Prime sabor baunilha da marca *Bodyaction* (proteína concentrada do soro de leite) e (SP4 e SP5) dois suplementos da marca DUX Nutrition Lab, sendo um com proteína de soro de leite concentrada sem sabor e um com proteína de soro de leite isolada sabor chocolate. As informações contidas nos rótulos das embalagens foram apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Informações gerais dos suplementos indicadas nos rótulos dos suplementos

ID	Peso líquido (g)	Proteína (g)	BCAA (g)
SP1	40	24	-
SP2	40	32	6,5
SP3	30	21	4,2
SP4	25	20	4,7
SP5	27	24	6,0

SP: Suplemento proteico. SP1: Delicious 3Wheyninho FTW. SP2: 3Whey Top Taste *Bodyaction*. SP3: 100% Whey Prime *Bodyaction*. SP4: DUX Nutrition Lab concentrado. SP5: DUX Nutrition Lab isolado. BCAA: Branched-Chain Amino Acids.

Os suplementos encontravam-se dentro do prazo de validade e permaneceram nas embalagens lacradas, armazenados em temperatura ambiente e ao abrigo de luz até o momento das análises.

4.2 Reagentes

Para solubilização dos suplementos, foi empregada água destilada estéril. A quantificação das proteínas solúveis presentes nos suplementos foi realizada por meio do reagente de Bradford, permitindo uma avaliação precisa das concentrações. Adicionalmente, o meio de cultura selecionado para promover o crescimento das bactérias foi o Ágar MacConkey, amplamente reconhecido por sua eficácia na diferenciação de microrganismos Gram-negativos.

4.3 Equipamentos

Para garantir a eficaz esterilização dos materiais, foi empregada a autoclave digital de 21 litros da Digitale. O controle de temperatura do meio de cultura foi realizado através do banho maria médio digital NT 245 da Novatécnica. As placas de cultura foram mantidas nas temperaturas específicas de incubação por meio da incubadora BOD TE-371 da Tecnal.

Durante os ensaios de quantificação, foram utilizados o agitador magnético múltiplo com aquecimento SP – 10206/A da Splabor, bem como o agitador vortéx de tubos AP – 56 da Phoenix Luferco. A separação das amostras foi efetuada por meio da centrífuga refrigerada 2-16PK da Sigma. Para determinação das concentrações proteicas, as leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro SP 2000 UV da Bel Photonics. As análises dos dados foram feitas com auxílio dos softwares Microsoft Excel 2016 e GraphPad Prism 8.0.1.

4.4 Análise microbiológica

4.4.1 Preparo do meio de cultura

Para preparo do meio de cultura, foram adicionados 25 g de Agar MacConkey desidratado (Kasvi) a 500 mL de água destilada. Após completa homogeneização, o meio foi deixado em repouso por 10 minutos. Em seguida, foi aquecido por 1 minuto até fervura e submetido à autoclavagem a uma temperatura de 121 °C por um período de 20 minutos. Em seguida, distribuiu-se o meio homogênea em placas de Petri, as quais foram previamente autoclavadas. Posteriormente, as placas foram mantidas em condições de esterilização no fluxo laminar, até solidificação do meio. Após manutenção a 37 °C por 24 horas, as placas foram disponibilizadas para uso.

4.4.2 Preparo das amostras

Para os ensaios microbiológicos, os sachês contendo suplementos proteicos foram submetidos à higienização com álcool 70%, seguido pela abertura em fluxo laminar. Um sachê de cada suplemento foi solubilizado em água destilada estéril, seguindo as proporções de massa/volume recomendadas pelos fabricantes.

4.4.3 Inoculação das amostras

Com a alça de níquel esterilizada, as placas foram divididas em dois quadrantes e inoculadas pela técnica de esgotamento. As placas foram estriadas e incubadas em posição

invertida a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi observado se havia ocorrência de manchas com coloração rosada ou avermelhada nas placas indicando crescimento bacteriano. O experimento foi conduzido em triplicata, envolvendo 15 placas com os suplementos de proteínas, 3 placas com controle contendo apenas água destilada e 3 placas designadas de controle inoculadas com a bactéria isolada *E. coli*.

4.5 Quantificação de proteínas solúveis

Para realizar a quantificação de proteínas, foram feitas diluições nos suplementos utilizando diferentes proporções em gramas por mililitros (g/mL), seguindo instruções de cada fabricante: SP1 (1:5 m/v); SP2 (1:6 m/v); SP3 (1:6 m/v); SP4 (1:10 m/v); SP2 (1:9 m/v). Os suplementos foram homogeneizados em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram submetidas a centrifugação a 12.000 x *g* por 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados para determinação do teor de proteínas solúveis (Bradford, 1976). O ensaio foi feito em quadruplicada.

4.6 Análise estatística

Os dados de quantificação das proteínas solúveis foram obtidos em quadruplicada e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a significância das diferenças entre as médias seguido do teste Tukey ($p < 0,05$; nível de confiança de 95%). A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism (versão 8.0.1).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de incubação nas 21 placas do ensaio microbiológico, apenas a placa de controle contendo *E. coli* revelou manchas com coloração rosada, indicando crescimento bacteriano (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Isso ressalta que os suplementos testados não apresentaram contaminação por bactérias Gram-negativas nas condições ensaiadas. Alhamdan, Ahmad e Baothman (2021), também não detectaram contaminação com bactérias Gram-negativas em suplementos de proteína animal.

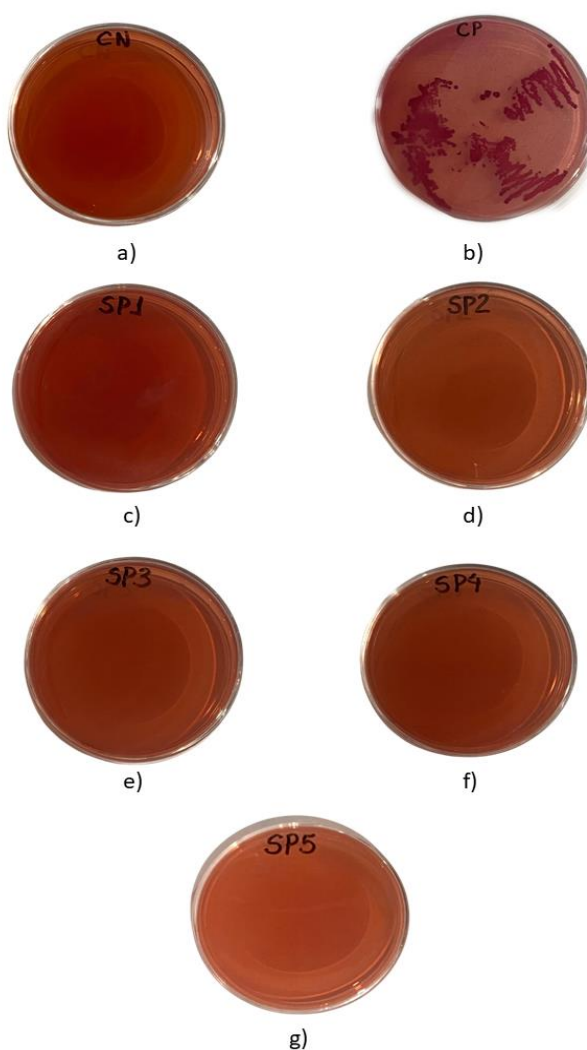


Figura 2. Resultados da análise microbiológica dos suplementos proteicos. a) CN: controle com água destilada. b) CP: controle com *E. coli*. c) SP1: Delicious 3Wheyninho FTW. d) SP2: 3Whey Top Taste *Bodyaction*. e) SP3: 100% Whey Prime *Bodyaction*. f) SP4: DUX Nutrition Lab concentrado. g) SP5: DUX Nutrition Lab isolado.

Dada a composição proteica altamente semelhante de todas as amostras de suplementos avaliados por Avula et al. (2022), o ensaio de Bradford pode ser usado para determinar a concentração de proteína com sensibilidade e seletividade suficientes. Neste estudo, as concentrações proteicas dos suplementos foram calculadas através da equação da reta (preparada a partir de ensaio com proteína padrão) apresentada na Figura 3, na qual “ABS” representa a absorbância e “C”, a concentração em mg/mL.

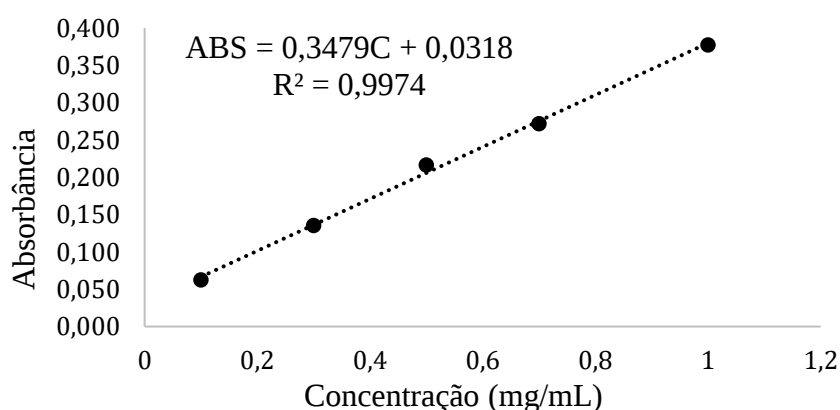


Figura 3. Curva padrão de Bradford

Fonte: Própria autora (2023).

O teor de proteínas solúveis variou significativamente entre os suplementos, conforme Tabela 2. Para cada 100 g de pó em SP1, SP2, SP3, SP4 e SP5, verificou-se respectivamente 33,80; 18,23; 27,0; 93,87; e 32,93 gramas de proteínas solúveis em água.

Tabela 2. Teor de proteínas solúveis de suplementos de diferentes marcas expresso em gramas de proteínas solúveis por 100 g de suplemento (g Ps/100 g suplemento).

ID	g Ps/ 100 g suplemento
SP1	33,80 ± 2,45 ^b
SP2	18,23 ± 2,41 ^c
SP3	27,00 ± 1,04 ^b
SP4	93,87 ± 6,61 ^a
SP5	32,93 ± 1,46 ^b

SP: Suplemento proteico. SP1: Delicious 3Wheyninho FTW. SP2: 3Whey Top Taste *Bodyaction*. SP3: 100% Whey Prime *Bodyaction*. SP4: DUX Nutrition Lab concentrado. SP5: DUX Nutrition Lab isolado. Ps/100 g suplemento: Proteína solúvel por 100 g de suplemento. Média e desvio padrão de quatro experimentos independentes. As médias seguidas por letras diferem estatisticamente entre si (p < 0,05).

A quantidade de proteínas solúveis nos suplementos se relaciona com diferentes fatores, como por exemplo, ao fator de diluição, solvente utilizado e temperatura (Pace et al., 2004). Como exemplo, em geral proteínas se solubilizam melhor com fatores de diluição maiores (Berk,1992). Os rótulos SP1, SP2, SP3, SP4 e SP5 indicam um peso líquido de 40,0 g, 32,0 g, 21,0 g, 20,0 g e 24,0 g, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 1. Considerando a proporção de proteínas em relação ao peso líquido do suplemento, os fabricantes do SP1, SP2, SP3, SP4 e SP5 indicam uma quantidade percentual de proteínas de 60%, 80%, 70%, 80% e 89%, respectivamente.

Considerando a variedade de fatores que contribuem para a solubilização de proteínas em meio líquido, e ainda que os suplementos sejam geralmente diluídos em água, cuja solubilidade pode ser influenciada pela saliva e fluido gástrico ao entrar em contato com o organismo, neste estudo não é possível identificar claramente o suplemento com a maior quantidade de proteínas solúveis no contexto fisiológico/metabólico. No entanto, nossas conclusões indicam que o suplemento SP4 apresenta o mais elevado teor de proteínas solúveis em água.

6 CONCLUSÃO

Diante de um cenário de controle de processos de produção de suplementos com a finalidade de garantir segurança e qualidade, verificou-se através deste estudo, que os cinco suplementos proteicos avaliados não apresentaram crescimento de bactérias Gram-negativas. Observou-se variação nos percentuais de proteínas solúveis em água entre os suplementos, sendo que o Whey Protein Concentrado denominado SP4, proveniente da DUX Nutrition Lab, apresentou-se como o suplemento com o mais elevado percentual nas condições experimentais desta pesquisa. Tais resultados ressaltam a importância de investigações adicionais para a avaliação da estimativa de proteínas solúveis em distintos meios e condições, assim como para compreender seu destino metabólico. Essa abordagem visa contribuir para o desenvolvimento contínuo de suplementos alimentares mais eficazes.

REFERÊNCIAS

ADRIZAL, Y. H.; AMIZAR, R.; MAHATA, M. E. Evaluation of Pineapple [Ananas comosus (L.) Merr] Waste Fermented Using Different Local Microorganism Solutions as Poultry Feed. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 84-89, 2017.

AHSAN, H. Immunopharmacology and immunopathology of peptides and proteins in personal products. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 40, n. 4, p. 439-447, 2019.

ALHAMDAN, M.; AHMAD, A.; BAOTHMAN, O. A. Characterization of Microbes in Protein Supplements Available Commercially. **Microbiology Research Journal International**, v. 31, n. 4, p. 6-15, 2021.

ALJALoud, S. O. et al. Microbiological quality and safety of dietary supplements sold in saudiarabia. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 593-596, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA FINS ESPECIAIS E CONGÊNERES. **ABIAD**, 2023. Consumo de concentrados de proteínas cresceu 25% no Brasil em 2022. Disponível em: <<https://abiad.org.br/2021/wp-content/uploads/2023/03/Numeros-do-setor-ABIAD.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2023.

AVULA, B. et al. A Comprehensive Workflow for the Analysis of Bio-Macromolecular Supplements: Case Study of 20 Whey Protein Products. **Journal of Dietary Supplements**, v. 19, n. 4, p. 515-533, 2022.

BERK, Z. **Technology of production of edible flours and protein products from soybeans**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 178, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 269, de 26 de julho de 2018, Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de Proteína, vitaminas e minerais**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 18, de 27 de abril de 2010, dispõe sobre alimentos para atletas**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 abr. 2010.

BUZBY, J. C.; ROBERTS, T. **The economics of enteric infections: human foodborne disease costs**. *Gastroenterology*, v. 136, n. 6, p. 1851-1862, 2009.

CAMARGO, L. da R.; DONEDA, D.; OLIVEIRA, V. R. Whey protein ingestion in elderly diet and the association with physical, performance and clinical outcomes. **Exp. Gerontol**, v. 137, p. 110936, 2020.

CARVALHO, A. F. et al. Tecnologia de lácteos concentrados e desidratados: O estado da arte da microbiologia de processo. **Indústria de Laticínios**, n. 121, p. 71-73, 2016.

CASTRO, L. H. A. et al. Comparative meta-analysis of the effect of concentrated, hydrolyzed, and isolated whey protein supplementation on body composition of physical activity practitioners. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2047, 2019.

CHUN, S. H. et al. Anti-inflammatory activities of Maillard reaction products from whey protein isolate fermented by *Lactobacillus gasseri* 4M13 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 9, p. 7707-7716, 2019.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

CONGDON, R. W.; MUTH, G. W.; SPLITTGERBER, A. G. The binding interaction of Coomassie blue with proteins. **Analytical biochemistry**, v. 213, n. 2, p. 407-413, 1993.

CHUNGCHUNLAM, S. M. S. et al. Effects of whey protein and its two major protein components on satiety and food intake in normal-weight women. **Physiology & behavior**, v. 175, p. 113-118, 2017.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Value of the Dietary Supplements Market in Europe in 2015 and 2020, by Country (in Million Euros). Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/589452/value-dietary-supplements-markets-europe-by-country/>>.

FANGMEIER, M. et al. Effects of cow, goat, and buffalo milk on the characteristics of cream cheese with whey retention. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 122-128, 2019.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, ed. 2, p. 206, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 182, 2003.

GERHARDT, P. et al. **Methods for general and molecular bacteriology**. American society for Microbiology, 1994.

GRAND VIEW RESEARCH. **Protein Supplements Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Powder, Ready to Drink), By Application, By Raw Material, By Source, By Distribution Channel, By Region, And Segment Forecasts, 2019 - 2025**. Grandview Research.

GRIFFEN, C. et al. Effects of resistance exercise and whey protein supplementation on skeletal muscle strength, mass, physical function, and hormonal and inflammatory biomarkers in healthy active older men: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Experimental Gerontology**, v. 158, p. 111651, 2022.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. de; PAULA, Heberth de. 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, 2006.

HERNANDEZ, A. J. et al. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para saúde. Diretriz da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v.15, n. 3, p. 1-12, 2009.

HUECKER, M. et al. Protein supplementation in sport: source, timing, and intended benefits. **Current nutrition reports**, v. 8, p. 382-396, 2019.

JAENICKE, R. Protein structure and function at low temperatures. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 326, n. 1237, p. 535-553, 1990.

KADAM, B. et al. Health benefits of whey: A brief review. **International Journal of Livestock Research**, v. 8, n. 5, p. 31-49, 2018.

KÅRLUND, A. et al. Protein supplements and their relation with nutrition, microbiota composition and health: is more protein always better for sportspeople?. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 829, 2019.

KINSELLA, J. E. et al. **Advances in food and nutrition research**, v. 33, p. 343-438, 1989.

KJELDAHL, J. G. C. T. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. **Zeitschrift für analytische Chemie**, v. 22, n. 1, p. 366-382, 1883.

KLAEWKLA, J. et al. Whey protein concentrate mixed beverages and plasma amino acid response in young males. **Food Research**, v. 6, n. 3, p. 62-68, 2022.

KUMAR, M. et al. First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. **Science of The Total Environment**, v. 746, p. 141326, 2020.

LACROIX, M. et al. Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 5, p. 1070-1079, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACEDO MOTA, L. F. et al. Genomic Analysis of Milk Protein Fractions in Brown Swiss Cattle. **Animals**, v. 10, n. 2, p. 336, 2020.

MINJ, S.; ANAND, S. Whey proteins and its derivatives: Bioactivity, functionality, and current applications. **Dairy**, v. 1, n. 3, p. 233-258, 2020.)

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NAKANISHI, T. et al. Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins. **J Control Release**, v. 61,1-2, p. 233–240. 1999.

NUNES, L. A. et al. O soro do leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 301-326, 2018.

OSTOJIĆ, S. et al. Processing of whey from dairy industry waste. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, n. 1, p. 29-32, 2005.

OTERO, D. et al. Exploring alternative protein sources: Evidence from patents and articles focusing on food markets. **Food Chemistry**, p. 133486, 2022.

PACE, C. N. et al. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1448, p. 1225-1235, 2004.

PHILLIPS, S. M.; VAN LOON, L. J. Dietary protein for athletes: from requirements to optimum adaptation. **Food, Nutrition and Sports Performance III**, p. 37-46, 2013.

RANKIN, D.; DARRAGH, A. Dietary protein in an endurance exercise recovery beverage: what is the value of whey. In: **Proceedings of the 4th International Whey Conference**. Chicago: American Dairy Products Institute, 2006. p. 36-46.

SANTOS, C. de S.; NASCIMENTO, F. E. L. Isolated branched-chain amino acid intake and muscle protein synthesis in humans: a biochemical review. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 17, 2019.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SMEUNINX, B.; GREIG, C. A.; BREEN, L. Amount, source and pattern of dietary protein intake across the adult lifespan: a cross-sectional study. **Frontiers in nutrition**, v. 7, p. 25, 2020.

STEVENSON, E. J.; ALLERTON, D. M. The role of whey protein in postprandial glycaemic control. **Proceedings of the nutrition society**, v. 77, n. 1, p. 42-51, 2018.

TUNICK, M. H. Whey protein production and utilization: a brief history. **Whey processing, functionality and health benefits**, p. 1-13, 2008.

WANG, K. et al. Whey protein hydrolysate alleviated atherosclerosis and hepatic steatosis by regulating lipid metabolism in apoE^{-/-} mice fed a Western diet. **Food Research International**, v. 157, p. 111419, 2022.

WOOD, Paul; TAVAN, Mahya. A review of the alternative protein industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, p. 100869, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. The role of food safety in health and development: report of a joint FAO/WHO expert committee on food safety. In: **The role of food safety in**

health and development: report of a joint FAO/WHO expert committee on food safety. 1984. p. 79-79.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M.P. **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.