



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1
E MAFBX EM RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS
COM WHEY PROTEINS POR DOZE SEMANAS**

Marcos Roberto Campos de Macêdo

**São Luís
2018**

Marcos Roberto Campos de Macêdo

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1
E MAFBX EM RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS
COM WHEY PROTEINS POR DOZE SEMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Estudo das Doenças Crônicas Degenerativas, Infecciosas e parasitárias no Adulto.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Navarro.

Coordenador: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís
2018

Macêdo, Marcos Roberto Campos de

EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1
E MAFBX EM RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS
COM WHEY PROTEINS POR DOZE SEMANAS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a expressão gênica de Mtor, Murf-1 e Mafbx em ratos Wistar suplementados com whey proteins por doze semanas. Os resultados foram analisados por meio de técnicas de biologia molecular e estatística.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Nutrição da Universidade Federal do Maranhão, sob a orientação do Prof. Dr. Francisco Navarro.

Palavras-chave: Mtor, Murf-1, Mafbx, whey proteins, ratos Wistar.

Contato: Marcos Roberto Campos de Macêdo. E-mail: macedo.marcos@ufma.br

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

Macêdo, Marcos Roberto Campos de.

Expressão Gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBX em Ratos
Wistar Suplementados com Whey Proteins por Doze Semanas /
Marcos Roberto Campos de Macêdo. - 2018.
163 f.

Orientador(a): Francisco Navarro.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2018.

1. Gastrocnêmio. 2. MAFBX. 3. MTOR. 4. MURF-1. 5.
Whey Proteins. I. Navarro, Francisco. II. Título.

MARCOS ROBERTO CAMPOS DE MACÊDO

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1
E MAFBX EM RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS
COM WHEY PROTEINS POR DOZE SEMANAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde do Adulto da
Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para a
obtenção do Título de Mestre em
Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da defesa da Dissertação de Mestrado apresentada em
sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof. Dr. Francisco Navarro (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Melaine Mont'Alverne Lawall Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Christiano Eduardo Veneroso (Examinador Externo)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Flavia Castello Branco Vidal (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

São Luís
2018

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida e me guiar pelos caminhos que escolhi trilhar.

A minha família, que sempre esteve presente e me ofereceu total apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Francisco Navarro, pela amizade, transmissão de conhecimento e por me ensinar a como ser um mestre.

Ao Professor Dr. Antônio Coppi Navarro, pela infinita paciência em ensinar e explicar os detalhes mais criteriosos para escrita, composição e apresentação de inúmeros trabalhos, artigos e a dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos dá a possibilidade de aprender com nossos erros e poder sempre evoluir.

Agradeço a minha família, que através de diversos esforços me concedeu (e sempre concede) a estrutura necessária para que eu alcance meus sonhos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oferta da bolsa que proporcionou a minha manutenção dentro das atividades do programa bem como a adequada execução da presente dissertação.

Agradeço a coordenação e o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD): Professora Dr^a. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, Professora Dr^a. Maria Bethania da Costa Chein, Professora Dr^a. Luciane Maria Oliveira Brito, Professor Dr. Cristiano Teixeira Mostarda, Professor Dr. Emanuel Pericles Salvador, Professora Dr^a. Fernanda Ferreira Lopes, Professora Dr^a. Flávia Castello Branco Vidal Cabral, Professora Dr^a. Haissa Oliveira Brito e a Professora Dr^a. Sally Cristina Moutinho Monteiro, pela paciência, disposição e empenho em transmitir seus conhecimentos para os mestres em ascensão, de modo a garantir que o conhecimento seja transmitido de forma adequada para as próximas gerações.

Agradeço a todos os professores que me fizeram chegar até aqui: Izes Cristina Santos Soeiro (ensino fundamental I), Luís Carlos Monroe e Karla Maria Silva Oliveira Gama (ensino fundamental II), João Batista da Silva (preparatório para o Cefet), Fabrícia de Lima Brito (ensino médio), Lauro Roberto Ferreira Costa, Gabriel Mateus Nascimento de Oliveira, Abrahão Limeira de Oliveira, Rosângela, Daniele Medeiros Guilherme, Cláudia Zeneida Gomes Parente Alves, Adriana Furtado Baldez Mocelin e Paulo Roberto Mocelin (graduação); eu não seria nada sem vocês, meus eternos mestres!!!

Agradeço à Professora Pós-graduada Maria Tereza Medeiros Aureliano de Lima (minha eterna coordenadora), que desde o início da graduação de

incentivou a ter produção científica, ser monitor, apresentar trabalhos em congressos, ser professor, ingressar no mestrado e que até hoje me incentiva para que eu inicie logo o doutorado.

Agradeço de forma especial à Professora Mestre Priscila Sousa Barcellos, que ainda no início da graduação me fez ter gosto por pesquisas mais complexas, principalmente as com modelos animais, e que gerou em mim a decisão de ser pesquisador.

Agradeço à Professora Mestre Thalita de Albuquerque Veras Câmara, pela primeira oportunidade de participar de uma pesquisa com modelos animais, pesquisa que, por sua vez que me proporcionou aptidão para executar a pesquisa no mestrado.

Agradeço à Professora Mestre Monique Silva Nogueira de Carvalho e a Professora Mestre Renata Gomes Navarro Karchvartanian, por serem o caminho divino através do qual pude adentrar ao mestrado e por toda preocupação ao longo do programa e da execução da pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Fisiologia e Prescrição do Exercício do Maranhão (LAFIPEMA) e aos guerreiros da equipe Ratatouille: Raphael Marques Furtando, Alanna Joselle Santiago Silva, Júlio Cesar da Costa Machado, Milena de Oliveira Silva, Anne Karynne da Silva Barbosa e Karina Martins Cardoso pelos inúmeros dias e noites despendidos para executar não somente essa pesquisa, mas de inúmeros outros trabalhos e artigos. Além de uma grande equipe de trabalho, esse grupo se tornou uma família, cada um com seus jeitos e manias, que irá conviver por bastante tempo no ambiente do mestrado e também fora dele.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Francisco Navarro, por me aceitar como seu orientando e por conduzir meu processo de orientação de forma a me tornar um pesquisador autônomo, independente e preparado para a pesquisa e para a docência no ensino superior.

EPÍGRAFES

“Planos não passam de boas intenções, a menos que imediatamente se transformem em trabalho duro”

(Peter Drucker)

RESUMO

Introdução: As proteínas do soro do leite têm sido muito utilizadas por praticantes de atividades físicas e atletas, especialmente por possuírem alto valor nutricional e apresentarem relação comprovada com a hipertrofia muscular. Sua importância muitas vezes é superestimada, levando atletas e indivíduos praticantes de atividades físicas a consumirem doses muito elevadas de proteínas, sem a garantia de benefícios adicionais. **Objetivo:** Verificar o efeito da suplementação de diferentes doses de Whey Proteins durante 12 semanas na expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBx e na alteração do diâmetro celular do músculo gastrocnêmio. **Metodologia:** A presente pesquisa teve aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais-UFMA (protocolo nº 23115.014424/2015-54). Delineamento experimental, com 38 *Rattus norvegicus* machos da linhagem Wistar com idade inicial de 60 dias e massa corporal de 250g, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, sendo um controle e três de intervenção, identificados pelo valor da dosagem do suplemento Whey Proteins (2, 4 e 6g/kg/dia) durante 12 semanas, pelo procedimento de gavagem, três vezes ao dia, com uma hora de diferença entre si. Ao final de 12 semanas de suplementação, seguiu-se um período de 24 horas de jejum, com posterior eutanásia por sobrecarga de cetamina/xilazina (75:10 mg/kg), em seguida extraiu-se a porção branca do músculo gastrocnêmico direito, armazenou-se na solução RnA Lateral, foi armazenado a -80°C, sendo submetido à análise de reação de cadeia de polimerase em tempo real. O músculo gastrocnêmio esquerdo foi destinado a análises histológicas. Tabulou-se os dados e analisou-se com estatística descritiva e analítica (Shapiro-Wilk ($p>0,05$), Anova ($p<0,05$) e Pós teste de Tukey ($p<0,05$)). **Resultados e Discussão:** A expressão gênica de MTOR mRNA teve significância estatística inferior nos grupos Whey 2, Whey 4 e Whey 6 em relação ao grupo controle, na ordem de 100%, 97% e 96%, respectivamente. Do mesmo modo, a expressão gênica de MURF-1 mRNA teve significância estatística inferior nos grupos Whey 2, Whey 4 e Whey 6 em relação ao grupo controle, na ordem de 65%, 75% e 84%, respectivamente. Em linha, a expressão gênica MAFBX mRNA teve significância estatística inferior nos grupos Whey 2, Whey 4 e Whey 6 em relação ao grupo controle, na ordem de 99%, 97% e 99%, respectivamente. Não houve diferença estatística na área celular do músculo gastrocnêmio entre os grupos. **Conclusão:** Portanto, a suplementação de Whey Proteins nas doses de 2, 4 e 6 g/kg/dia durante 12 semanas em animais sedentários não foi capaz de aumentar a expressão gênica de MTOR mRNA, no entanto, foi capaz de reduzir a expressão gênica de MURF-1 mRNA e MAFBX mRNA.

Palavras-chave: Whey Proteins, MTOR, MURF-1, MAFBX, Gastrocnêmio.

ABSTRACT

Introduction: The whey proteins have long been used by practitioners of physical activities and athletes, especially because they have high nutritional value and present proven link with muscle hypertrophy. Its importance is often overestimated, leading athletes and physical activity individuals to consume very high doses of protein, without the guarantee of additional benefits.

Objective: To verify the effect of the supplementation of different doses of Whey Proteins during 12 weeks in the gene expression of MTOR, MURF-1 and MAFBx and in the alteration of the cellular diameter of the gastrocnemius muscle.

Methodology: The present study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (UFMA protocol no. 23115.014424/2015-54). Experimental design, with 38 male *Rattus norvegicus* Wistar rats aged 60 days and body mass of 250g, were randomly assigned to four groups, one control and three intervention groups, identified by the Whey Proteins supplementation dosage (2, 4 and 6 g/kg/day) for 12 weeks by the gavage procedure three times a day, one hour apart. At the end of 12 weeks of supplementation, a 24-hour fasting period followed by euthanasia over ketamine/xylazine overload (75:10 mg / kg), the right white gastrocnemius muscle was removed and stored in the Rna Lateral solution, then it was stored at -80 ° C and subjected to real-time polymerase chain reaction analysis. The left gastrocnemius muscle was intended for histological analysis. Data were then tabulated and analyzed with descriptive and analytical statistics (Shapiro-Wilk ($p > 0.05$), Anova ($p < 0.05$) and Tukey's test post ($p < 0.05$)). **Results and Discussion:** Gene expression of MTOR mRNA had lower statistical significance in the groups of Whey 2, Whey 4 and Whey 6 than in the control group, in the order of 100%, 97% and 96%, respectively. Likewise, the gene expression of MURF-1 mRNA had lower statistical significance in the groups of Whey 2, Whey 4 and Whey 6 than the control group, in the order of 65%, 75% and 84%, respectively. In line, the gene expression MAFBX mRNA had lower statistical significance in the groups Whey 2, Whey 4 and Whey 6 in relation to the control group, in the order of 99%, 97% and 99%, respectively. There was no statistical difference in the cellular area of the gastrocnemius muscle between the groups. **Conclusion:** Therefore, supplementation of Whey Proteins at doses of 2, 4 and 6 g / kg / day for 12 weeks in sedentary animals was not able to increase the gene expression of MTOR mRNA, however, it was able to reduce the gene expression of MURF -1 mRNA and MAFBX mRNA.

Key words: Whey Proteins, MTOR, MUFR-1, MAFBX, Gastrocnemius.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Itens	Título da figura	Página
Figura 1	Ilustração da proteína MTOR	23
Figura 2	Atuação da via MTOR	24
Figura 3	Benefícios das Whey Proteins	25
Figura 4	Atuação do sistema ubiquitina-proteassoma	26
Figura 5	Ilustração da proteína MAFBX	27
Figura 6	Ilustração da proteína MURF-1	27
Figura 7	Distribuição dos grupos experimentais e protocolo de suplementação	37
Figura 8	Organização temporal do protocolo experimental	37
Figura 9	Mensuração de área celular do músculo gastrocnêmio	45
Figura 10	Alteração de consumo de ração do grupo controle em 12 semanas	50
Figura 11	Alteração de consumo de ração do grupo Whey 2 em 12 semanas	52
Figura 12	Alteração de consumo de ração do grupo Whey 4 em 12 semanas	54
Figura 13	Alteração de consumo de ração do grupo Whey 6 em 12 semanas	56
Figura 14	Comparação da alteração do consumo de ração entre os grupos em 12 semanas	57
Figura 15	Alteração de consumo de proteína na ração do grupo controle em 12 semanas	60

Figura 16	Alteração de consumo de proteína na ração do grupo Whey 2 em 12 semanas	62
Figura 17	Alteração de consumo de proteína na ração do grupo Whey 4 em 12 semanas	64
Figura 18	Alteração de consumo de proteína na ração do grupo Whey 6 em 12 semanas	66
Figura 19	Comparação da alteração de consumo de proteína da ração entre os grupos em 12 semanas	67
Figura 20	Alteração de consumo de Whey Proteins do grupo Whey 2 em 12 semanas	69
Figura 21	Alteração de consumo de Whey Proteins do grupo Whey 4 em 12 semanas	71
Figura 22	Alteração de consumo de Whey Proteins do grupo Whey 6 em 12 semanas	73
Figura 23	Comparação do consumo total de proteína entre os grupos em 12 semanas	74
Figura 24	Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo controle	77
Figura 25	Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 2	80
Figura 26	Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 4	83
Figura 27	Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 6	86
Figura 28	Comparação da alteração da massa corporal total entre os grupos em 12 semanas	87
Figura 29	Alteração do Δ de massa corporal do grupo controle em 12 semanas	90

Figura 30	Alteração do Δ de massa corporal do grupo Whey 2 em 12 semanas	92
Figura 31	Alteração do Δ de massa corporal do grupo Whey 4 em 12 semanas	94
Figura 32	Alteração do Δ de massa corporal do grupo Whey 6 em 12 semanas	96
Figura 33	Comparação da alteração do Δ da massa corporal entre os grupos em 12 semanas	97
Figura 34	Comparação da massa total do músculo gastrocnêmio	101
Figura 35	Comparação da massa relativa do músculo gastrocnêmio	102
Figura 36	Alteração da expressão gênica de MTOR mRNA	104
Figura 37	Alteração da expressão gênica de MURF-1 mRNA	106
Figura 38	Alteração da expressão gênica de MAFBX mRNA	108
Figura 39	Alteração da área das células do músculo gastrocnêmio	110

LISTA DE TABELA E QUADROS

Itens	Título da tabela, quadro	Página
Tabela 1	Recomendação dietética diária de proteínas para homens e mulheres	21
Quadro 1	Composição Nutricional da Ração para Animais de Laboratório Nuvilab CR-1	38
Quadro 2	Composição Nutricional da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Protein	40
Quadro 3	Aminograma da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Protein	40
Quadro 4	Média de consumo em gramas de ração por semana dos grupos	48
Quadro 5	Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo controle	49
Quadro 6	Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo Whey 2	51
Quadro 7	Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo Whey 4	53
Quadro 8	Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo Whey 6	55
Quadro 9	Média do consumo em gramas de proteína dos grupos	58
Quadro 10	Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo controle	59
Quadro 11	Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo Whey 2	61

Quadro 12	Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo Whey 4	63
Quadro 13	Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo Whey 6	65
Quadro 14	Comparação da média do consumo de Whey Proteins por semana em 12 semanas no grupo Whey 2	68
Quadro 15	Comparação da média do consumo de Whey Proteins por semana em 12 semanas no grupo Whey 4	70
Quadro 16	Comparação da média do consumo de Whey Proteins por semana em 12 semanas no grupo Whey 6	72
Quadro 17	Massa corporal total por semana em gramas do grupo controle	75
Quadro 18	Comparação da média do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo controle	76
Quadro 19	Massa corporal total por semana em gramas do grupo Whey 2	78
Quadro 20	Comparação da média do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 2	79
Quadro 21	Massa corporal total por semana em gramas do grupo Whey 4	81
Quadro 22	Comparação da média do ganho de massa corporal em 12 semanas no grupo Whey 4	82
Quadro 23	Massa corporal total por semana em gramas do grupo Whey 6	84
Quadro 24	Comparação da média do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 6	85
Quadro 25	Média da massa corporal total e Δ de massa corporal em gramas dos grupos	88

Quadro 26	Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo controle	89
Quadro 27	Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo Whey 2	91
Quadro 28	Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo Whey 4	93
Quadro 29	Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo Whey 6	95
Quadro 30	Massa total em gramas do músculo gastrocnêmio...	98
Quadro 31	Massa relativa do músculo gastrocnêmio	99
Quadro 32	Comparação entre grupos da massa total do músculo gastrocnêmio	100
Quadro 33	Comparação entre grupos da massa relativa (mg/g) do músculo gastrocnêmio	100
Quadro 34	Comparação da expressão gênica de MTOR mRNA entre os grupos	103
Quadro 35	Comparação da expressão gênica de MURF-1 mRNA entre os grupos	105
Quadro 36	Comparação da expressão gênica de MAFBX mRNA entre os grupos	107
Quadro 37	Área das células do músculo gastrocnêmio dos grupos	109
Quadro 38	Comparação da área celular do músculo gastrocnêmio entre os grupos	109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	Expressão Gênica	29
2.1.1	Expressão Gênica em Modelos de Suplementação de Aminoácidos	29
2.1.2	Expressão Gênica em Modelos de Suplementação de Proteínas	30
2.2	Músculo Gastrocnêmio	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Aspectos Éticos	36
4.2	Tipo de Estudo	36
4.3	Desenho Experimental	37
4.4	Período e Local de Estudo	38
4.5	Amostra/Amostragem	38
4.6	Instrumento de Coleta e Avaliação de Dados	39
4.6.1	Suplementação	39
4.6.2	Obtenção de Material Biológico	41
4.6.3	Avaliação da Expressão Gênica	41

4.6.4	Análises Histológicas	44
4.6.5	Processamento e Tratamento Estatístico	46
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	111
7	CONCLUSÃO	117
8	REFERÊNCIAS	118
9	ANEXOS	125

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, sendo construídas a partir da combinação de 20 aminoácidos e a sequência destes determina qual a função que a proteína exercerá no organismo, que pode ser hormonal como a insulina e o hormônio do crescimento, de defesa como as imunoglobulinas, de transporte como albumina sérica, transferrina e hemoglobina e a estrutural, como a fibrina, o colágeno, a elastina e a actina. (LEHNINGER, NELSON E COX, 2006; DAMODARAN, 1996).

As proteínas estruturais, como a actina e miosina, que formam o tecido muscular esquelético, tem papel fundamental na ação muscular, possibilitando a contração muscular ao deslizarem uma sobre a outra. As células musculares possuem cerca de 20% do seu peso total em proteínas, podendo aumentar em graus variáveis com a aplicação sistemática do treinamento de força. Nesse sentido, existe uma crença, especialmente entre os praticantes de atividade física, que as dietas hiperproteicas aumentam o volume muscular, a força e melhoram o desempenho físico (MENON E SANTOS, 2012).

Por conta disso, os suplementos proteicos são os mais utilizados entre os praticantes de atividade física com a principal finalidade de aumentar a massa magra (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2007).

Dentre eles, as proteínas do soro do leite têm sido muito utilizadas por praticantes de atividades físicas e atletas, especialmente por possuírem alto valor nutricional e apresentarem relação comprovada com a hipertrofia muscular (CARRILHO, 2013).

A proteína do soro do leite é um componente de proteína láctea que foi especulada com potencial para contribuir para a bioatividade de produtos lácteos. Além disso, por conter uma quantia elevada de aminoácidos de cadeia ramificada, especificamente leucina, e principalmente pela praticidade de administração após o exercício, estudos vem sendo feitos para verificar qual a dose necessária para promover hipertrofia muscular (ZAMBÃO, ROCCO E HEYDE 2015; PAL E RADAVELLI-BAGATINI, 2013).

Dessa forma, os aminoácidos de cadeia ramificada perfazem 21,2% de sua composição e todos os aminoácidos essenciais constituem 42,7%. Esta composição ultrapassa as doses recomendadas para as crianças de dois a cinco anos e para os adultos. Este aspecto torna o soro do leite uma fonte proteica concentrada em aminoácidos essenciais, especificamente leucina, em comparação às demais fontes de proteína (TERADA E COLABORADORES, 2009).

Por conta disso, esse perfil de aminoácidos torna a sua digestão e absorção intestinal mais rápida, o que proporciona elevação da concentração de aminoácidos no plasma que, por outro lado, estimula a síntese de proteínas nos tecidos (HARAGUCHI, ABREU E DE PAULA, 2006).

Dentre estes, a leucina é o aminoácido de cadeia ramificada que é encontrado em grandes concentrações no soro do leite, sendo esse aminoácido amplamente estudado como um estimulador da síntese da proteína muscular em seres humanos (CHURCHWARD-VENNE E COLABORADORES, 2014). Portanto, a proteína de soro de leite, contendo leucina, é importante para estimular a perda de tecido adiposo e para promover a manutenção da massa magra. (SUN E ZEMEL, 2009).

Em consonância, o consumo de proteína de soro de leite tem proporcionado resultados positivos no que se refere ao aumento da síntese pós-prandial aguda de proteínas miofibrilares em roedores (NORTON E COLABORADORES, 2012) e em seres humanos (WITARD E COLABORADORES, 2014), enquanto a suplementação crônica dessa mesma proteína tem sido utilizada para proporcionar o aumento da massa muscular consistente quando associada ao exercício físico (MILLER, ALEXANDER E PEREZ, 2014).

Nesse sentido, a base metabólica que fundamenta o aumento da massa muscular é o balanço positivo de proteínas musculares. Dessa forma, o fornecimento de uma mistura completa de aminoácidos aumenta a síntese de proteínas miofibrilares através da ativação do complexo alvo de rapamicina-1 (DICKINSON E COLABORADORES, 2011).

Este efeito sobre a síntese proteica miofibrilar é atribuído principalmente a aminoácidos essenciais já que os aminoácidos não essenciais não estimulam síntese proteica miofibrilar (VOLPI E COLABORADORES, 2003).

Dessa forma, a relação entre os aminoácidos, a proteína do soro do leite e a ativação da síntese proteica miofibrilar é dose-dependente e saturável (MOORE E COLABORADORES, 2009; YANG E COLABORADORES, 2012).

Nesse sentido, a utilização de suplementos comerciais contendo proteínas e/ou aminoácidos tem aumentado entre atletas de rendimento e praticantes de atividade física, que desejam, como objetivo principal a elevação do valor biológico das proteínas distribuídas nas refeições diárias, devido aos seus efeitos na prevenção da perda de massa muscular e na sua implicação positiva da síntese proteica (MENON E SANTOS, 2012).

Devido a isso, a indústria nacional de suplementos nutricionais alcançou um crescimento de 10% em sua produção no ano de 2016, com um faturamento em torno de R\$ 1,49 bilhão de reais (BRASNUTRI, 2017).

Corroborando com essa informação, temos a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres (2015), afirmando que cerca de 54% dos domicílios brasileiros consumiram algum tipo de suplemento, tendo como as principais motivações para o consumo de suplementos alimentares a complementação da alimentação e a melhora do quadro de saúde, dentre os mais consumidos destacam-se as vitaminas e multivitamínicos com 48% e as proteínas e aminoácidos com 30%.

No que tange aos suplementos proteicos, compreende-se que as proteínas são elementos vitais para a promoção bem-sucedida do processo de hipertrofia muscular, especialmente em decorrência do exercício com sobrecargas. Sendo essa importância, muitas vezes superestimada, levando atletas e indivíduos praticantes de atividades físicas a consumirem doses muito elevadas de proteínas. E a ingestão de proteínas por atletas está, na maioria das vezes, superdimensionada, podendo chegar a valores da ordem de 4,0 a 6,2g/kg/dia (BACURAU, 2009).

No entanto, considera-se uma dieta hiperprotéica, quando a ingestão de proteínas ocorre em torno de 1,8 a 3,3g/kg/dia (LANCHA JUNIOR, CAMPOS-FERRAZ E ROGERI, 2009).

Em relação a indivíduos que não praticam o exercício físico, a Ingestão Diária Recomendada para homens e mulheres adultos é de 0,8g/kg/dia de proteína de alto valor biológico, para chegar a esse valor, a diferença da Ingestão Média Estimada de proteína total foi determinada pela diferença na média da massa corporal (conforme reportado na tabela 1), que foi de 70 kg para homens e 57 kg para mulheres, resultando na Ingestão Média Estimada de 47g/dia e 38g/dia e Ingestão Diária Recomendada de 56g/dia e 46g/dia, respectivamente (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005).

Tabela 1: Recomendação dietética diária de proteínas para homens e mulheres.

Homens	Proteína (g/dia)
9 a 13 anos	34
14 a 18 anos	52
19 a 30 anos	56
31 a 50 anos	56
51 a 70 anos	56
> 70 anos	56
Mulheres	
9 a 13 anos	34
14 a 18 anos	46
19 a 30 anos	46
31 a 50 anos	46
51 a 70 anos	46
> 70 anos	46

(INSTITUTE OF MEDICINE, 2005).

Segundo Dunford (2012), um dos maiores riscos em administrar uma alimentação com teores de proteína acima do recomendado está em desconsiderar a necessidade de carboidratos e lipídios, gerando um possível

déficit nutricional, o que também prejudica o desempenho nos treinamentos e na hipertrofia muscular.

Assim, é possível afirmar que o conteúdo de proteína da dieta é essencial para hipertrofia muscular e esta necessidade pode ser suprida por uma alimentação equilibrada e adequada ao indivíduo. A suplementação pode ser uma opção quando certificada a impossibilidade de suprir a necessidade proteica pela alimentação, uma vez que os aminoácidos disponíveis possibilitam a síntese de proteína miofibrilar (ZAMBÃO, ROCCO E HEYDE, 2015).

Sendo assim, esse estudo é justificado pela necessidade da determinação da expressão gênica de proteínas relacionadas com a síntese e degradação proteica em função de doses supra fisiológicas de Whey Proteins.

Diante disso, as hipóteses do presente estudo são, a hipótese alternativa, de que a suplementação com proteínas do soro do leite é capaz de promover alteração na expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBx ou a não alteração da expressão gênica (hipótese nula) dessas proteínas relacionadas à síntese e à degradação proteica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A hipertrofia muscular crônica é um processo adaptativo resultante da replicação das miofibrilas em paralelo dentro das fibras musculares já existentes, também é entendida como o balanço positivo entre a síntese e a degradação proteica, realizado pela coordenação integrada de vias de sinalização intracelular. Nesse sentido, a taxa de síntese de proteínas é mediada pela ativação de uma rede celular de vias de sinalização que envolve a rapamicina em mamíferos (MTOR), ilustrada na figura 1, sendo uma central de serina/treonina-quinase que integra vários sinais diferentes que regulam a tradução de ácido ribonucleico mensageiro (LAPLANTE E SABATINI, 2012).

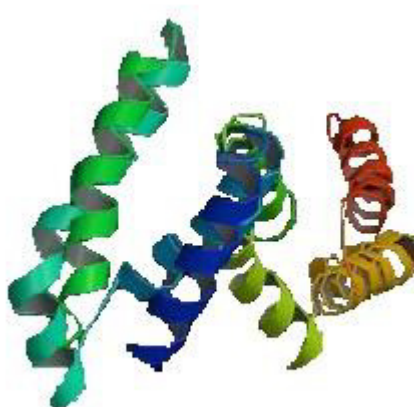


Figura 1: Ilustração da proteína MTOR (<https://cansar.icr.ac.uk/>).

Em linha, a atividade da via MTOR, conforme podemos observar na figura 2, pode ser melhorada pelo consumo de aminoácidos e proteínas, especialmente aqueles com alto teor de leucina (LUO, CHEN E YU, 2013).

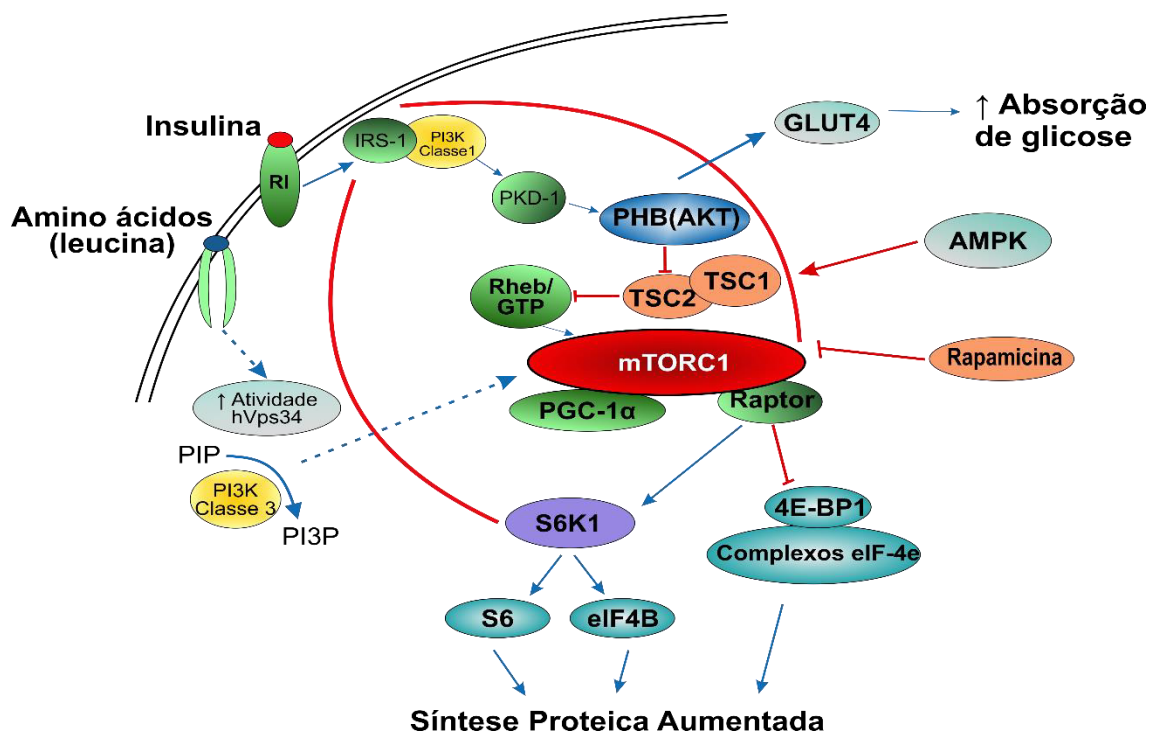


Figura 2: Atuação da via MTOR (MCIVER, WYCHERLEY E CLIFTON, 2012).

Portanto, a proteína de soro de leite merece atenção especial, pois está presente em uma variedade de alimentos especiais para praticantes de atividade física e para atletas, e vários benefícios, conforme podemos observar na figura 3, das Whey Proteins já foram relatados (AOI E COLABORADORES, 2011).



Figura 3: Benefícios das Whey Proteins (KRISSANSEN, 2007).

A degradação da proteína muscular é mediada primariamente (entre 80% e 90%) pelo sistema ubiquitina proteassoma conforme podemos observar na figura 4, que inclui três componentes que participam em reações de transferência de ubiquitina: ubiquitina ativadora da enzima (E1), a conjugação de ubiquitina-enzima (E2), e as ligases de ubiquitina (E3) (BONDINE E COLABORADORES, 2001; ROM E REZNICK, 2016).

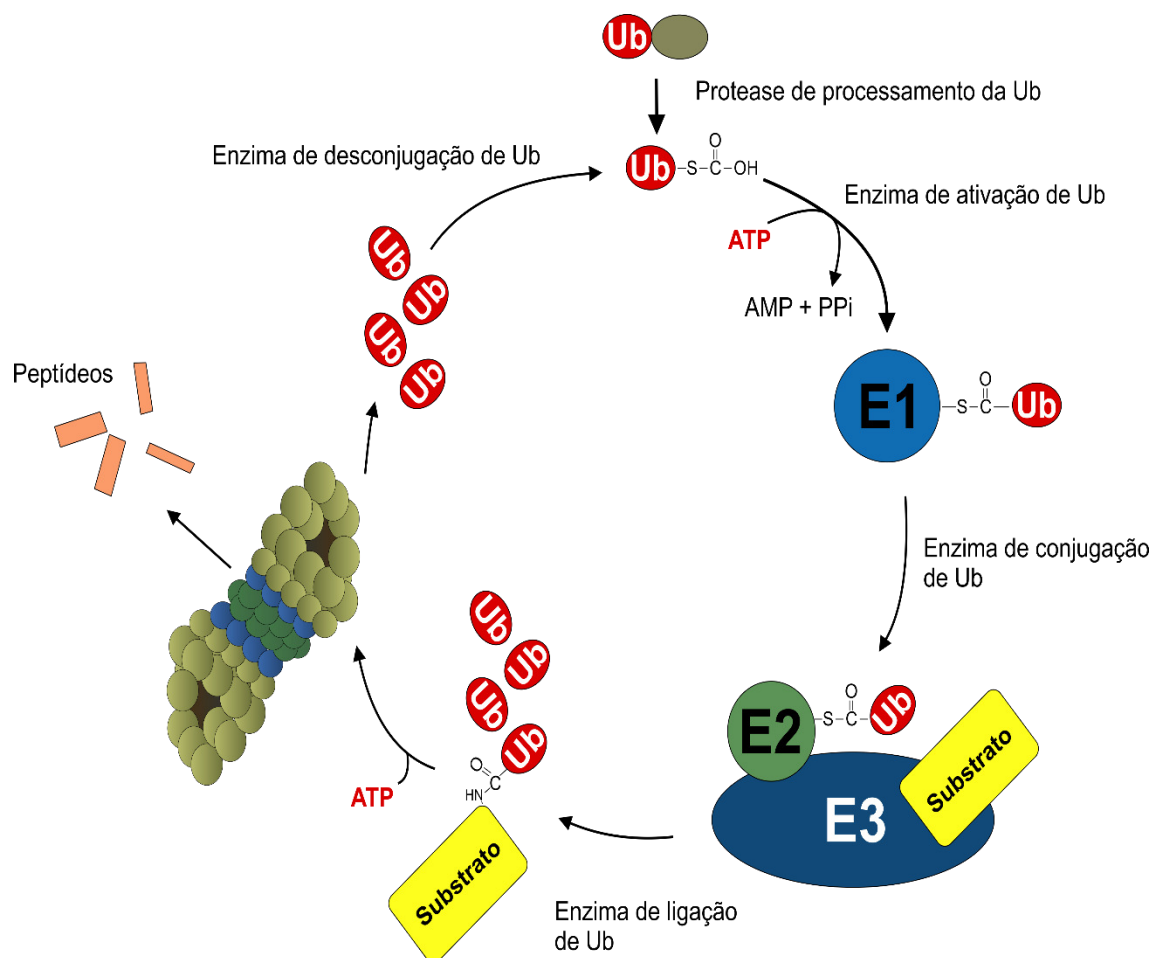


Figura 4: Atuação do sistema Ubiquitina-Proteassoma (RAMOS, 2005).

Das ligases de ubiquitina, especialmente a MAFBX e a MURF-1, representadas nas figuras 5 e 6, respectivamente, são enzimas chave mediando a perda de proteína muscular e estão presentes em numerosas condições catabólicas (MALLINSON E MURTON, 2013; FOLETTA E COLABORADORES, 2011).

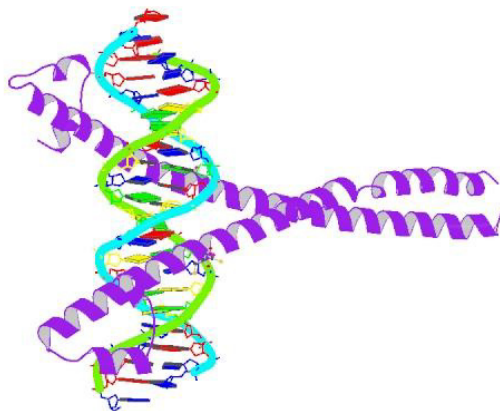


Figura 5: Ilustração da proteína MAFBX (<https://cansar.icr.ac.uk/>).



Figura 6: Ilustração da proteína MURF-1 (<https://cansar.icr.ac.uk/>).

Diante do exposto, a expressão gênica é o mecanismo pelo qual a informação contida em um gene é utilizada para sintetizar ácidos ribonucleicos ou proteínas (ALBERTS E COLABORADORES, 2006; KARP, 2005).

Desse modo, a biossíntese de novas unidades contráteis ocorre por processos conhecidos e estudados de fluxo de informação gênica, que se iniciam com a transcrição, que envolve os processos de replicação, manutenção e rearranjos do Ácido Desoxirribonucleico, síntese e processamento do Ácido Ribonucleico e culminando com a tradução, que

envolve processos como a síntese, processamento e regulação proteica (CRYSTAL, 1995; DONI-KELLER E COLABORADORES, 1987).

Dentre as vias de sinalização necessárias para a síntese de proteína muscular, está a Proteína Quinase B que promove o início da tradução. Essa proteína está relacionada com a fosforilação da cascata enzimática da proteína quinase reconhecida como Alvo da Rapamicina em Mamíferos (MTOR), que por sua vez é mediadora das fases de transcrição gênica, síntese proteica e proliferação celular (VILLANUEVA, HE E SCHROEDER, 2014; FARNFIELD E COLABORADORES, 2009; FERNANDES E COLABORADORES, 2008).

De maneira complementar, o “*turnover*” de proteínas é um processo no qual todas as proteínas intracelulares e muitas proteínas extracelulares devem ser hidrolisadas a aminoácidos que as constituem e, posteriormente, substituídas através da síntese de proteica. De forma antagônica, porém sinérgica, as células dos mamíferos possuem alguns sistemas proteolíticos responsáveis pelo processo de degradação proteica, além disso, também possuem diversos mecanismos regulatórios que garantem a alta seletividade da proteólise, de modo a prevenir a degradação excessiva dos constituintes celulares (LECKER E COLABORADORES, 1999).

Dessa forma, a via de proteólise medida pelo proteassoma é reconhecida por atuar de forma importante no processo atrófico, atuando diretamente no tecido muscular. Para que ocorra a degradação de proteínas via proteassoma, é necessário que ocorra a ligação entre a proteína-substrato e um peptídeo de 76 aminoácidos conhecido como ubiquitina. Dessa maneira, o processo de ubiquitinação ocorre em 3 etapas e envolve 3 enzimas chave: as enzimas ativadoras da ubiquitina (E1), as enzimas carreadoras da ubiquitina ativada (E2) e as ligases de ubiquitina (E3). As E3 são responsáveis pela especificidade da ubiquitinação, reconhecendo a proteína-substrato e transferindo o conjugado ubiquitina para resíduos de lisina dessa proteína. A proteína marcada é reconhecida e degradada no complexo 26S do proteassoma (GOMES E COLABORADORES, 2001; HERSHKO E CIECHANOVER, 1998).

2.1 Expressão Gênica

2.1.1 Expressão Gênica em Modelos de Suplementação de Aminoácidos

Na investigação de Lomonosova e colaboradores (2014), com duração de 48 horas, com 4 grupos experimentais contendo 14 ratos Wistar cada, machos, com idade de 3 meses, com massa corporal entre 254 e 276 gramas, organizados em grupo controle (mantidas as condições de controle); grupo exercício (submetidos ao treinamento aeróbio declinado excêntrico); grupo exercício 90 (submetidos ao treinamento aeróbio declinado excêntrico; e suplementação de arginina a 90 mg/kg/dia) e grupo exercício 500 (submetidos ao treinamento aeróbio declinado excêntrico e suplementação de arginina a 500 mg/kg/dia). Foi relatado que a expressão gênica de MAFBx e MURF-1 foi reduzida em função da suplementação com arginina (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico).

Em adição, no trabalho desenvolvido por Lambertucci e colaboradores (2012), com duração de 15 dias, realizado com 4 grupos experimentais, contendo 6 ratos Wistar cada, machos, distribuídos no seguinte formato: grupo controle (mantidas as condições de controle); grupo glutamina (1g/kg); grupo diabetes (mantidas as condições de controle); e grupo diabetes com glutamina (1g/kg), observou-se que, em relação à expressão gênica de MTOR, não houve alteração entre os grupos experimentais.

No que se refere à expressão gênica de MAFBx, não houve alteração entre os grupos, entretanto, a expressão gênica foi aumentada (o autor não apresenta o valor de “p” encontrado no teste estatístico) pela indução de diabetes, sendo reduzida pela suplementação de glutamina.

Em linha, na pesquisa de Lomonosova e colaboradores (2011), com duração de 14 dias, com 3 grupos experimentais contendo 14 ratos Wistar cada, machos, com idade de 10 semanas, com peso corporal de

aproximadamente 220 gramas, distribuídos em grupo controle (mantidas as condições de controle); grupo suspenso (membros posteriores suspensos); e grupo suspenso suplementado (membros posteriores suspensos e a administração de L-arginina 500 mg/kg com água). Foi relatado aumento na expressão gênica de MURF-1 e MAFBx, no grupo suspenso, em comparação com o grupo controle (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico). Em contraste, não houve diferença na expressão gênica entre o grupo suspenso suplementado e o grupo controle.

Desse modo, com a apresentação dos estudos experimentais é possível propor que a suplementação de aminoácidos é capaz de regular negativamente a expressão gênica de proteínas relacionadas à atrofia muscular, contribuindo assim para a diminuição da perda de tecido muscular e a manutenção de suas funções.

2.1.2 Expressão Gênica em Modelos de Suplementação de Proteínas

No trabalho de Mobley e colaboradores (2015), com duração de 180 minutos, com 4 grupos experimentais contendo de 8 a 13 animais cada, machos, (o autor não informou a idade), com massa corporal de 250 gramas, organizados em grupo controle (tratado com 1 ml de água); grupo ácido fosfatídico (tratado com 0,029 gramas de ácido fosfatídico); grupo Whey (tratado com 0,193 gramas de Whey Proteins concentrado); e grupo Whey + ácido fosfatídico (tratado com 0,193 gramas de Whey Proteins concentrado e com 0,029 gramas de ácido fosfatídico). Foi relatado que houve um aumento de 2,3 vezes na expressão gênica de MURF-1 no grupo Whey + ácido fosfatídico em comparação com o controle (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico), no entanto, a expressão gênica de MAFBx foi semelhante em ambos os grupos.

Em linha, na pesquisa realizada por Haraguchi e colaboradores (2015), com duração de 8 semanas, realizada com 4 grupos experimentais contendo 8

animais cada, machos, com idade de 60 dias, massa corporal de aproximadamente 110 gramas, divididos da seguinte forma: grupo controle sedentário (ração padrão a base de caseína); grupo controle exercício (ração padrão a base de caseína); grupo Whey Proteins sedentário (ração com Whey Proteins em substituição a caseína); e grupo Whey Proteins exercício (ração com Whey Proteins em substituição a caseína). Foi observado que, em relação à expressão gênica de MTOR, que o grupo Whey Proteins exercício apresentou valores semelhantes aos grupos controle sedentário e Whey Proteins sedentário, no entanto apresentou diferença significativa em relação ao controle exercício ($p=0,005$).

Em relação à expressão gênica de MURF-1, houve uma diminuição significativa nos grupos de exercício em relação aos grupos sedentários ($p<0,001$), no que se refere a expressão gênica de MAFBx, houve diminuição significativa nos grupos Whey Proteins, na presença ou ausência do exercício de resistência ($p=0,008$).

Na experimentação realizada por Mobley e colaboradores (2015), com duração de 180 minutos, realizada com 5 grupos experimentais contendo de 6 a 14 animais, machos, com idade entre 8 e 9 semanas, com massa corporal de 250 gramas, organizados da seguinte forma: grupo controle (mantidas as condições de controle); grupo WPC (suplementado com 0,19g de proteína do soro do leite concentrada); grupo 70W/30E (suplementado com 0,19g de proteína, sendo 70% de proteína do soro do leite concentrada e 30% albumina); grupo 50W/50E (suplementado com 0,19g de proteína, sendo 50% de proteína do soro do leite concentrada e 50% albumina); e grupo 30W/70E (suplementado com 0,19g de proteína, sendo 30% de proteína do soro do leite concentrada e 70% albumina). Foi relatado que, em expressão gênica de MAFBx, não houve alteração nos 90 minutos iniciais em todos os grupos, mas aumentou no grupo 70W/30E em comparação ao controle ($p=0,049$) 180 minutos após a suplementação.

Já em relação à expressão de MURF-1, foi relatado que não houve alteração nos 90 minutos iniciais em todos os grupos, mas aumentou nos

grupos WPC e 70W/30E em comparação ao controle ($p=0,020$ e $p=0,032$, respectivamente) 180 minutos após a suplementação.

Na pesquisa realizada por Batistela e colaboradores (2014), com duração de 15 dias, realizada com 2 grupos experimentais contendo 7 animais cada, machos, com idade entre 30 dias, com massa corporal de 95 gramas, organizados da seguinte forma: grupo controle (recebeu dieta contendo 63% de carboidratos e 17% de proteínas); e grupo LPHC (recebeu dieta contendo 74% de carboidrato e 6% de proteína). Foi relatado que a expressão gênica de MURF-1 e MAFBx foi reduzida em 57% e 34%, respectivamente, nos animais do grupo LPHC (embora os autores não apresentem o valor do “p” encontrado no teste estatístico).

Corroborando, Abe e colaboradores (2013), um seu estudo com duração de 4 dias, com grupos experimentais contendo 5 animais cada, (o autor não informa o sexo), com idade de 6 semanas, com excisão de 10mm do nervo ciático da perna direita organizados em grupo controle (dieta contendo 20% de caseína); grupo soja (dieta contendo 20% de proteína isolada da soja), grupo glicina de soja (dieta contendo 20% de glicinina); e grupo caseína com glicina (dieta contendo 10% de caseína e 10% de glicinina de soja), avaliados em 1, 3, 3½ ou 4 dias após a operação. Foi relatado que a expressão induzida por desnervação de MURF-1 e MAFBx foi anulada no grupo glicina de soja em comparação com controle (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico).

Em contraste, na investigação de Luo e colaboradores (2010), com duração de 14 dias, com 3 grupos experimentais com 10 animais cada, machos, (o autor não informou a idade), com massa corporal de 62,55 gramas, agrupados em grupo caseína (submetido ao consumo controlado de ração a base de caseína); grupo soja (submetido ao consumo controlado de ração a base de proteína isolada da soja); e grupo zeína (submetido ao consumo controlado de ração a base de proteína do milho). Foi relatado que a expressão gênica de MTOR aumentou no grupo zeína (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico).

Em relação à expressão gênica de MURF-1, houve aumento significativo de aproximadamente 8 vezes no grupo zeína em comparação com o grupo caseína e o grupo soja ($p=0,003$).

Em linha, a expressão gênica de MAFBx foi 4 vezes maior no grupo zeína em comparação com o grupo caseína e o grupo soja (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico).

Diante disso, com os 6 estudos apresentados, compreende-se que a suplementação de proteínas tem papel de destaque no metabolismo muscular e atua de forma direta na expressão gênica de proteínas musculares relacionadas com a degradação muscular, com regulação positiva e negativa dessas vias, a depender do protocolo utilizado.

Desse modo, isso é justificado pela maior rotação de proteínas musculares, ou seja, aumento da síntese proteica muscular em paralelo com o aumento das taxas de degradação, ao invés do aumento isolado dos mecanismos atroficos, contribuindo, portanto, para a diminuição da perda de tecido muscular e a manutenção de suas funções.

2.2 Músculo Gastrocnêmio

O músculo esquelético é o tecido mais abundante entre os vertebrados. O tecido muscular adulto é composto por células alongadas e multinucleadas, tendo de 10 a 100 micrômetros de diâmetro, que alcançam vários centímetros de comprimento, com núcleos localizados na periferia, junto à membrana plasmática. Seu citoplasma é preenchido pelas miofibrilas, que são filamentos proteicos dispostos de forma longitudinal. As miofibrilas são formadas principalmente pelas proteínas actina e miosina, que conferem capacidade contrátil ao músculo esquelético (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Dentre as principais características do músculo esquelético adulto destaca-se a sua capacidade adaptativa, que é referente ao seu potencial de regeneração e alteração de massa em função de alterações na demanda

mecânica, podendo ocasionar atrofia ou hipertrofia do tecido (KUANG, GILLESPIE E RUDNICKI, 2008).

Dessa forma, para que ocorra o adequado remodelamento do tecido esquelético, são necessárias a destruição e a síntese das proteínas que compõe o tecido a ser regenerado (BELL, AL-KHALAF E MEGENEY, 2016).

Devido a isso, o músculo esquelético é reconhecido como uma estrutura geradora de força do corpo, sendo constantemente desafiada por diferentes tipos de estresse, como o calor, o estresse oxidativo e o estresse mecânico.

Dentre eles, o músculo gastrocnêmio é o mais superficial e é um dos maiores músculos localizados no compartimento posterior da perna, sendo originado em duas cabeças, uma lateral e a outra medial. A sua origem ocorre na superfície posterior distal do fêmur logo (cabeça medial) e na superfície pósterio-lateral superior do côndilo lateral do fêmur (cabeça lateral). A sua inserção ocorre via tendão do calcâneo para a tuberosidade do calcâneo. Sendo a sua principal função a flexão plantar do pé e flexão do joelho (PAULSEN E WASCHKE, 2012; DRAKE, VOGL E MITCHELL, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar o efeito da suplementação de diferentes doses de Whey Proteins durante 12 semanas na expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBx e na alteração do diâmetro celular do músculo gastrocnêmio.

3.2 ESPECÍFICOS

Quantificar e analisar a expressão gênica de MTOR em doses de 2, 4, 6g/kg/dia de Whey Proteins durante 12 semanas;

Quantificar e analisar expressão gênica de MURF-1 em doses de 2, 4, 6g/kg/dia de Whey Proteins durante 12 semanas;

Quantificar e analisar expressão gênica de MAFBx em doses de 2, 4, 6g/kg/dia de Whey Proteins durante 12 semanas;

Mensurar e analisar o consumo semanal de ração em doses de 2, 4, 6g/kg/dia de Whey Proteins durante 12 semanas;

Mensurar e analisar a alteração de peso semanal em doses de 2, 4, 6g/kg/dia de Whey Proteins durante 12 semanas;

Mensurar e analisar a massa e a área das células do músculo gastrocnêmio nas doses de 2, 4, 6g/kg/dia de Whey Proteins após 12 semanas.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

Os ensaios biológicos foram de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2012). O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, obtendo aprovação sob o número de registro: 23115.014424/2015-54 (ANEXO 1), estando assim de acordo com os padrões legais para uso de animais em procedimentos de ensino e/ou pesquisa, conforme Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

4.2 Tipo de Estudo

No presente estudo foi adotado delineamento de pesquisa experimental, em um ensaio pré-clínico com grupos controlados e randomizados, divididos de acordo com o recebimento de suplementação: (C) não suplementado (controle); (W2) suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; (W4) suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; e (W6) suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins.

4.3 Desenho Experimental



3 sessões de gavagem diárias com volume de 5ml contendo água ou solução de Whey Proteins corrigida para o peso do animal.

Concentração comum de 0,189g/ml do produto (H.I Whey: Essencial Nutrition®), que corresponde a 0,166g/ml de Whey Proteins.

Figura 7: Distribuição dos grupos experimentais e protocolo de suplementação



Figura 8: Organização temporal do protocolo experimental

4.4 Período e Local de Estudo

A presente pesquisa ocorreu durante 14 semanas, no interior do biotério setorial do prédio de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e da Saúde, localizado na Cidade Universitária Don Delgado, no Campus Bacanga, da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

4.5 Amostra/Amostragem

O presente estudo foi realizado com 38 *Rattus norvegicus* machos da linhagem Wistar com idade inicial de 60 dias e massa corporal entre 218 e 323 gramas, procedentes do Biotério da Universidade Federal do Maranhão - UFMA.

Os animais permaneceram sob condições higiênicas em gaiolas coletivas, mantidos em um laboratório climatizado com controle de temperatura entre 24°C a 28°C, e sob ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas. Foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (NuvilabCR-1®) e água *ad libitum*, o quadro 1 descreve a sua composição nutricional.

Quadro 1: Composição Nutricional da Ração para Animais de Laboratório Nuvilab CR-1.

Informação Nutricional	
Quantidade por porção (1 quilo)	
Nutriente	Referência/Kg
Umidade	120 gramas
Proteína Bruta	220 gramas
Extrato Etéreo	40 gramas
Material Mineral	90 gramas
Fibra Bruta	70 gramas
Cálcio	10 a 14 gramas
Fósforo	8 gramas

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos conforme descrição a seguir:

A - Grupo Controle (C): tratado com água pelo método gavagem, n=10;

B - Grupo suplementado (W2): suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem, n=11;

C - Grupo suplementado (W4): suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem, n=10;

D - Grupo suplementado (W6): suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem, n=7;

Os animais de cada grupo foram diferenciados através da marcação de traços na cauda com violeta genciana.

4.6 Instrumento de Coleta e Avaliação de Dados

4.6.1 Suplementação

A suplementação com Whey Proteins seguiu as dosagens 2, 4 e 6 g/kg/dia dissolvido em água, tendo concentração comum de 0,189g/mL do Suplemento (H.I Whey: Essencial Nutrition®), que corresponde a 0,166g/mL de proteínas do soro do leite. A suplementação foi realizada por meio de agulha de gavagem, durante 12 semanas, diariamente, três vezes ao dia, em doses de 5ml, com uma hora de intervalo entre cada gavagem. O grupo controle recebeu água filtrada na mesma frequência e volume dos grupos de intervenção. Os quadros 2 e 3 apresentam o conteúdo nutricional e o aminograma do presente suplemento e laudos sobre a qualidade do suplemento no anexo II.

Quadro 2: Composição Nutricional da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Protein.

Informação Nutricional		
Quantidade por porção (25 gramas)		
Nutriente	Gramatura	Valor diário (%)
Carboidratos	0 gramas	0%
Proteínas	22 gramas	29%
Gorduras totais	0 gramas	0%
Fibra alimentar	0 gramas	0%
Sódio	79 miligramas	3%
Cálcio	118 miligramas	12%
Fósforo	63 miligramas	9%
Magnésio	22 miligramas	8%

Quadro 3: Aminograma da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Protein.

Aminograma	
Quantidade por porção (25 gramas)	
Aminoácidos	Gramatura
Ácido aspártico	2,6 gramas
Ácido glutâmico	3,7 gramas
Alanina	1,2 gramas
Arginina	0,5 gramas
Cistina	0,6 gramas
Fenilalanina	0,7 gramas
Glicina	0,4 gramas
Histidina	0,3 gramas
Isoleucina	1,5 gramas
Leucina	2,3 gramas
Lisina	2,2 gramas
Metionina	0,5 gramas
Prolina	1,4 gramas
Serina	1,1 gramas
Tirosina	0,6 gramas
Treonina	1,7 gramas
Triptofano	0,3 gramas
Valina	1,3 gramas

A massa corporal dos animais foi avaliada semanalmente para readequação da dosagem do suplemento de Whey Proteins com auxílio da balança de precisão da marca Weblaborsp® 5,200 gramas, com precisão de 0,1 grama.

4.6.2 Obtenção de Material Biológico

Após 24 horas dos procedimentos experimentais finais e com 12 horas de privação de alimentos, os animais foram eutanasiados por sobrecarga de cetamina/xilazina (75:10 mg/kg) (LEARY E COLABORADORES, 2013; NEVES E COLABORADORES, 2013).

A partir desse momento, a obtenção do tecido muscular seguiu a recomendação de Xia e colaboradores (2016). A porção superficial (branca) do músculo gastrocnêmico da perna direita foi separada, pesada em balança digital modelo AD-200 da marca Marte, com precisão de 0,001 grama e imediatamente conservada na solução RNA Lateral, em seguida a amostra do músculo foi armazenada a -80°C para posterior análise de reação de cadeia de polimerase em tempo real. O músculo gastrocnêmio da perna esquerda foi destinado para as análises histológicas.

4.6.3 Avaliação da Expressão Gênica

Para o isolamento da molécula do Ácido Ribonucleico total, utilizou-se o Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System da Promega®, seguindo o seguinte protocolo:

- 1) Após a retirada do tecido da refrigeração a -80°C, as amostras de trabalho foram cortadas e pesadas (20 mg) e armazenadas em um tubo estéril;
- 2) Para cada amostra foram adicionados 500 µl da solução de tampão LBA e TG Buffer, acrescidos de 500 µl do tampão de extração de RNA (RDB), em seguida, incubou-se por um 1 minuto a temperatura ambiente;
- 3) Após a incubação, utilizou-se um homogeneizador de tecidos para facilitar a reação, em seguida, o material foi centrifugado por 3 minutos a 10.000 rpm para a retirada dos debris insolúveis;

- 4) Após esse processo, o lisado foi transferido para um novo tubo estéril, tomando cuidado para que não fosse transferido nenhum debris. Em seguida, foram adicionados 340 µl de isopropanol;
- 5) Em seguida, preparou-se o conjunto de 1 coluna (ReliaPrep™ Minicolumn), 2 tubos coletores e 1 tubo de eluição para cada amostra. Em sequência, foram adicionados até 700 µl do lisado para a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugou-se por 1 minuto a 12.000 rpm. Repetiu-se essa etapa em função do volume do lisado, descartando-se o volume residual entre cada etapa;
- 6) Após esse processo, foram adicionados 500 µl de RNA Wash Solution a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugou-se por 30 segundos a 12.000 rpm, em seguida descartou-se o volume residual e armazenou-se a ReliaPrep™ Minicolumn em um rack refrigerado;
- 7) Em sequência, preparou-se o mix de incubação de DNase I, ao combinar-se, nessa ordem, 24 µl do Buffer de núcleo amarelo, 3 µl de Cloreto de Manganês (MnCl₂) a 0,09 Molar e 3 µl enzima DNase I para cada reação. Em seguida, foram aplicados 30 µl do mix diretamente a membrana da ReliaPrep™ Minicolumn e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente;
- 8) Após a incubação, foram adicionados 200 µl da Column Wash Solution a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugou-se por 15 segundos a 12.000 rpm. Em seguida, foram adicionados 500 µl de RNA Wash Solution a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugou-se por 30 segundos a 12.000 rpm. Ao final desse processo, descartou-se o tubo coletor e colocou-se a ReliaPrep™ Minicolumn em um novo tubo coletor;
- 9) Em sequência, adicionou-se 300 µl de RNA Wash Solution a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugou-se por 2 minutos a 12.000 rpm;
- 10) Após essa etapa, descartou-se o tubo coletor e encaixou-se a ReliaPrep™ Minicolumn em um tubo de eluição. Em seguida, adicionou-se 30 µl de Nuclease Free Water a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugou-se por 1 minutos 12.000 rpm;
- 11) Por fim, descartou-se a ReliaPrep™ Minicolumn, tampou-se o tubo de eluição contendo o RNA purificado e armazenou-se em refrigeração a -

80°C para posterior conversão em Ácido Desoxirribonucleico Complementar.

Para a reação de transcriptase reversa utilizou-se o Kit SuperScript® IV First-Strand Synthesis System da Thermo Fisher Scientific®, seguindo o seguinte protocolo:

- 1) Inicialmente, o tampão 5x SSIV Buffer foi pré-aquecido a temperatura ambiente e reservado para utilização posterior;
- 2) Em seguida, preparou-se o mix de anelamento, ao combinar-se, nessa ordem, 1 µl de Random hexamers, 1 µl de dNTP mix a 10 mM, 13 µl de DEPC – água tratada e 11 µl de RNA purificado para cada amostra;
- 3) Após essa etapa, aqueceu-se o mix por 5 minutos a 65°C e, em seguida, incubou-se no gelo por pelo menos 1 minuto;
- 4) Em seguida, preparou-se o mix de transcrição reversa, ao combinar-se, nessa ordem, 4 µl do tampão 5x SSIV Buffer, 1 µl de DTT a 100 mM, 1 µl de inibidor de ribonuclease e 1 µl da SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (200 U/µl) para cada amostra;
- 5) Após essa etapa, adicionou-se 7 µl do mix de transcrição reversa para cada amostra ao mix de anelamento, em incubou-se a reação por 10 minutos a 23°C, por 10 minutos a 55°C e por 10 minutos a 80°C. Em seguida armazenou-se o Ácido Desoxirribonucleico Complementar em refrigeração a - 20°C.

Para a Reação de Cadeia de Polimerase em tempo real utilizou-se o Kit Power SYBR Green Master Mix da Thermo Fisher Scientific®, seguindo o seguinte protocolo:

- 1) Inicialmente, para a reação de cadeia de polimerase, preparou-se o mix Power Syber Green, ao combinar-se, nessa ordem, 6 µl de Power Syber Green, 0,4 µl do primer F, 0,4 µl do primer R e 4,5 µl de água ultrapura para cada gene alvo;
- 2) Após essa etapa, homogeneizou-se e distribuiu-se 11 µl do mix em cada poço da placa, de acordo com o número de reações;
- 3) Em seguida, acrescentou-se 1 µl de Ácido Desoxirribonucleico Complementar das amostras em cada poço da placa, após esse

processo, vedou-se a placa. Em ocasiões onde houve formação de bolhas na placa, utilizou-se o spin. Após preparação prévia, colocou-se a placa no aparelho StepOne e iniciou-se a reação;

- 4) Utilizou-se a seguinte ciclagem: 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C a 15 segundos, 55°C a 30 segundos e 72°C a 30 segundos.

A Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real foi realizada no Sistema de Detecção de Sequência StepOne para os seguintes *primers*:

- MTOR rato *forward*, 5'- CAGGACGAGCGAGTGAT -3', e *reverse*, 5'- CGAGTTGGTGGACAGAGG -3';
- MURF-1 rato *forward*, 5'- AGTCGCAGTTTCGAAGCAAT -3', e *reverse*, 5'- AACGACCTCCAGACATGGAC -3';
- MAFBx rato *forward*, 5'- CTACGATGTTGCAGCCAAGA -3', e *reverse*, 5'- GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC -3';
- GAPDH rato *forward*, 5'- ACGGCAAGTTCAACGGCACAGTCAA -3', e *reverse*, 5'- GCTTTCCAGAGGGGCCATCCACA -3'.

Os *primers* foram obtidos a partir de sequencias gênicas de *Rattus Novergicus* depositadas no GenBank, a similaridade foi calculada usando o programa BLAST Prime - <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> - e todas as amostras foram realizadas em duplicata. O GAPDH foi utilizado como controle endógeno.

4.6.4 Análises Histológicas

Os procedimentos histológicos foram realizados conforme preconiza Caputo, Gitirana e Manso (2010) e descritos a seguir.

Para a fixação, o músculo gastrocnêmio foi embebido em formaldeído a 10% por 24 horas e posteriormente em álcool etílico por 7 dias.

Em seguida, o músculo foi seco com papel filtro e, com auxílio de um paquímetro científico da marca Messen®, com graduação de 0,01 mm, com

amplitude entre 0 a 150 mm, realizou-se a mensuração de uma extremidade a outra e realizou-se uma secção transversal no ponto médio, em seguida realizaram-se duas secções transversais de 2-3mm, um a esquerda e outro a direita.

Após realizados os procedimentos de corte e mensuração do músculo gastrocnêmio, as amostras foram armazenadas em cassetes histológicos e identificadas. Seu processamento foi realizado no processador automático de tecidos para histologia da marca Luptec, iniciando com a desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes, variando de álcool 70% a absoluto, seguido de clarificação com xilol e posterior impregnação em parafina.

Em seguida foram realizados cortes de 4 μm de espessura em microtomo rotativo de parafina da marca YIDI. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e montados para posterior análise histológica e descrição e avaliação da dimensão das fibras musculares.

A mensuração das células musculares foi realizada conforme o preconizado por Bodine e colabores (2012) e ilustrada na figura 9, onde foram analisadas e mensuradas 150 células para cada amostra, com o auxílio de microscópio óptico biológico trinocular da marca ANATOMIC, no aumento de 40 vezes, obtendo-se a área celular em micrômetros quadrados (μm^2). As imagens foram analisadas usando o programa AxioVision, versão 4.9.1.

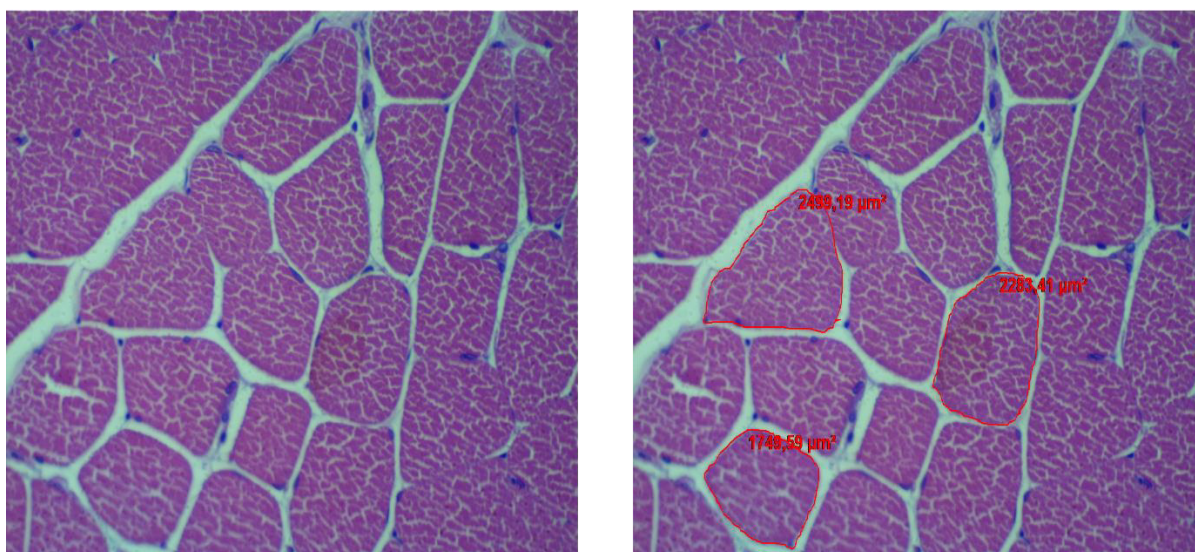


Figura 9: Mensuração de área celular do músculo gastrocnêmio

4.6.5 Processamento e Tratamento Estatístico

As variáveis descritas nos objetivos específicos na página 64 foram testadas quanto à distribuição normal utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Os dados quantitativos da expressão gênica, do consumo de ração, da massa corporal do músculo gastrocnêmio e da área celular do músculo gastrocnêmio foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas; a variável de classificação foi a interação entre a dieta e suplementação (C, W2, W4, W6). O pós-teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos (C, W2, W4, W6). O software utilizado para as análises foi o GraphPad Prism 7.

5 RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados para as variáveis de consumo de ração, consumo de Whey Proteins, alteração da massa corporal total e relativa, alteração da massa muscular total e relativa do músculo gastrocnêmio, expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBx e dados referentes a histologia celular do músculo gastrocnêmio.

Quadro 4: Média de consumo em gramas de ração por semana dos grupos.

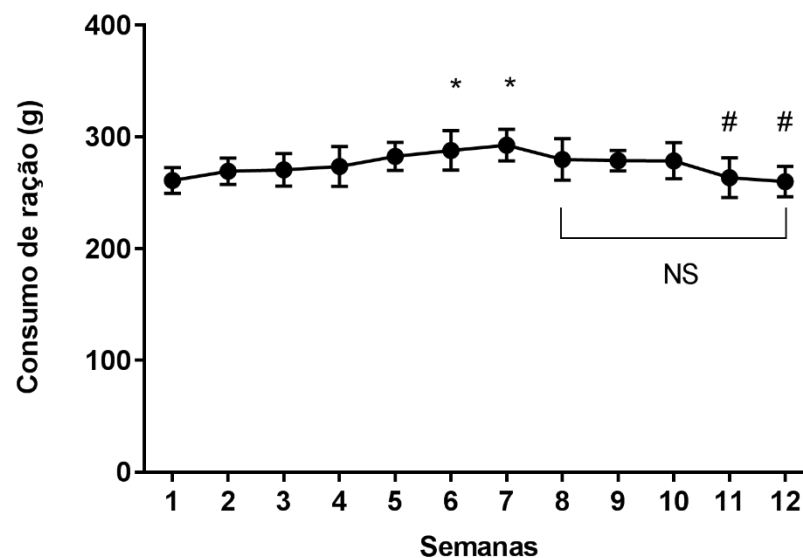
Semanas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C(n=10)	261,0 ±11,55	269,2 ±11,77	270,6 ±14,46	273,6 ±17,79	282,5 ±12,54	288 ±17,68 (1*)	292,7 ±14,21 (1*)	279,9 ±14,21	278,7 ±9,18	278,7 ±16,2	263,6 ±17,76 (7*)	260,1 ±13,58 (6,7*)
W2(n=11)	296,2 ±22,84	310,4 ±14,4	307,1 ±22,45	311,9 ±22,74	321,8 ±10,29	319,2 ±15,18	326,8 ±14,36	321,6 ±22,39	321,3 ±34,87	318,2 ±12,79	304,1 ±20,89	291,1 ±12,15
W4(n=10)	247,6 ±13,43	250,8 ±13,9	253,8 ±18,51	263,1 ±10,45	267,7 ±14,86	259,2 ±9,26	242,8 ±15,18 (5*)	237,9 ±12,27 (4,5*)	239,7 ±7,07 (5*)	223,6 ±16,91 (2,3,4,5,6*)	218,1 ±12,69 (1,2,3,4,5,6,7*)	203,2 ±13,88 (1,2,3,4,5,6,7,8,9*)
W6(n=7)	166,4 ±8,70	173,4 ±16,21	178,9 ±7,60	174,7 ±6,32	169,9 ±6,86	163,6 ±9,58	161,9 ±8,46	159,9 ±6,45 (3*)	152,2 ±9,84 (2,3,4*)	144,9 ±8,46 (1,2,3,4,5,6*)	140,0 ±10,65 (1,2,3,4,5,6,7,8*)	118,7 ±16,95 (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11*)

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins. Dados apresentados em *média±desvio padrão*. * $p<0,05$ comparado com a semana entre parênteses.

Quadro 5: Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo controle (n=10).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,9962	0,9863	0,9042	0,2396	0,0476	0,0081	0,4245	0,5300	0,5312	>0,9999	>0,9999
S2	-	-	>0,9999	>0,9999	0,8693	0,4410	0,1414	0,9676	0,9872	0,9874	0,9999	0,9909
S3	-	-	-	>0,9999	0,9325	0,5586	0,2057	0,9885	0,9965	0,9965	0,9991	0,9731
S4	-	-	-	-	0,9924	0,8069	0,4140	0,9996	>0,9999	>0,9999	0,9803	0,8579
S5	-	-	-	-	-	>0,9999	0,9781	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4257	0,1908
S6	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,9969	0,9896	0,9895	0,1099	0,0350
S7	-	-	-	-	-	-	-	0,8981	0,8279	0,8270	0,0221	0,0057
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,6479	0,3547
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,7496	0,4541
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7507	0,4553
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p=0,0008); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. # $p < 0,05$ comparado com a semana 7. NS $p > 0,05$.

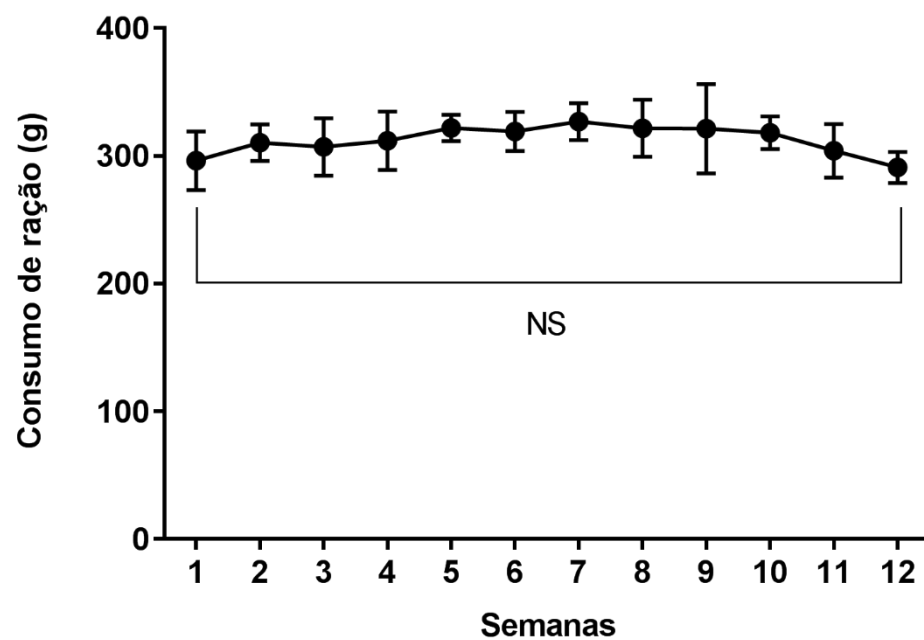
Figura 10: Alteração de consumo de ração do grupo controle em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 4 e 5 e ilustrado na figura 10, a média de consumo de ração, no grupo controle, na semana 1, foi estatisticamente inferior quando comparada à média de consumo na semana 6 ($p=0,0476$) e na semana 7 ($p=0,0081$). O ponto máximo de consumo ocorreu na semana 7, que teve média de consumo estatisticamente superior quando comparada às semanas 11 ($p=0,0221$) e 12 ($p=0,0057$). Em adição, à partir da semana 8 não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no consumo de ração.

Quadro 6: Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo Whey 2 (Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins) (n=11).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,9770	0,9974	0,9526	0,4591	0,6256	0,2052	0,4713	0,4916	0,6871	0,9999	>0,9999
S2	-	-	>0,9999	>0,9999	0,9959	0,9996	0,9346	0,9964	0,9972	0,9999	>0,9999	0,8296
S3	-	-	-	>0,9999	0,9690	0,9934	0,8097	0,9719	0,9763	0,9968	>0,9999	0,9448
S4	-	-	-	-	0,9988	>0,9999	0,9661	0,9990	0,9993	>0,9999	0,9999	0,7526
S5	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,8938	0,1986
S6	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9632	0,3175
S7	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,9997	0,6381	0,0684
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,9008	0,2063
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,9116	0,2194
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9777	0,3712
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9881
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p=0,0354): Post-hoc de Tukey.



Legenda: NS $p > 0,05$.

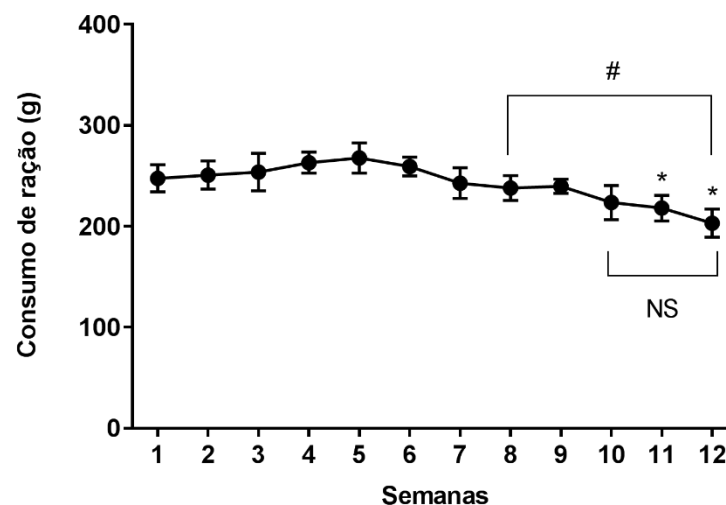
Figura 11: Alteração de consumo de ração do grupo Whey 2 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 4 e 6 e ilustrado na figura 11, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no consumo de ração durante as semanas.

Quadro 7: Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo Whey 4 (Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins) (n=10).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	>0,9999	0,9993	0,5911	0,2106	0,8972	>0,9999	0,9698	0,9941	0,0578	0,0062	<0,0001
S2	-	-	>0,9999	0,8579	0,4569	0,9891	0,9935	0,8207	0,9259	0,0166	0,0014	<0,0001
S3	-	-	-	0,9773	0,7374	0,9998	0,9295	0,5556	0,7250	0,0045	0,0003	<0,0001
S4	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,1989	0,0376	0,0736	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,9896	0,0424	0,0055	0,0122	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	0,5010	0,1448	0,2459	0,0003	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,2644	0,0450	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,6983	0,2274	0,0005
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5268	0,1323	0,0002
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9998	0,1957
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6495
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. # $p < 0,05$ comparado com a semana 5. NS $p > 0,05$.

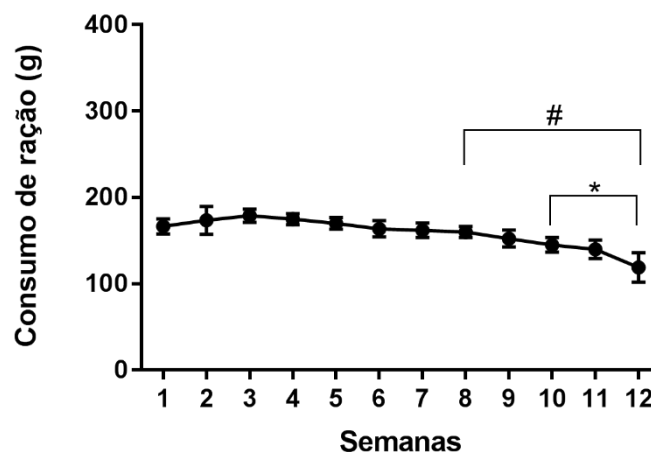
Figura 12: Alteração de consumo de ração do grupo Whey 4 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 4 e 7 e ilustrado na figura 12, a média de consumo de ração, no grupo Whey 4, na semana 1, foi estatisticamente superior quando comparada à média de consumo na semana 11 ($p = 0,0062$) e na semana 12 ($p < 0,0001$). O ponto máximo de consumo ocorreu na semana 5, que teve média de consumo estatisticamente superior quando comparada às semanas 8 ($p = 0,0055$), 9 ($p = 0,0122$), 10 ($p < 0,0001$), 11 ($p < 0,0001$) e 12 ($p < 0,0001$). Em adição, a partir da semana 10 não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no consumo de ração.

Quadro 8: Comparação da média de consumo semanal de ração em 12 semanas no grupo Whey 6 (Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins) (n=7).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,9773	0,4745	0,9225	>0,9999	>0,9999	0,9995	0,9876	0,2948	0,0092	0,0004	<0,0001
S2	-	-	0,9965	>0,9999	>0,9999	0,8113	0,6158	0,3659	0,0112	0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	0,9997	0,8786	0,1928	0,0949	0,0354	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	0,9991	0,6571	0,4446	0,2316	0,0050	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,9898	0,9416	0,7834	0,0686	0,0010	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,6230	0,0413	0,0025	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,8169	0,0931	0,0070	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9561	0,2161	0,0220	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9678	0,5121	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9988	0,0005
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0106
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

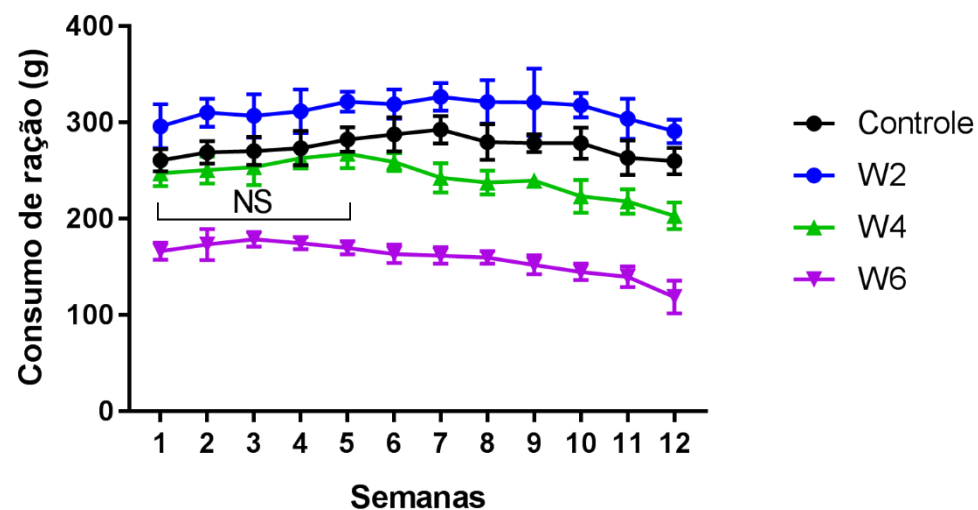
Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. # $p < 0,05$ comparado com a semana 3.

Figura 13: Alteração de consumo de ração do grupo Whey 6 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 4 e 8 e ilustrado na figura 13, a média de consumo de ração, no grupo Whey 6, na semana 1, foi estatisticamente superior quando comparada à média de consumo na semana 10 ($p=0,0092$), na semana 11 ($p=0,0004$) e na semana 12 ($p<0,0001$). O ponto máximo de consumo ocorreu na semana 3, que teve média de consumo estatisticamente superior quando comparada às semanas 8 ($p=0,0354$), 9 ($p=0,0003$), 10 ($p<0,0001$), 11 ($p<0,0001$) e 12 ($p<0,0001$). Em adição, não houve estabilização no consumo de ração.



Legenda: NS $p > 0,05$.

Figura 14: Comparação da alteração do consumo de ração entre os grupos em 12 semanas.

Conforme observado no quadro 4 e ilustrado na figura 14, a média de consumo de ração no grupo controle não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo Whey 4 nas semanas 1 ($p=0,3450$), 2 ($p=0,1027$), 3 ($p=0,1595$), 4 ($p=0,5572$) e 5 ($p=0,2539$). Nas demais semanas, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no consumo de ração entre os grupos controle, Whey 2, Whey 4 e Whey 6.

Quadro 9: Média do consumo em gramas de proteína dos grupos.

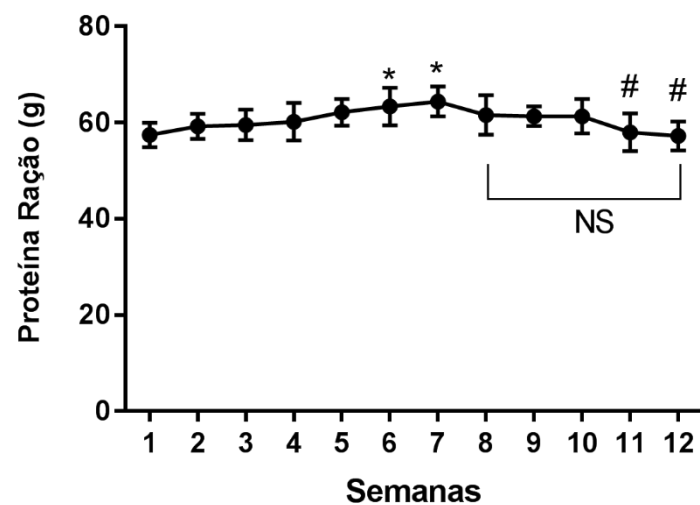
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C (n=10)	PR	57,4 ± 2,54	59,2 ± 2,84	59,5 ± 3,18	60,2 ± 3,91	62,1 ± 2,76	63,3 ± 3,89	64,4 ± 3,13	61,5 ± 4,08	61,3 ± 2,02	61,3 ± 3,56	57,9 ± 3,91	57,2 ± 2,99
	PW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	PT	19,8 ± 1,12	19,3 ± 1,39	18,3 ± 1,22	17,5 ± 1,25	17,1 ± 1,13	16,7 ± 1,12	16,2 ± 1,10	14,9 ± 1,03	14,4 ± 1,03	14,1 ± 1,01	13,1 ± 0,96	12,6 ± 1,03
W2 (n=11)	PR	65,1 ± 5,03	68,2 ± 3,47	67,5 ± 4,94	68,6 ± 5,00	70,8 ± 2,26	70,2 ± 3,34	71,9 ± 3,16	70,7 ± 4,93	70,6 ± 7,67	70,0 ± 2,81	66,9 ± 4,60	64,0 ± 2,67
	PW	46,1	48,0	51,2	53,7	56,2	58,3	60,7	62,8	64,3	65,9	68,0	69,5
	PT	33,8 ± 1,50	34,0 ± 1,85	32,5 ± 1,68	31,9 ± 1,63	31,7 ± 1,61	30,9 ± 1,54	30,6 ± 1,47	29,8 ± 1,39	29,4 ± 1,24	28,9 ± 1,18	28,0 ± 1,22	26,9 ± 0,95
W4 (n=10)	PR	54,4 ± 3,23	55,1 ± 3,06	55,8 ± 4,07	57,8 ± 2,30	58,8 ± 3,27	57,0 ± 2,04	53,4 ± 3,34	52,3 ± 2,70	52,7 ± 1,56	49,1 ± 3,72	47,9 ± 2,79	44,7 ± 3,05
	PW	74,9	80,4	85,6	91,6	95,8	99,8	104,0	106,3	109,2	111,8	114,6	116,4
	PT	45,5 ± 1,79	47,3 ± 2,02	46,5 ± 1,98	45,8 ± 1,96	45,3 ± 1,74	44,1 ± 1,62	42,5 ± 1,48	41,9 ± 1,40	41,6 ± 1,45	40,4 ± 1,28	39,8 ± 1,24	38,8 ± 1,08
W6 (n=7)	PR	36,5 ± 1,91	38,1 ± 3,56	39,3 ± 1,68	38,4 ± 1,39	37,3 ± 1,51	35,9 ± 2,11	35,6 ± 1,86	35,1 ± 1,42	33,4 ± 2,17	31,8 ± 1,86	30,7 ± 2,34	26,1 ± 3,73
	PW	74,9	79,7	87,9	94,3	100,4	104,3	106,8	110,8	114,2	117,0	119,9	121,9
	PT	62,6 ± 1,71	62,1 ± 1,80	60,9 ± 1,69	59,2 ± 1,65	57,7 ± 1,44	56,6 ± 1,36	55,8 ± 1,28	55,4 ± 1,25	54,4 ± 1,20	56,0 ± 1,37	52,8 ± 1,06	51,0 ± 0,99

Legenda: C= Grupo controle; W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; PR= Proteína da ração em gramas/quilo/semana; PW= Soma do Consumo de Whey Protein em gramas/quilo/semana; PT= Proteína total em gramas/quilo/semana.

Quadro 10: Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo controle (n=10).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,9962	0,9863	0,9042	0,2396	0,0476	0,0081	0,4245	0,5300	0,5312	>0,9999	>0,9999
S2	-	-	>0,9999	>0,9999	0,8693	0,441	0,1414	0,9676	0,9872	0,9874	0,9999	0,9909
S3	-	-	-	>0,9999	0,9325	0,5586	0,2057	0,9885	0,9965	0,9965	0,9991	0,9731
S4	-	-	-	-	0,9924	0,8069	0,414	0,9996	>0,9999	>0,9999	0,9803	0,8579
S5	-	-	-	-	-	>0,9999	0,9781	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4257	0,1908
S6	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,9969	0,9896	0,9895	0,1099	0,0350
S7	-	-	-	-	-	-	-	0,8981	0,8279	0,8270	0,0221	0,0057
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,6479	0,3547
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,7496	0,4541
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7507	0,4553
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p=0,0008): Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. # $p < 0,05$ comparado com a semana 7. NS $p > 0,05$.

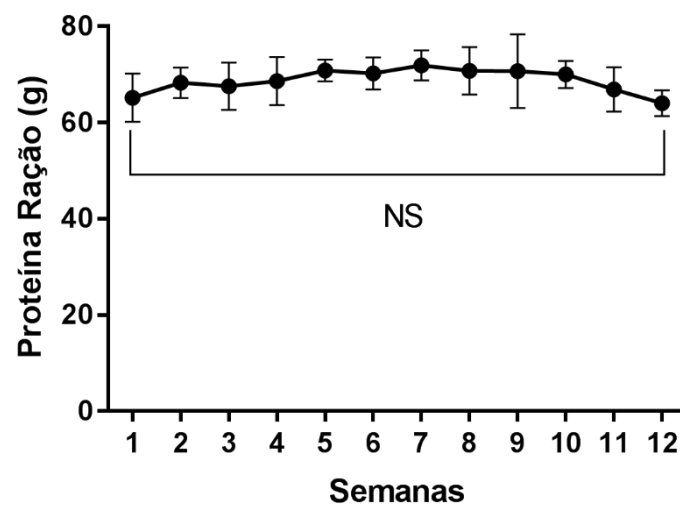
Figura 15: Alteração de consumo de proteína na ração do grupo controle em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 9 e 10 e ilustrado na figura 15, a média de consumo de proteína da ração, no grupo controle, na semana 1, foi estatisticamente inferior quando comparada a média de consumo nas semanas 6 ($p=0,0476$) e 7 ($p=0,0081$). O ponto máximo de consumo ocorreu na semana 7, que teve média de consumo estatisticamente superior quando comparada as semanas 11 ($p=0,0221$) e 12 ($p=0,0057$). Em adição, a partir da semana 8 não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no consumo de proteína da ração.

Quadro 11: Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo Whey 2 (Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins) (n=11).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,9770	0,9974	0,9526	0,4591	0,6256	0,2052	0,4713	0,4916	0,6871	0,9999	>0,9999
S2	-	-	>0,9999	>0,9999	0,9959	0,9996	0,9346	0,9964	0,9972	0,9999	>0,9999	0,8296
S3	-	-	-	>0,9999	0,9690	0,9934	0,8097	0,9719	0,9763	0,9968	>0,9999	0,9448
S4	-	-	-	-	0,9988	>0,9999	0,9661	0,9990	0,9993	>0,9999	0,9999	0,7526
S5	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,8938	0,1986
S6	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9632	0,3175
S7	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,9997	0,6381	0,0684
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,9008	0,2063
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,9116	0,2194
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9777	0,3712
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9881
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p=0,0354): Post-hoc de Tukey.



Legenda: NS $p > 0,05$.

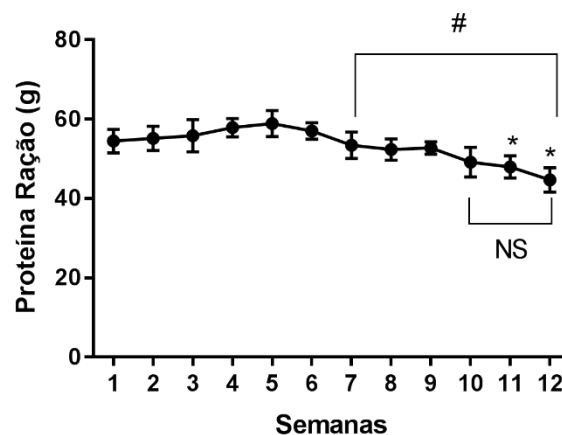
Figura 16: Alteração de consumo de proteína na ração do grupo Whey 2 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 9 e 11 e ilustrado na figura 16, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no consumo de proteína da ração durante as semanas.

Quadro 12: Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo Whey 4 (Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins) (n=10).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	>0,9999	0,9993	0,5906	0,2103	0,8969	>0,9999	0,9699	0,9941	0,0578	0,0062	<0,0001
S2	-	-	>0,9999	0,8573	0,4561	0,9890	0,9935	0,8212	0,9263	0,0167	0,0014	<0,0001
S3	-	-	-	0,9773	0,7373	0,9998	0,9295	0,5555	0,7249	0,0045	0,0003	<0,0001
S4	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,1989	0,0376	0,0735	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,9896	0,0424	0,0055	0,0121	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	0,5009	0,1447	0,2458	0,0003	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,2643	0,0450	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,6982	0,2273	0,0005
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5267	0,1322	0,0002
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9998	0,1956
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6494
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001): Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. # $p < 0,05$ comparado com a semana 5. NS $p > 0,05$.

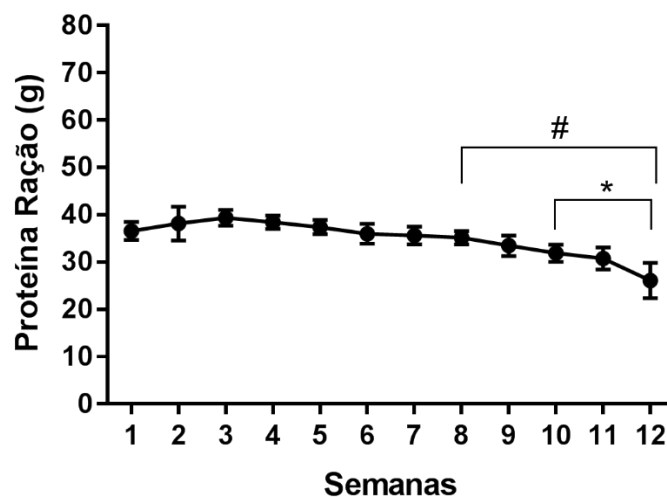
Figura 17: Alteração de consumo de proteína na ração do grupo Whey 4 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 9 e 12 e ilustrado na figura 17, a média de consumo de proteína da ração, no grupo Whey 4, na semana 1, foi estatisticamente superior quando comparada a média de consumo nas semanas 11 ($p=0,0062$) e 12 ($p<0,0001$). O ponto máximo de consumo ocorreu na semana 5, que teve média de consumo estatisticamente superior quando comparada às semanas 7 ($p=0,0424$), 8 ($p=0,0055$), 9 ($p=0,0121$), 10 ($p<0,0001$), 11 ($p<0,0001$) e 12 ($p<0,0001$). Em adição, a partir da semana 10 não houve diferença estatística ($p>0,05$) no consumo de proteína da ração.

Quadro 13: Comparação da média do consumo de proteína na ração por semana em 12 semanas no grupo Whey 6 (Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins) (n=7).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,9769	0,4725	0,9214	>0,9999	>0,9999	0,9995	0,9877	0,2964	0,0092	0,0004	<0,0001
S2	-	-	0,9965	>0,9999	>0,9999	0,8107	0,6134	0,3641	0,0112	0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	0,9997	0,8788	0,1925	0,0942	0,0352	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	0,9991	0,6563	0,4423	0,2302	0,0050	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,9898	0,9407	0,7817	0,0685	0,0010	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	>0,9999	>0,9999	0,6234	0,0413	0,0025	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,8184	0,0936	0,0070	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9566	0,2169	0,0221	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9677	0,5116	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9988	0,0005
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0106
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

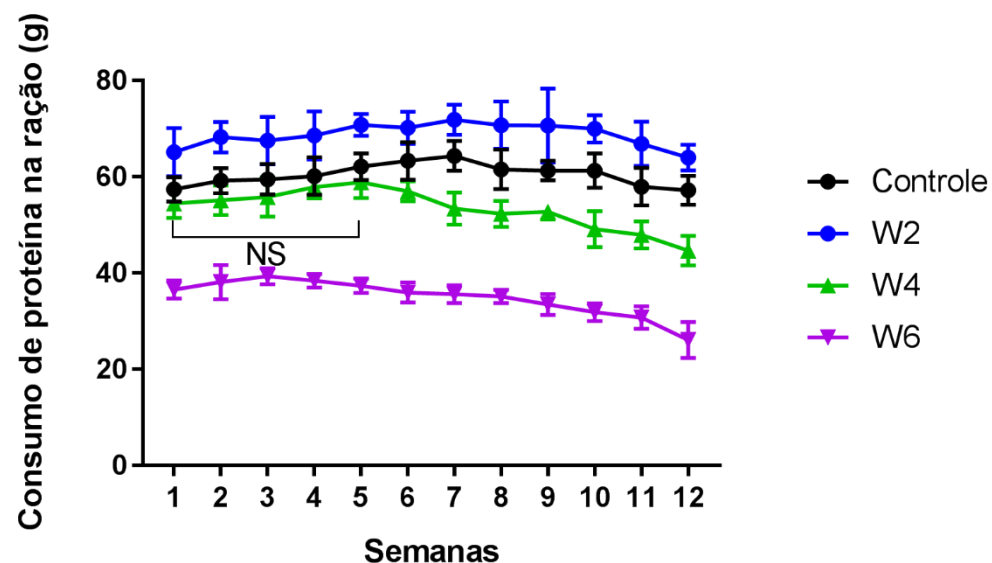
Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001): Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. # $p < 0,05$ comparado com a semana 3.

Figura 18: Alteração de consumo de proteína na ração do grupo Whey 6 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 9 e 13 e ilustrado na figura 18, a média de consumo de proteína da ração, no grupo Whey 6, na semana 1, foi estatisticamente superior quando comparada a média de consumo nas semanas 10 ($p=0,0092$), 11 ($p=0,0004$) e 12 ($p<0,0001$). O ponto máximo de consumo ocorreu na semana 3, que teve média de consumo estatisticamente superior quando comparada às semanas 8 ($p=0,0352$), 9 ($p=0,0003$), 10 ($p<0,0001$), 11 ($p<0,0001$) e 12 ($p<0,0001$). Em adição, não houve estabilização no consumo de proteína da ração da ração.



Legenda: NS $p > 0,05$.

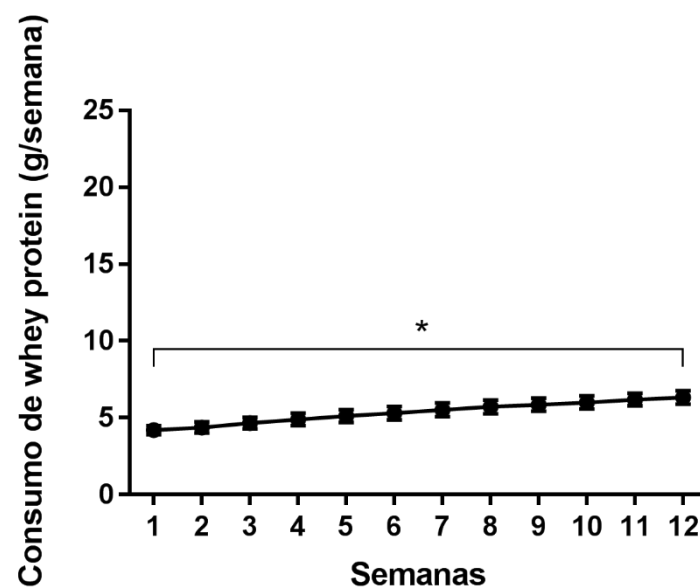
Figura 19: Comparação da alteração de consumo de proteína da ração entre os grupos em 12 semanas.

Conforme observado no quadro 9 e ilustrado na figura 19, a média de consumo de proteína da ração no grupo controle não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo Whey 4 nas semanas 1 ($p=0,3447$), 2 ($p=0,1024$), 3 ($p=0,1595$), 4 ($p=0,5572$) e 5 ($p=0,2539$). Nas demais semanas, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no consumo de proteína da ração entre os grupos controle, Whey 2, Whey 4 e Whey 6.

Quadro 14: Comparação da média do consumo de Whey Proteins por semana em 12 semanas no grupo Whey 2 (Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins) (n=11).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,0007	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0192	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0108	<0,0001	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0003	<0,0001
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0153
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001): Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1.

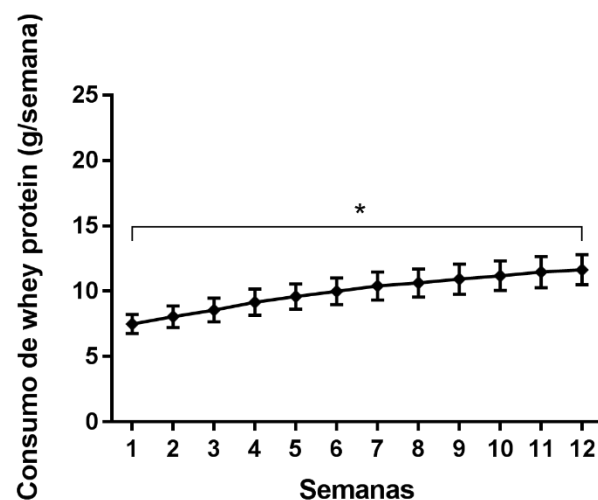
Figura 20: Alteração de consumo de Whey Proteins do grupo Whey 2 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 9 e 14 e ilustrado na figura 20, o consumo de Whey Proteins, na semana 1, no grupo Whey 2, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparado as demais semanas. Em adição, o consumo de Whey Proteins manteve-se em aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) ao longo das 12 semanas.

Quadro 15: Comparação da média do consumo de Whey Proteins por semana em 12 semanas no grupo Whey 4 (Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins) (n=10).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2	-	-	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	0,0085	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,0212	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	0,0122	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	0,6062	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2601	0,0001	<0,0001	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4384	0,0002	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3072	0,0033
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8994
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001): Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1.

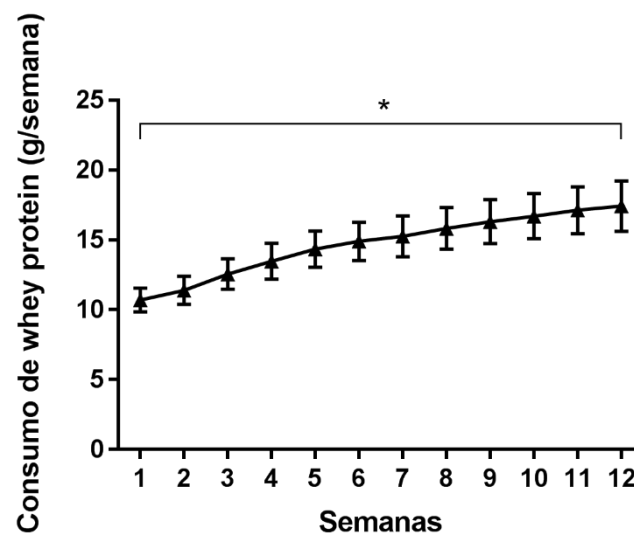
Figura 21: Alteração de consumo de Whey Proteins do grupo Whey 4 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 9 e 15 e ilustrado na figura 21, o consumo de Whey Proteins, na semana 1, no grupo Whey 4, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparado as demais semanas. Não houve diferença estatística no consumo de Whey Proteins na semana 7 quando comparada a semana 8 ($p = 0,6062$), na semana 8 quando comparada a semana 9 ($p = 0,2601$), na semana 9 quando comparada a semana 10 ($p = 0,4384$), na semana 10 quando comparada a semana 11 ($p = 0,3072$) e na semana 11 quando comparada a semana 12 ($p = 0,8994$). Em adição, o consumo de Whey Proteins manteve-se em aumento numérico ao longo das 12 semanas.

Quadro 16: Comparação da média do consumo de Whey Proteins por semana em 12 semanas no grupo Whey 6 (Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins) (n=7).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	-	0,0229	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	0,0010	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,1526	0,0005	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	0,7653	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	0,1173	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3220	0,0008	<0,0001	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6029	0,0025	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5324	0,0166
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9231
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001): Post-hoc de Tukey.

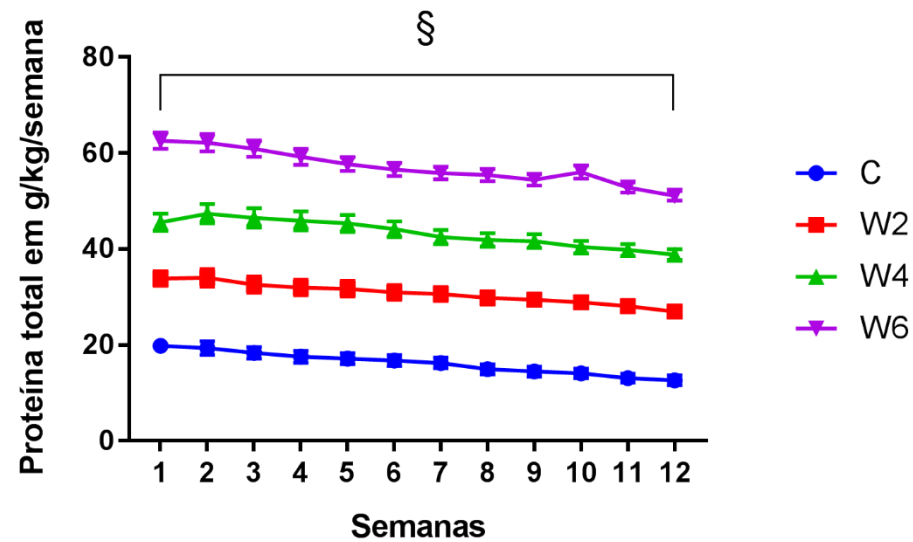


Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1.

Figura 22: Alteração de consumo de Whey Proteins do grupo Whey 6 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 9 e 16 e ilustrado na figura 22, o consumo de Whey Proteins, na semana 1, no grupo Whey 6, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparado as demais semanas. Não houve diferença estatística no consumo de Whey Proteins na semana 5 quando comparada a semana 6 ($p = 0,1526$), na semana 6 quando comparada a semana 7 ($p = 0,7653$), na semana 7 quando comparada a semana 8 ($p = 0,1173$), na semana 8 quando comparada a semana 9 ($p = 0,3220$), na semana 9 quando comparada a semana 10 ($p = 0,6029$), na semana 10 quando comparada a semana 11 ($p = 0,5324$) e na semana

11 quando comparada a semana 12 ($p=0,9231$). Em adição, o consumo de Whey Proteins manteve-se em aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) ao longo de 11 semanas.



Legenda: *§ $p<0,05$ comparado em todas as semanas entre os grupos.

Figura 23: Comparação do consumo total de proteína entre os grupos em 12 semanas.

Conforme observado no quadro 9 e ilustrado na figura 23, houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) no consumo de proteína total entre os grupos controle, Whey 2, Whey 4 e Whey 6 em todas as semanas.

Quadro 17: Massa corporal total por semana em gramas do grupo controle (n=10).

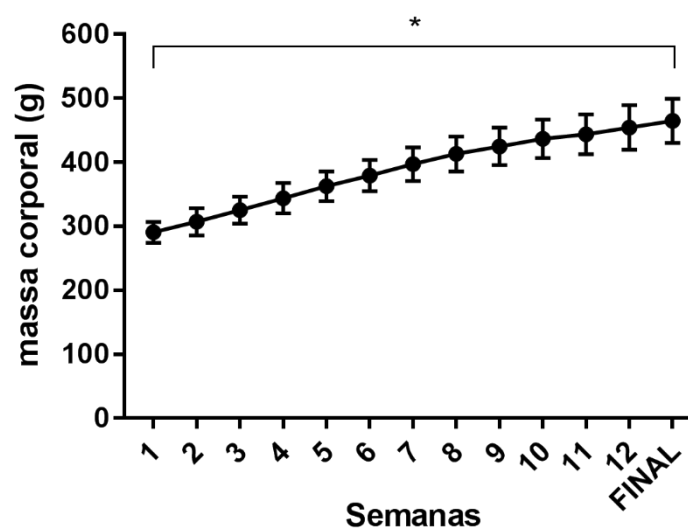
Variáveis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Final
C11	264,7	269,9	288,8	303,8	322,3	337,0	353,0	362,2	373,1	382,0	385,9	386,0	399,7
C12	280,2	298,1	309,8	327,4	349,3	362,9	379,0	396,7	405,9	418,2	425,3	429,9	440,3
C13	281,0	291,6	308,4	322,0	336,5	350,7	369,0	385,0	393,5	406,5	410,2	418,8	429,5
C14	273,3	280,9	302,4	321,0	344,2	359,0	375,0	394,1	402,5	413,4	424,2	438,2	447,0
C15	295,9	316,5	334,7	345,5	370,5	389,5	409,0	424,2	435,4	452,8	455,6	471,2	481,3
C21	286,0	314,7	339,1	362,5	373,9	394,3	412,0	424,9	438,0	447,5	457,7	471,5	475,7
C22	309,0	326,4	336,8	356,7	373,7	392,8	409,0	433,0	446,7	457,8	466,7	487,5	498,8
C23	295,8	315,5	338,3	358,0	376,9	394,2	410,0	425,6	438,3	446,3	457,1	464,8	474,5
C24	316,7	335,9	352,0	374,8	394,3	410,5	434,0	449,1	459,2	473,4	482,0	493,3	508,0
C25	302,9	322,5	341,2	367,4	385,4	399,8	412,0	437,0	457,3	469,3	474,7	483,6	493,3
Média	290,6	307,2	325,2	343,9	362,7	379,1	397,1	413,2	425,0	436,7	443,9	454,5	464,8
DP	16,4	21,2	20,9	23,8	23,2	24,5	26,2	27,3	29,2	30,0	31,0	34,9	34,5
Min	264,7	269,9	288,8	303,8	322,3	337,0	353,0	362,2	373,1	382,0	385,9	386,0	399,7
Max	316,7	335,9	352,0	374,8	394,3	410,5	434,0	449,1	459,2	473,4	482,0	493,3	508,0

Legenda: DP= Desvio Padrão; Min= Valor Mínimo; Max= Valor Máximo.

Quadro 18: Comparação da média do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo controle (n=10).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	Final
S1	-	<0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0130	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0141	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4941	<0,0001	<0,0001
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0463	<0,0001
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0561
Final	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way ($p < 0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1.

Figura 24: Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo controle.

Conforme observado nos quadros 17 e 18 e ilustrado na figura 24, a massa corporal total, na semana 1, no grupo controle, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas. Não houve diferença estatística na massa corporal total na semana 10 quando comparada a semana 11 ($p = 0,4941$) e na semana 12 quando comparada a semana final ($p = 0,0561$). Em adição, a massa corporal total manteve-se em aumento numérico até a semana final.

Quadro 19: Massa corporal total por semana em gramas do grupo Whey 2 (suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins) (n=11).

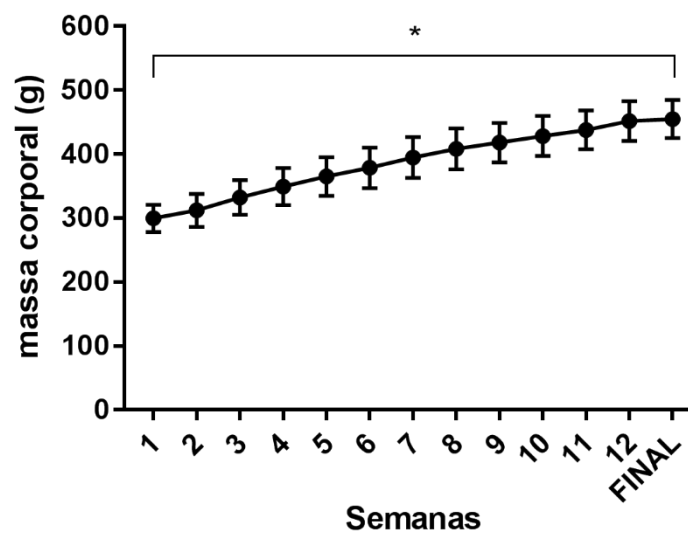
Variáveis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Final
W211	320,0	327,7	335,5	353,0	371,2	385,2	404,0	416,0	429,1	442,8	457,0	470,8	481,6
W212	309,5	329,5	346,6	369,4	387,7	405,5	425,0	438,4	447,8	460,2	463,2	475,8	478,9
W213	303,6	313,8	336,0	350,6	371,0	380,5	405,0	417,9	419,4	431,1	442,3	449,7	453,6
W221	311,0	335,6	356,3	371,6	391,0	401,3	410,0	423,6	435,0	441,3	452,2	469,8	471,8
W222	323,9	340,2	367,0	388,5	404,3	423,2	441,0	447,9	460,0	466,2	475,0	491,3	495,8
W223	256,7	252,4	269,0	283,6	297,5	308,7	323,0	331,0	347,1	356,9	370,1	383,8	388,3
W224	313,4	327,6	353,9	372,0	385,6	400,5	410,0	428,7	435,3	451,7	462,4	474,3	457,2
W231	294,9	302,1	320,1	332,4	344,3	355,0	369,0	386,0	393,2	401,1	409,0	419,8	426,8
W232	268,0	283,4	307,0	321,9	336,6	350,2	370,0	388,8	398,1	408,9	416,6	429,6	437,6
W233	305,8	316,2	337,1	353,5	371,5	381,6	398,0	414,1	421,8	431,8	437,7	455,6	457,5
W234	288,5	303,5	328,4	343,2	355,9	373,2	388,0	397,1	411,9	421,3	432,3	448,2	455,5
Média	299,6	312,0	332,4	349,1	365,1	378,6	394,8	408,1	418,1	428,5	438,0	451,7	455,0
DP	21,1	25,9	27,0	28,9	30,3	31,7	31,9	32,1	30,7	31,1	30,2	30,8	29,6
Min	256,7	252,4	269,0	283,6	297,5	308,7	323,0	331,0	347,1	356,9	370,1	383,8	388,3
Max	323,9	340,2	367,0	388,5	404,3	423,2	441,0	447,9	460,0	466,2	475,0	491,3	495,8

Legenda: DP= Desvio Padrão; Min= Valor Mínimo; Max= Valor Máximo.

Quadro 20: Comparação da média do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 2 (Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins) (n=11).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	Final
S1	-	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0133	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0070	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0226	<0,0001	<0,0001
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9889
Final	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1.

Figura 25: Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 2.

Conforme observado nos quadros 19 e 20 e ilustrado na figura 25, a massa corporal total, na semana 1, no grupo Whey 2, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas. Não houve diferença estatística na massa corporal total na semana 12 quando comparada a semana final ($p = 0,9889$). Em adição, a massa corporal total manteve-se em aumento numérico até a semana final.

Quadro 21: Massa corporal total por semana em gramas do grupo Whey 4 (suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins) (n=10).

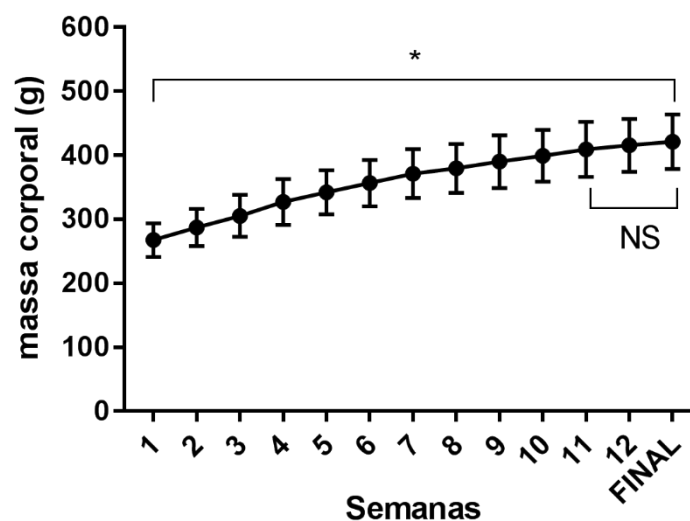
Variáveis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Final
W411	282,3	312,5	329,5	360,7	374,8	388,0	412,0	417,1	438,0	448,5	463,7	463,8	469,7
W412	279,3	294,5	310,1	328,9	342,8	357,0	364,1	376,2	384,0	396,6	402,9	403,2	403,8
W413	245,9	277,3	284,1	307,0	329,3	350,0	368,4	378,5	389,5	406,1	413,6	423,2	423,7
W421	288,1	314,0	346,9	363,2	377,4	397,0	412,3	420,3	434,6	442,6	454,2	459,9	461,7
W422	218,2	235,9	258,0	270,9	291,9	308,0	319,5	325,7	333,8	343,2	354,8	362,3	373,0
W424	313,1	336,1	359,1	388,0	401,6	420,0	433,4	441,7	451,3	454,5	472,5	477,6	491,0
W431	254,4	264,3	282,8	305,7	319,5	327,0	343,1	352,2	357,0	367,6	377,2	387,4	393,0
W432	256,1	263,0	272,4	289,9	301,2	312,0	322,6	329,5	336,0	342,7	350,6	357,7	358,5
W433	274,9	291,0	312,0	332,1	347,7	354,0	370,2	376,4	387,4	391,9	398,4	408,2	419,3
W434	262,7	283,6	298,9	323,7	336,9	352,0	369,1	379,0	388,9	399,1	405,4	413,0	420,8
Média	267,5	287,2	305,4	327,0	342,3	356,5	371,5	379,7	390,1	399,3	409,3	415,6	421,5
DP	26,1	29,2	32,7	35,9	34,6	36,4	38,2	38,2	41,2	40,6	43,0	41,4	42,5
Min	218,2	235,9	258,0	270,9	291,9	308,0	319,5	325,7	333,8	342,7	350,6	357,7	358,5
Max	313,1	336,1	359,1	388,0	401,6	420,0	433,4	441,7	451,3	454,5	472,5	477,6	491,0

Legenda: DP= Desvio Padrão; Min= Valor Mínimo; Max= Valor Máximo.

Quadro 22: Comparação da média do ganho de massa corporal em 12 semanas no grupo Whey 4 (Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins) (n=10).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	Final
S1	-	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2	-	-	0,0010	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	0,0126	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,0305	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	0,0166	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	0,6959	0,0006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3210	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5127	0,0003	<0,0001	<0,0001
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3733	0,0052	<0,0001
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9326	0,1267
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9619
Final	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. NS $p > 0,05$.

Figura 26: Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 4.

Conforme observado nos quadros 21 e 22 e ilustrado na figura 26, a massa corporal total, na semana 1, no grupo Whey 4, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas. A massa corporal total passou a não apresentar diferença estatística significativa a partir da semana 11 ($p > 0,05$). Em adição, a massa corporal total manteve-se em aumento numérico até a semana final.

Quadro 23: Massa corporal total por semana em gramas do grupo Whey 6 (suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins) (n=7).

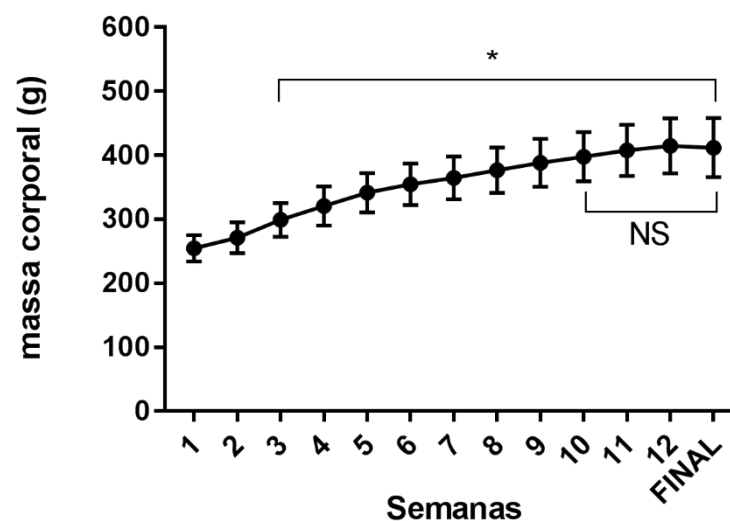
Variáveis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Final
W612	241,2	244,5	278,7	301,5	322,0	335,6	344,8	351,9	365,2	377,0	387,7	394,5	402,3
W613	259,2	270,0	305,4	329,4	346,0	362,6	371,2	386,4	402,6	409,4	421,4	428,5	426,1
W614	250,8	269,1	298,0	319,0	343,0	351,1	360,0	374,5	388,1	396,9	402,7	418,3	380,7
W621	255,5	277,0	296,6	312,9	338,0	352,8	363,6	368,2	375,8	387,1	400,0	411,3	412,0
W622	274,5	292,7	317,3	338,5	359,0	368,5	380,6	393,1	402,4	412,8	417,9	425,5	438,0
W623	281,9	306,2	339,6	371,2	391,0	409,9	420,8	438,6	452,4	464,2	478,9	484,5	485,7
W624	220,8	239,3	257,9	273,6	292,0	302,5	311,0	324,9	331,4	337,3	346,1	340,4	338,8
Média	254,8	271,3	299,1	320,9	341,6	354,7	364,6	376,8	388,3	397,8	407,8	414,7	411,9
DP	20,4	24,0	26,2	30,5	30,6	32,7	33,5	35,5	37,5	38,7	40,1	43,1	46,1
Min	220,8	239,3	257,9	273,6	292,0	302,5	311,0	324,9	331,4	337,3	346,1	340,4	338,8
Max	281,9	306,2	339,6	371,2	391,0	409,9	420,8	438,6	452,4	464,2	478,9	484,5	485,7

Legenda: DP= Desvio Padrão; Min= Valor Mínimo; Max= Valor Máximo.

Quadro 24: Comparação da média do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 6 (Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins) (n=7).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	Final
S1	-	0,0802	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S3	-	-	-	0,0032	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4	-	-	-	-	0,0066	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S5	-	-	-	-	-	0,3292	0,0014	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S6	-	-	-	-	-	-	0,7601	0,0026	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S7	-	-	-	-	-	-	-	0,4427	0,0009	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5456	0,0054	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7965	0,0138	0,0001	0,0009
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7427	0,0624	0,2273
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9761	0,9998
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999
Final	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

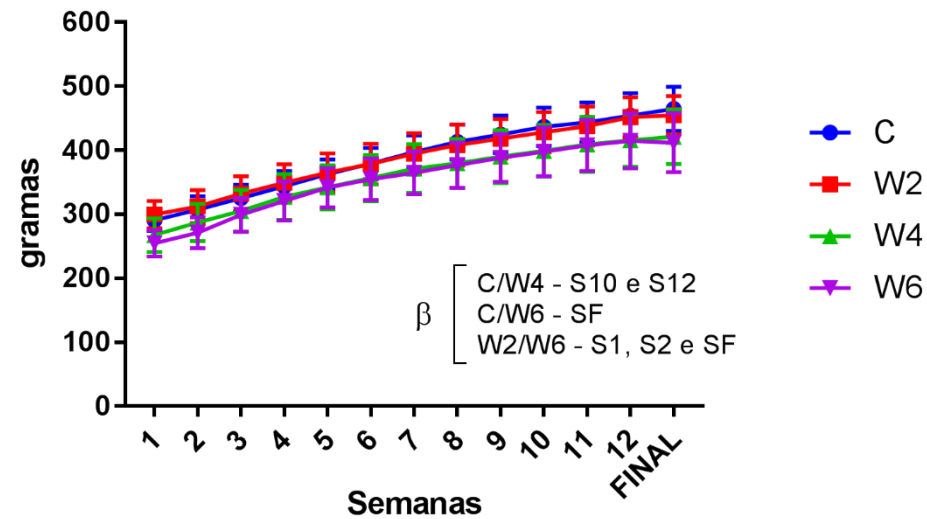
Legenda: S= Semana; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. NS $p > 0,05$.

Figura 27: Alteração do ganho de massa corporal total em 12 semanas no grupo Whey 6.

Conforme observado nos quadros 23 e 24 e ilustrado na figura 27, a massa corporal total, na semana 1, no grupo Whey 6, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas, com exceção da semana 2 ($p = 0,0802$). A massa corporal total passou a não apresentar diferença estatística significativa a partir da semana 10 ($p > 0,05$). Em adição, a massa corporal total manteve-se em aumento numérico até a semana 12, seguido de uma redução na semana final, porém sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$).



Legenda: β $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos.

Figura 28: Comparação da alteração da massa corporal total entre os grupos em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 18, 20, 22 e 24 e ilustrado na figura 28, houve diferença estatística significativa no aumento da massa corporal total do grupo controle em comparação ao grupo Whey 4 nas semanas 10 ($p=0,0454$), 12 ($p=0,0348$) e na semana final ($p=0,0138$). Do mesmo modo, houve diferença estatística significativa no aumento da massa corporal total do grupo controle em comparação ao grupo Whey 6 na semana final ($p=0,0048$).

Nesse mesmo sentido, houve diferença estatística significativa no aumento massa corporal total do grupo Whey 2 em comparação ao grupo Whey 6 nas semanas 1 ($p=0,0210$), 2 ($p=0,0434$) e na semana final ($p=0,0289$).

Nos demais pontos de análise, não houve diferença estaticamente significante ($p>0,05$) entre os grupos controle, Whey 2, Whey 4 e Whey 6 em todas as semanas.

Quadro 25: Média da massa corporal total e Δ de massa corporal em gramas dos grupos.

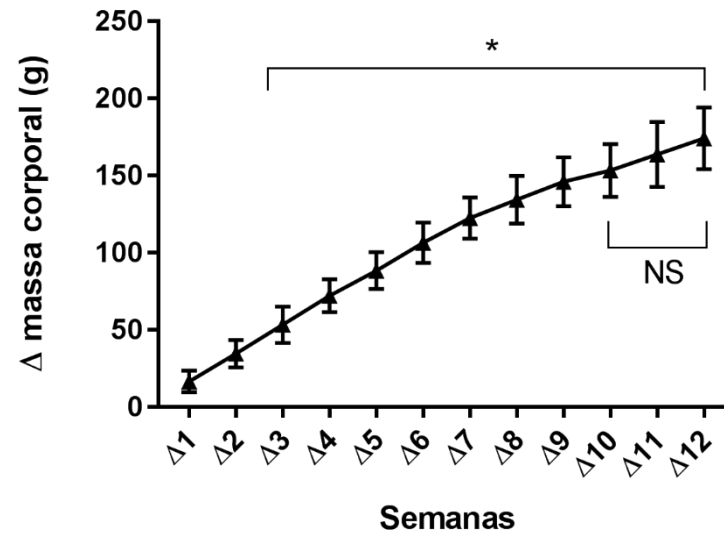
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C (n=10)	290,5 $\pm 16,39$	307,2 $\pm 21,20$	325,1 $\pm 0,04$	343,9 $\pm 23,81$	362,7 $\pm 23,24$	379,0 $\pm 24,52$	397,1 $\pm 26,15$	413,1 $\pm 27,26$	424,9 $\pm 29,23$	436,7 $\pm 30,02$	443,9 $\pm 31,01$	454,4 $\pm 34,88$	464,8 $\pm 34,51$
Δ (g)	-	16,65 $\pm 6,97$	34,60 $\pm 8,82$	53,36 $\pm 11,70$	72,15 $\pm 10,68$	88,52 $\pm 11,99$	106,55 $\pm 13,05$	122,63 $\pm 13,32$	134,44 $\pm 15,41$	146,17 $\pm 15,85$	153,39 $\pm 17,11$	163,93 $\pm 21,02$	174,30 $\pm 19,95$
W2 (n=11)	299,7 $\pm 21,13$	312,0 $\pm 25,09$	332,4 $\pm 27,03$	349,0 $\pm 28,94$	365,1 $\pm 30,25$	378,6 $\pm 31,69$	394,8 $\pm 31,92$	408,1 $\pm 32,07$	418,0 $\pm 30,75$	428,4 $\pm 31,09$	437,9 $\pm 30,20$	451,7 $\pm 30,82$	455,0 $\pm 29,64$
Δ (g)	-	12,43 $\pm 7,60$	32,87 $\pm 10,99$	49,49 $\pm 12,35$	65,57 $\pm 13,15$	79,05 $\pm 14,93$	95,25 $\pm 15,58$	108,56 $\pm 15,92$	118,49 $\pm 14,89$	128,91 $\pm 15,14$	138,41 $\pm 13,82$	152,13 $\pm 14,54$	155,40 $\pm 14,72$
W4 (n=10)	267,5 $\pm 26,12$	287,2 $\pm 29,19$	305,3 $\pm 32,65$	327,0 $\pm 35,88$	342,3 $\pm 34,61$	356,5 $\pm 36,42$	371,4 $\pm 38,17$	379,6 $\pm 38,16$	390,0 $\pm 41,18$	399,2 $\pm 40,56$	409,3 $\pm 42,96$	415,6 $\pm 41,35$	421,5 $\pm 42,46$
Δ (g)	-	19,72 $\pm 8,13$	37,88 $\pm 11,56$	59,51 $\pm 13,82$	74,81 $\pm 14,51$	89,00 $\pm 17,68$	103,97 $\pm 20,48$	112,16 $\pm 20,27$	122,55 $\pm 23,71$	131,78 $\pm 24,68$	141,83 $\pm 26,73$	148,13 $\pm 25,85$	154,00 $\pm 26,91$
W6 (n=7)	254,8 $\pm 20,41$	271,2 $\pm 24,00$	299,0 $\pm 26,24$	320,8 $\pm 30,53$	341,5 $\pm 30,61$	354,7 $\pm 32,68$	364,5 $\pm 33,53$	376,8 $\pm 35,52$	388,2 $\pm 37,50$	397,8 $\pm 38,68$	407,8 $\pm 40,08$	414,7 $\pm 43,07$	411,9 $\pm 46,08$
Δ (g)	-	16,41 $\pm 7,10$	44,23 $\pm 7,10$	66,03 $\pm 11,90$	86,73 $\pm 11,76$	99,87 $\pm 14,17$	109,73 $\pm 14,67$	121,96 $\pm 17,22$	133,43 $\pm 19,59$	142,97 $\pm 20,46$	152,97 $\pm 22,35$	159,87 $\pm 24,94$	157,10 $\pm 27,70$

Legenda: C= Grupo controle; W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins.

Quadro 26: Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo controle (n=10).

	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$	$\Delta 4$	$\Delta 5$	$\Delta 6$	$\Delta 7$	$\Delta 8$	$\Delta 9$	$\Delta 10$	$\Delta 11$	$\Delta 12$
$\Delta 1$	-	0,2007	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 2$	-	-	0,1515	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 3$	-	-	-	0,1498	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 4$	-	-	-	-	0,3265	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 5$	-	-	-	-	-	0,1954	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 6$	-	-	-	-	-	-	0,3537	0,0019	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 7$	-	-	-	-	-	-	-	0,7959	0,0196	0,0003	<0,0001	<0,0001
$\Delta 8$	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8029	0,1414	0,0007	<0,0001
$\Delta 9$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9931	0,2138	0,0017
$\Delta 10$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8916	0,0662
$\Delta 11$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9041
$\Delta 12$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way ($p < 0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. NS $p > 0,05$.

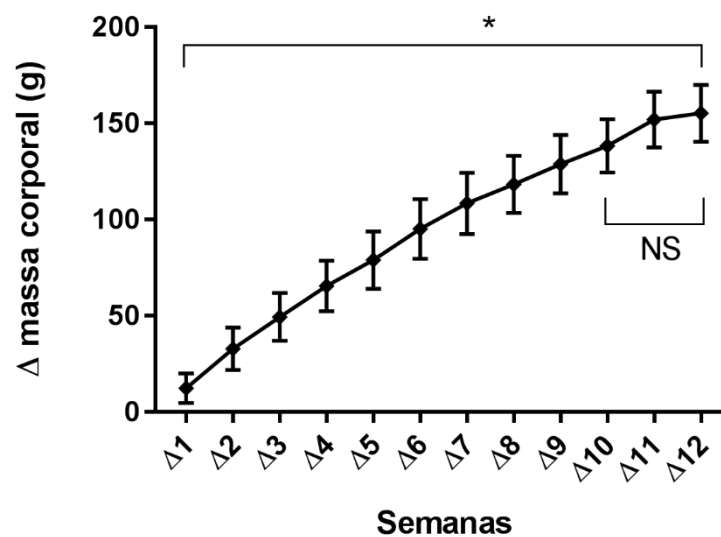
Figura 29: Alteração do Δ de massa corporal do grupo controle em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 25 e 26 e ilustrado na figura 29, o $\Delta 1$ de massa corporal, no grupo controle, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas, com exceção do $\Delta 2$ ($p = 0,2007$). O Δ de massa corporal passou a não ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$) a partir do $\Delta 10$. Em adição, o Δ de massa corporal manteve-se em aumento numérico até a semana final.

Quadro 27: Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo Whey 2 (Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins) (n=11).

	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$	$\Delta 4$	$\Delta 5$	$\Delta 6$	$\Delta 7$	$\Delta 8$	$\Delta 9$	$\Delta 10$	$\Delta 11$	$\Delta 12$
$\Delta 1$	-	0,0335	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 2$	-	-	0,1849	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 3$	-	-	-	0,2251	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 4$	-	-	-	-	0,4907	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 5$	-	-	-	-	-	0,2165	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 6$	-	-	-	-	-	-	0,5102	0,0072	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 7$	-	-	-	-	-	-	-	0,8716	0,0353	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 8$	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8316	0,0437	<0,0001	<0,0001
$\Delta 9$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9013	0,0073	0,0010
$\Delta 10$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4628	0,1608
$\Delta 11$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999
$\Delta 12$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p=0,000000); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. NS $p > 0,05$.

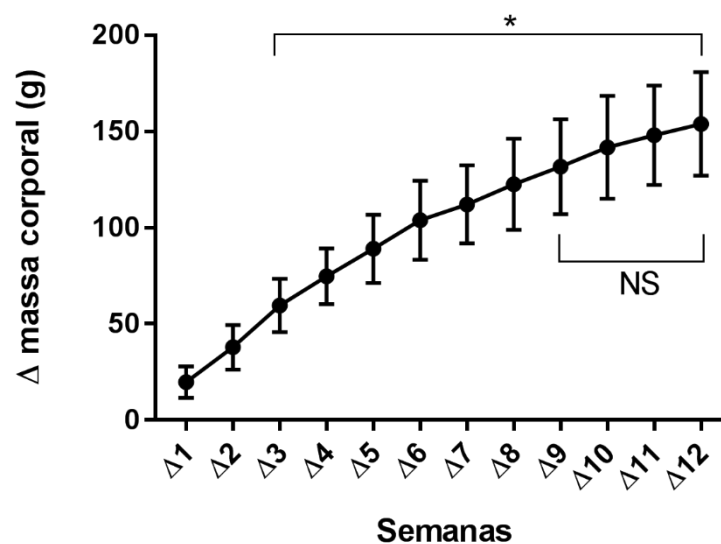
Figura 30: Alteração do Δ de massa corporal do grupo Whey 2 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 25 e 27 e ilustrado na figura 30, o $\Delta 1$ de massa corporal, no grupo Whey 2, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas. O Δ de massa corporal passou a não ser estatisticamente significativo ($p < 0,05$) a partir do $\Delta 10$. Em adição, o Δ de massa corporal manteve-se em aumento numérico até a semana final.

Quadro 28: Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo Whey 4 (Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins) (n=10).

	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$	$\Delta 4$	$\Delta 5$	$\Delta 6$	$\Delta 7$	$\Delta 8$	$\Delta 9$	$\Delta 10$	$\Delta 11$	$\Delta 12$
$\Delta 1$	-	0,7024	0,0018	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 2$	-	-	0,4391	0,0055	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 3$	-	-	-	0,8767	0,0693	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 4$	-	-	-	-	0,9223	0,0763	0,0047	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 5$	-	-	-	-	-	0,8916	0,3324	0,0188	0,0005	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 6$	-	-	-	-	-	-	0,9991	0,6716	0,1115	0,0038	0,0003	<0,0001
$\Delta 7$	-	-	-	-	-	-	-	0,9923	0,5926	0,0657	0,0079	0,0008
$\Delta 8$	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9972	0,6188	0,1968	0,0385
$\Delta 9$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9942	0,8214	0,4000
$\Delta 10$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999	0,9740
$\Delta 11$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999
$\Delta 12$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. NS $p > 0,05$.

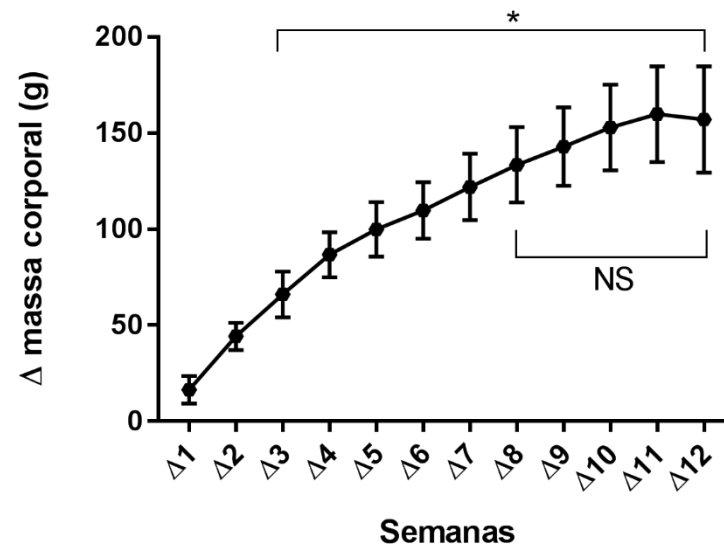
Figura 31: Alteração do Δ de massa corporal do grupo Whey 4 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 25 e 28 e ilustrado na figura 31, o $\Delta 1$ de massa corporal, no grupo Whey 4, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas, com exceção do $\Delta 2$ ($p = 0,7024$). O Δ de massa corporal passou a não ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$) a partir do $\Delta 9$. Em adição, o Δ de massa corporal manteve-se em aumento numérico até a semana final.

Quadro 29: Comparação da média do Δ de massa corporal por semana em 12 semanas no grupo Whey 6 (Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins) (n=7).

	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$	$\Delta 4$	$\Delta 5$	$\Delta 6$	$\Delta 7$	$\Delta 8$	$\Delta 9$	$\Delta 10$	$\Delta 11$	$\Delta 12$
$\Delta 1$	-	0,1525	0,0018	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 2$	-	-	0,4885	0,0016	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 3$	-	-	-	0,5685	0,0296	0,0010	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 4$	-	-	-	-	0,9629	0,4047	0,0192	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 5$	-	-	-	-	-	0,9962	0,4681	0,0322	0,0012	<0,0001	<0,0001	<0,0001
$\Delta 6$	-	-	-	-	-	-	0,9781	0,3588	0,0354	0,0012	<0,0001	0,0002
$\Delta 7$	-	-	-	-	-	-	-	0,9866	0,5455	0,0671	0,0080	0,0197
$\Delta 8$	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9971	0,6525	0,2083	0,3606
$\Delta 9$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9957	0,8230	0,9390
$\Delta 10$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9999	>0,9999
$\Delta 11$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,9999
$\Delta 12$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

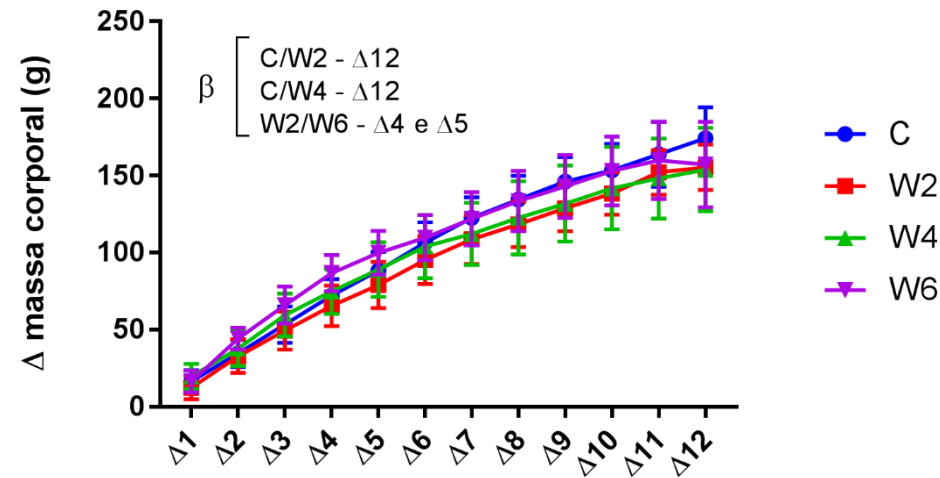
Legenda: S= Semana; Anova One-way (p<0,0001); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com a semana 1. NS $p > 0,05$.

Figura 32: Alteração do Δ de massa corporal do grupo Whey 6 em 12 semanas.

Conforme observado nos quadros 25 e 29 e ilustrado na figura 32, o $\Delta 1$ de massa corporal, no grupo Whey 4, foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparada as demais semanas, com exceção do $\Delta 2$ ($p = 0,1525$). O Δ de massa corporal passou a não ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$) a partir do $\Delta 8$. Em adição, o Δ de massa corporal manteve-se em aumento numérico até o $\Delta 11$, seguido de uma redução numérica no $\Delta 12$, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).



Lenda: β $p < 0,05$ nas comparações entre os grupos.

Figura 33: Comparação da alteração do Δ da massa corporal entre os grupos em 12 semanas.

Conforme observado no quadro 25 e ilustrado na figura 33, houve aumento significativamente estatístico no Δ de massa corporal do grupo controle em comparação ao grupo Whey 2 no $\Delta 12$ ($p=0,0484$). Do mesmo modo, houve aumento no Δ de massa corporal do grupo controle em comparação ao grupo Whey 4 no $\Delta 12$ ($p=0,0337$). Nesse mesmo sentido, houve aumento estatisticamente significativo no Δ de massa corporal do grupo Whey 6 em comparação ao grupo Whey 2 no $\Delta 4$ ($p=0,0442$) e no $\Delta 5$ ($p=0,0494$). Nos demais pontos de análise, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos controle, Whey 2, Whey 4 e Whey 6 em todas as semanas.

Quadro 30: Massa total em gramas do músculo gastrocnêmio do grupo controle, do grupo Whey 2 (suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins), do grupo Whey 4 (suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins) e do grupo Whey 6 (suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins).

Sequência das amostras	Controle (n=10)	W2 (n=11)	W4 (n=10)	W6 (n=7)
1	2,500	2,316	2,449	2,292
2	2,201	2,582	2,224	1,944
3	2,359	2,630	2,263	2,320
4	2,437	2,475	2,461	2,244
5	2,514	2,313	2,094	2,291
6	2,860	2,312	2,889	2,400
7	2,986	2,316	2,211	1,815
8	2,478	2,272	2,290	-
9	2,792	2,581	2,393	-
10	2,952	2,528	2,239	-
11	-	2,601	-	-
Média	2,608	2,448	2,351	2,187
DP	0,269	0,142	0,221	0,218
Min	2,201	2,272	2,094	1,815
Max	2,986	2,630	2,889	2,400

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; DP= Desvio Padrão; Min= Valor Mínimo; Max= Valor Máximo; A sequência das amostras nos grupos é independente.

Quadro 31: Massa relativa do músculo gastrocnêmio.

Peso (g)	C (n=10)	(mg/g)	(%)	W2g (n=11)	(mg/g)	(%)	W4g (n=10)	(mg/g)	(%)	W6g (n=7)	(mg/g)	(%)
Peso inicial (g)	290,55 ±16,39			299,57 ±21,12			267,50 ±26,11 [#]			254,84 ±20,40 ^{*#}		
Peso final (g)	464,81 ±34,51			454,96 ±29,54			421,45 ±42,46			411,94 ±46,07		
Gastrocnêmio (g)	2,607 ±0,269	5,612 ±0,419	0,56 ±0,04	2,447 ±0,142	5,398 ±0,430	0,539 ±0,04	2,351 ±0,220	5,593 ±0,347	0,55 ±0,03	2,187 ±0,218 [*]	5,318 ±0,246	0,532 ±0,02

Legenda: C= Grupo controle; W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Dados apresentados em *média±desvio padrão*. * p<0,05 comparado com o grupo controle; # p<0,05 comparado com W2g.

Quadro 32: Comparação entre grupos da massa total do músculo gastrocnêmio (n=38).

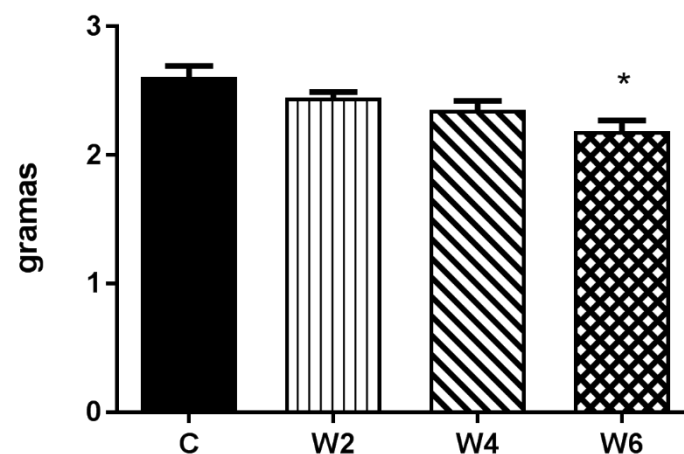
	Controle (n=10)	W2 (n=11)	W4 (n=10)	W6 (n=7)
Controle (n=10)	-	0,6562	0,1313	0,0032
W2 (n=11)	-	-	0,9636	0,1842
W4 (n=10)	-	-	-	0,7512
W6 (n=7)	-	-	-	-

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.

Quadro 33: Comparação entre grupos da massa relativa (mg/g) do músculo gastrocnêmio (n=38).

	Controle (n=10)	W2 (n=11)	W4 (n=10)	W6 (n=7)
Controle (n=10)	-	0,9266	>0,9999	0,8158
W2 (n=11)	-	-	0,9542	0,9999
W4 (n=10)	-	-	-	0,8610
W6 (n=7)	-	-	-	-

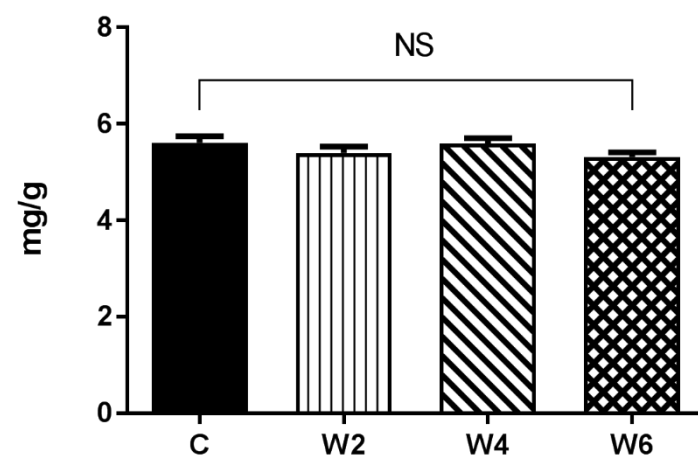
Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Figura 34: Comparação da massa total do músculo gastrocnêmio.

Conforme observado nos quadros 30 e 32 e ilustrado na figura 34, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0032$) entre o grupo controle e o grupo Whey 6, onde a massa absoluta do músculo gastrocnêmio foi maior no grupo controle em relação ao grupo Whey 6. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nas demais comparações entre grupos.



Legenda: NS $p > 0,05$ na comparação entre grupos.

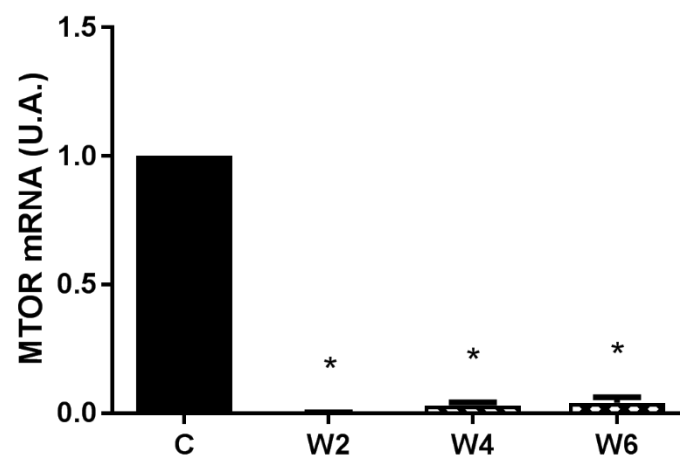
Figura 35: Comparação da massa relativa do músculo gastrocnêmio.

Conforme observado nos quadros 31 e 33 e ilustrado na figura 35, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na massa relativa do músculo gastrocnêmio nas comparações entre grupos.

Quadro 34: Comparação da expressão gênica de MTOR mRNA entre os grupos (n=36).

	Controle (n=8)	W2 (n=11)	W4 (n=10)	W6 (n=7)
Controle (n=8)	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
W2 (n=11)	-	-	0,2206	0,0700
W4 (n=10)	-	-	-	0,9142
W6 (n=7)	-	-	-	-

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Anova One-way (p=0,0306); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

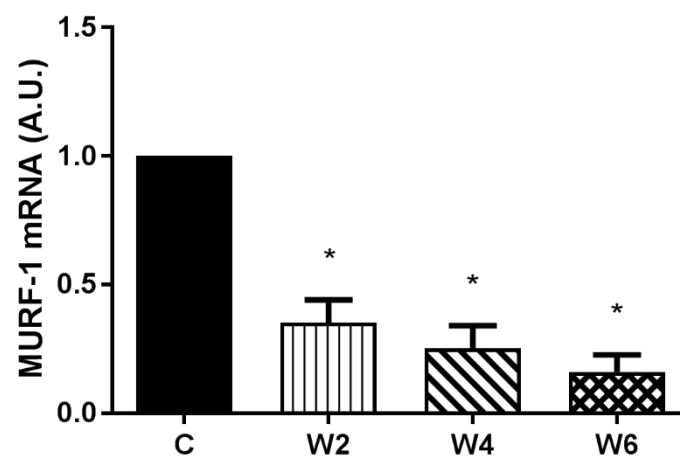
Figura 36: Alteração da expressão gênica de MTOR mRNA.

Conforme observado no quadro 34 e ilustrado na figura 36, a expressão gênica de MTOR mRNA foi estatisticamente inferior nos grupos Whey 2 ($p < 0,0001$), Whey 4 ($p < 0,0001$) e Whey 6 ($p = 0,0001$) em relação ao grupo controle, na ordem de 100%, 97% e 96%, respectivamente.

Quadro 35: Comparação da expressão gênica de MURF-1 mRNA entre os grupos (n=36).

	Controle (n=8)	W2 (n=11)	W4 (n=10)	W6 (n=7)
Controle (n=8)	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
W2 (n=11)	-	-	0,7607	0,2865
W4 (n=10)	-	-	-	0,8451
W6 (n=7)	-	-	-	-

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

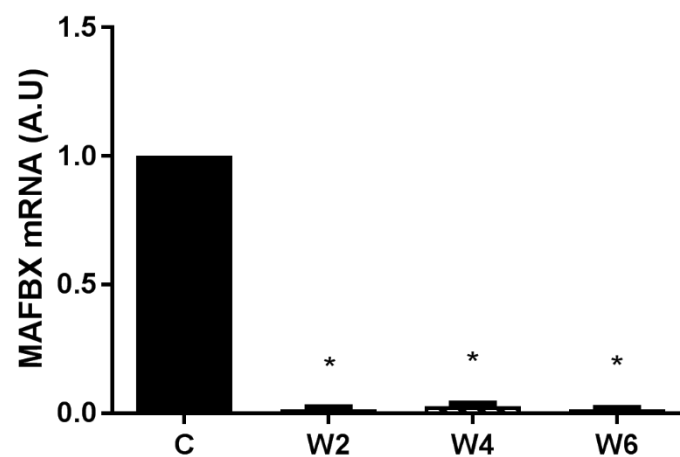
Figura 37: Alteração da expressão gênica de MURF-1 mRNA.

Conforme observado no quadro 35 e ilustrado na a figura 37, a expressão gênica de MURF-1 mRNA foi estatisticamente inferior nos grupos Whey 2 ($p < 0,0001$), Whey 4 ($p < 0,0001$) e Whey 6 ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle, na ordem de 65%, 75% e 84%, respectivamente.

Quadro 36: Comparação da expressão gênica de MAFBX mRNA entre os grupos (n=36).

	Controle (n=8)	W2 (n=11)	W4 (n=10)	W6 (n=7)
Controle (n=8)	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
W2 (n=11)	-	-	0,6606	>0,9999
W4 (n=10)	-	-	-	0,7569
W6 (n=7)	-	-	-	-

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Anova One-way ($p<0,0001$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Figura 38: Alteração da expressão gênica de MAFBX mRNA.

Conforme observado no quadro 36 e ilustrado na figura 38, a expressão gênica de MAFBX mRNA foi estatisticamente inferior nos grupos Whey 2 ($p < 0,0001$), Whey 4 ($p < 0,0001$) e Whey 6 ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle, na ordem de 99%, 97% e 99%, respectivamente.

Quadro 37: Área das células do músculo gastrocnêmio dos grupos.

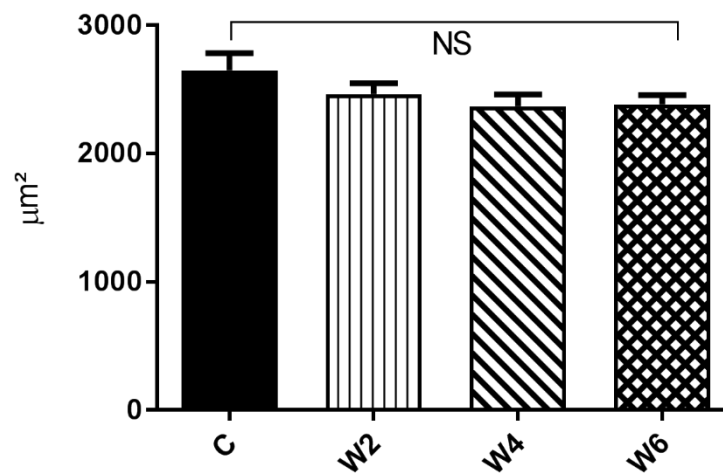
Área (μm^2)	C (n=8)	W2g (n=11)	W4g (n=10)	W6 (n=7)
Gastrocnêmio	2648,18 $\pm 832,15$	2462,56 $\pm 825,70$	2369,25 $\pm 696,25$	2383,56 $\pm 631,19$

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Anova One-way ($p=0,2245$); Post-hoc de Tukey. Os valores estão expressos em micrômetros quadrados (μm^2). * $p<0,05$ comparado com o grupo controle.

Quadro 38: Comparação da área celular do músculo gastrocnêmio entre os grupos (n=36).

	Controle (n=8)	W2 (n=11)	W4 (n=10)	W6 (n=7)
Controle (n=8)	-	0,5426	0,2168	0,3302
W2 (n=11)	-	-	0,8885	0,9459
W4 (n=10)	-	-	-	0,9996
W6 (n=7)	-	-	-	-

Legenda: W2= Grupo suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins; W4= Grupo suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins; W6= Grupo suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins; Anova One-way ($p=0,000000$); Post-hoc de Tukey.



Legenda: NS $p > 0,05$ na comparação entre grupos.

Figura 39: Alteração da área das células do músculo gastrocnêmio.

Conforme observado nos quadros 37 e 38 e ilustrado na figura 39, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na área das células do músculo gastrocnêmio nas comparações entre grupos.

6 DISCUSSÃO

De acordo com resultados apresentados nos quadros 31, 32 e 33 e ilustrados nas figuras 27, 28 e 29, a expressão gênica de MTOR mRNA teve significância estatística inferior nos grupos Whey 2 ($p < 0,0001$), Whey 4 ($p < 0,0001$) e Whey 6 ($p = 0,0001$) em relação ao grupo controle, na ordem de 100%, 97% e 96%, respectivamente. Do mesmo modo, a expressão gênica de MURF-1 mRNA teve significância estatística inferior nos grupos Whey 2 ($p < 0,0001$), Whey 4 ($p < 0,0001$) e Whey 6 ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle, na ordem de 65%, 75% e 84%, respectivamente. Em linha, a expressão gênica MAFBX mRNA teve significância estatística inferior nos grupos Whey 2 ($p < 0,0001$), Whey 4 ($p < 0,0001$) e Whey 6 ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle, na ordem de 99%, 97% e 99%, respectivamente.

Tais achados corroboram aos de Lomonosova e colaboradores (2014), que em experimentação com duração de 48 horas, com 4 grupos experimentais contendo 14 ratos Wistar cada, machos, com idade de 3 meses, com massa corporal entre 254 e 276 gramas, organizados em grupo controle (mantidas as condições de controle); grupo exercício (submetidos ao treinamento aeróbio declinado excêntrico); grupo exercício 90 (submetidos ao treinamento aeróbio declinado excêntrico e suplementação de arginina a 90 mg/kg/dia); e grupo exercício 500 (submetidos ao treinamento aeróbio declinado excêntrico e suplementação de arginina a 500 mg/kg/dia). Analisando apenas os grupos sedentários, foi relatado que a expressão gênica de MAFBx e MURF-1 foi reduzida em função da suplementação com arginina (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico).

Cabe ressaltar que os autores não avaliaram a expressão gênica de MTOR mRNA e que a variável treinamento não foi avaliada no presente estudo, no entanto, a suplementação de aminoácidos e a suplementação de Whey Proteins parecem sinalizar para a redução da expressão gênica de vias relacionadas a degradação proteica.

Em contraponto, Lomonosova e colaboradores (2011), em pesquisa com duração de 14 dias, com 3 grupos experimentais contendo 14 ratos Wistar

cada, machos, com idade de 10 semanas, com peso corporal de aproximadamente 220 gramas, distribuídos em grupo controle (mantidas as condições de controle); grupo suspenso (membros posteriores suspensos); e grupo suspenso suplementado (membros posteriores suspensos e a administração de L-arginina 500 mg/kg com água). Foi relatado aumento na expressão gênica de MURF-1 e MAFBX, no grupo suspenso, em comparação com o grupo controle (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico). Em contraste, não houve diferença na expressão gênica entre o grupo suspenso suplementado e o grupo controle.

Nesse caso, os autores não avaliaram a expressão gênica de MTOR mRNA e utilizaram a suspensão de membros posteriores para estimular o desuso muscular, o que não foi avaliado no presente estudo, em adição, a suplementação do aminoácido arginina não foi capaz de reduzir a expressão gênica de MURF-1 e MAFBX, enquanto que, no presente estudo, a expressão gênica de ambas foi reduzida em todas as dosagens experimentais, sugerindo que o consumo e/ou suplementação de aminoácidos isolados pode não alterar a expressão gênica dessas proteínas.

No trabalho de Mobley e colaboradores (2015), com duração de 180 minutos, com 4 grupos experimentais contendo de 8 a 13 ratos Wistar cada, machos, (o autor não informou a idade), com massa corporal de 250 gramas, organizados em grupo controle (tratado com 1 ml de água); grupo ácido fosfatídico (tratado com 0,029 gramas de ácido fosfatídico); grupo Whey (tratado com 0,193 gramas de Whey Proteins concentrado); e grupo Whey + ácido fosfatídico (tratado com 0,193 gramas de Whey Proteins concentrado e com 0,029 gramas de ácido fosfatídico). Foi relatado que houve um aumento de 2,3 vezes na expressão gênica de MURF-1 no grupo Whey + ácido fosfatídico em comparação com o controle (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico), no entanto, a expressão gênica de MAFBx foi semelhante em ambos os grupos.

Nesse caso, além da diferença temporal e de não avaliar a expressão gênica de MTOR mRNA, ocorreu a suplementação com Whey Proteins em doses menores quando comparadas ao presente estudo (2, 4 ou 6 g/kg/dia), sinalizando com aumento a expressão gênica de MURF-1 e inalteração da

expressão gênica de MAFBx entre os grupos, enquanto que no presente estudo, com duração de 12 semanas, ambas as expressões foram reduzidas nos grupos suplementados, sugerindo assim que o consumo crônico de doses supra-fisiológicas de Whey Proteins são capazes de reduzir a expressão gênica dessas proteínas.

Por outro lado, na experimentação realizada por Haraguchi e colaboradores (2014), com duração de 8 semanas, realizada com 4 grupos experimentais contendo 8 ratos Fischer cada, machos, com idade de 60 dias, massa corporal de aproximadamente 110 gramas, divididos da seguinte forma: grupo controle sedentário (ração padrão a base de caseína); grupo controle exercício (ração padrão a base de caseína); grupo Whey Proteins sedentário (ração com Whey Proteins em substituição a caseína); e grupo Whey Proteins exercício (ração com Whey Proteins em substituição a caseína). Foi observado que, em relação à expressão gênica de MTOR, que o grupo Whey Proteins exercício apresentou valores semelhantes aos grupos controle sedentário e Whey Proteins sedentário, no entanto apresentou diferença significativa em relação ao controle exercício ($p=0,005$).

Em relação à expressão gênica de MURF-1, houve uma diminuição significativa nos grupos de exercício em relação aos grupos sedentários ($p<0,001$), no que se refere a expressão gênica de MAFBx, houve diminuição significativa nos grupos Whey Proteins, na presença ou ausência do exercício de resistência ($p=0,008$).

Nesse estudo, ocorreu a oferta de ração enriquecida com Whey Proteins adicionado ao exercício físico, que não foi avaliado no presente estudo. No que se refere a expressão gênica de MTOR, os valores foram semelhantes entre o grupo controle sedentário e o grupo Whey Proteins sedentário, o que discorda dos achados do presente estudo, no qual a expressão gênica de MTOR foi menor nos grupos Whey Proteins sedentários em comparação ao grupo controle sedentário.

A disparidade nos resultados ocorreu, possivelmente, por conta da diferença nas doses de Whey Proteins, sendo assim um fator modificador da expressão gênica.

Em relação á expressão gênica de MAFBX, houve redução nos grupos que consumiram a ração contendo Whey Proteins, corroborando com os achados do presente estudo, no qual também houve redução da expressão gênica dessa proteína nos grupos suplementados com Whey Proteins.

De forma adicional, Mobley e colaboradores (2015), em pesquisa com duração de 180 minutos, realizada com 5 grupos experimentais contendo de 6 a 14 animais, machos, com idade entre 8 e 9 semanas, com massa corporal de 250 gramas, organizados da seguinte forma: grupo controle (mantidas as condições de controle); grupo WPC (suplementado com 0,19g de proteína do soro do leite concentrada); grupo 70W/30E (suplementado com 0,19g de proteína, sendo 70% de proteína do soro do leite concentrada e 30% albumina); grupo 50W/50E (suplementado com 0,19g de proteína, sendo 50% de proteína do soro do leite concentrada e 50% albumina); e grupo 30W/70E (suplementado com 0,19g de proteína, sendo 30% de proteína do soro do leite concentrada e 70% albumina). Foi relatado que, em expressão gênica de MAFBx, não houve alteração nos 90 minutos iniciais em todos os grupos, mas aumentou no grupo 70W/30E em comparação ao controle ($p=0,049$) 180 minutos após a suplementação.

Já em relação á expressão de MURF-1, foi relatado que não houve alteração nos 90 minutos iniciais em todos os grupos, mas aumentou nos grupos WPC e 70W/30E em comparação ao controle ($p=0,020$ e $p=0,032$, respectivamente) 180 minutos após a suplementação.

Nesse estudo, no qual os autores não avaliaram a expressão gênica de MTOR mRNA e de duração inferior ao presente estudo, foram suplementadas Whey Proteins e/ou albumina, diferente do presente estudo, onde foi suplementada somente a proteína do soro do leite. No que se refere a expressão gênica de MURF-1 e MAFBX os resultados discordam dos achados no presente estudo, no qual houve uma acentuada redução na expressão gênica dessas proteínas. Essa diferença encontrada pode ser explicada pelo conteúdo total de proteína suplementada e pela duração do estudo.

Da mesma forma, na pesquisa realizada por Batistela e colaboradores (2014), com duração de 15 dias, realizada com 2 grupos experimentais

contendo 7 animais cada, machos, com idade entre 30 dias, com massa corporal de 95 gramas, organizados da seguinte forma: grupo controle (recebeu dieta contendo 63% de carboidratos e 17% de proteínas) e grupo LPHC (recebeu dieta contendo 74% de carboidrato e 6% de proteína). Foi relatado que a expressão gênica de MURF-1 e MAFBx foi reduzida em 57% e 34%, respectivamente, nos animais do grupo LPHC (embora os autores não apresentem o valor do “p” encontrado no teste estatístico).

Nesse estudo, os autores não avaliaram a expressão gênica de MTOR mRNA e modularam macronutrientes da dieta para observar a alteração da expressão gênica, não sendo o foco do presente estudo.

No que se refere a expressão gênica de MURF-1 e MAFBX, os resultados discordam dos achados no presente estudo, uma vez que o conteúdo de Whey Proteins suplementado no presente estudo promoveu a redução na expressão gênica dessas proteínas.

Na investigação de Luo e colaboradores (2010), com duração de 14 dias, com 3 grupos experimentais com 10 ratos Sprague-Dawley cada, machos, (o autor não informou a idade), com massa corporal de 62,55 gramas, agrupados em grupo caseína (submetido ao consumo controlado de ração a base de caseína); grupo soja (submetido ao consumo controlado de ração a base de proteína isolada da soja); e grupo zeína (submetido ao consumo controlado de ração a base de proteína do milho). Foi relatado que a expressão gênica de MTOR aumentou no grupo zeína (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico).

Em relação á expressão gênica de MURF-1, houve aumento significativo de aproximadamente 8 vezes no grupo zeína em comparação com o grupo caseína e o grupo soja ($p=0,003$).

Em linha, a expressão gênica de MAFBx foi 4 vezes maior no grupo zeína em comparação com o grupo caseína e o grupo soja (embora o autor não apresente o valor de “p” encontrado no teste estatístico).

Nesse estudo, 3 fontes proteicas foram utilizadas para avaliar a modificação da expressão gênica de vias de síntese e degradação proteica,

diferindo no presente estudo na fonte proteica e no tempo de exposição ao consumo proteico. Nesse sentido, os resultados encontrados no aumento da expressão de MTOR, MURF-1 e MAFBX no grupo suplementado com proteína de milho são opostos ao do presente estudo, no qual houve redução na expressão dessas mesmas proteínas nos 3 grupos suplementados.

O autor discute que o aumento na expressão dessas proteínas pode estar relacionado ao aumento do pool de aminoácidos provocado pela exposição a ração enriquecida com proteína do milho, não promovendo dessa forma a degradação proteica, uma vez que ocorreu aumento nas vias de síntese e de degradação.

Nesse mesmo sentido, a redução da expressão gênica dessas 3 proteínas no presente estudo não podem ser diretamente relacionadas a degradação proteica, uma vez que houve diminuição nas vias de síntese e nas vias de degradação, sugerindo uma menor utilização dos aminoácidos provenientes da suplementação de Whey Proteins e do consumo de ração, sugerindo assim uma estabilização entre a síntese e a degradação proteica.

Esses resultados são suportados pela convergência entre os grupos experimentais da estabilização da massa corporal, da equivalência da massa relativa do músculo gastrocnêmio e da área celular do músculo gastrocnêmio.

Portanto, a suplementação de proteínas do soro do leite nas doses de 2, 4 e 6 g/kg/dia por 12 semanas em animais sedentários não foi capaz de gerar efeitos positivos sobre a hipertrofia muscular.

7 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo suportam a hipótese alternativa, confirmando que a suplementação com proteínas do soro do leite nas doses de 2, 4 e 6 g/kg/dia é capaz de alterar a expressão gênica de MTOR mRNA, MURF-1 mRNA e MAFBX mRNA.

Nesse sentido, a suplementação de Whey Proteins nas doses 2, 4 e 6 g/kg/dia não foi capaz de aumentar a expressão de MTOR mRNA, no entanto, foi capaz de reduzir a expressão gênica de MURF-1 mRNA e MAFBX mRNA.

O somatório desses efeitos não necessariamente está ligado ao aumento da síntese proteica, uma vez que houve redução tanto na via de síntese como na via de degradação, proporcionando assim uma estabilização fisiológica dentro dos parâmetros avaliados.

Sugerimos, portanto, que o desenvolvimento do caminho metabólico seja melhor avaliado, especialmente no que se refere a quantificação e fosforilação dessas proteínas, bem como o efeito do tratamento sobre a taxa de síntese proteica miofibrilar.

8 REFERÊNCIAS

ABE, T.; KOHNO, S.; YAMA, T.; OCHI, A.; SUTO, T.; HIRASAKA, K.; OHNO, A.; TESHIMA-KONDO, S.; OKUMURA, Y.; OARADA, M.; CHOI, I.; MUKAI, R.; TERAOKA, J.; NIKAWA, T. Soy Glycinin Contains a Functional Inhibitory Sequence against Muscle-Atrophy-Associated Ubiquitin Ligase Cbl-b. **International Journal of Endocrinology**. Vol. 2013. Num. 907565. p. 11. 2013.

ABIAD. **Hábitos de consumo de Suplementos Alimentares no Brasil**. 2015. Acessado em: < <http://ilsibrasil.org/wp-content/uploads/sites/9/2017/06/Dra.-Tatiana-Pires-ABIAD-Suplementos-Alimentares-Apresentação-TP-no-ILSI-12-06-2017.pdf> > 16/10/2017.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION AND DIETITIANS OF CANADA: DIETARY FATTY ACIDS. **Journal of the American Dietetic Association**. Vol. 107. Num. 9. p. 1599.e1-1599.e15. 2007.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. Artmed. 2006.

AOI, W.; TAKANAMI, Y.; KAWAI, Y.; MORIFUJI, M.; KOGA, J.; KANEGAE, M.; MIHARA, K.; YANOHARA, T.; MUKAI, J.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Dietary Whey hydrolysate with exercise alters the plasma protein profile: a comprehensive protein analysis. **Nutrition**. Vol. 27. Num. 6. p. 687-692. 2011.

BACURAU, R.F. **Nutrição e suplementação esportiva**. São Paulo: Phorte. p. 73-91. 2009.

BATISTELA, E.; PEREIRA, M.P.; SIQUEIRA, J.T.; PAULA-GOMES, S.; ZANON, N.M.; OLIVEIRA, E.B.; NAVEGANTES, L.C.C.; KETTELHUT, I.C.; ANDRADE, C.M.B.; KAWASHITA, N.H.; BAVIERA, A.M. Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin–proteasome proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** Vol. 92. Num. [s.n]. p. 445-454. 2014.

BELL, R.A.; AL-KHALAF, M.; MEGENEY, L.A. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. **Skelet Muscle**. Vol. 6. Num. 16. p. [s.p]. 2016.

BODINE, S.C.; BAAR, K. Analysis of skeletal muscle hypertrophy in models of increased loading. **Methods Mol. Biol.** Vol. 798. Num. [s.n]. p. 213-229. 2012.

BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B.A.; POUUEYMIROU, W.T.; PANARO, F.J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z.Q.; VALENZUELA, D.M.; DECHIARA, T.M.; STITT, T.N.;

YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**. Vol. 294. Num. [s.n]. p.1704-1708. 2001.

BRASNUTRI. **Panorama do Setor**. 2016. Acessado em:<
http://www.brasnutri.org.br/arquivos/numeros_setor/2017_atualizado.pdf >
 16/10/2017.

CAPUTO, L.F.G.; GIRITANA, L.B.; MANSO, P.P.A. Técnicas histológicas. In MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Instituto Oswaldo Cruz. p. 89-188. 2010.

CARRILHO, L.H. Benefícios da utilização da proteína do soro de leite Whey protein. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo. Vol. 7. Num. 40. p.195-203. 2013.

CHURCHWARD-VENNE, T. A.; BREEN, L.; DI DONATO, D. M.; HECTOR, A. J.; MITCHELL, C. J.; MOORE, D. R.; STELLINGWERFF, T.; BREUILLE, D.; OFFORD, E. A.; BAKER, S. K.; PHILLIPS, M. S. Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double blind, randomized trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Rockville. Vol. 99. Num. [s.n]. p. 276-286. 2014.

CONCEA. Conselho nacional de controle de experimentação animal: **Resolução normativa nº25 de 29 de setembro de 2015**. Ministério da ciência tecnologia e inovação. 2015.

CRYSTAL, R.G. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. **Science**. Vol. 270. Num 5235. p. 404-410. 1995.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and Proteins. In: FENEMMA, O.R. **Food Chemistry**. 3ª edição. New York: Marcel Dekker Inc. p. 321-430. 1996.

DICKINSON, J. M.; FRY, C. S.; DRUMMOND, M. J.; GUNDERMANN, D. M.; WALKER, D. K.; GLYNN, E. L.; TIMMERMAN, K. L.; DHANANI, S.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B. B. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation is required for the stimulation of human skeletal muscle protein synthesis by essential amino acids. **The Journal of Nutrition**. Rockville. Vol. 141. Num. 5. p. 856-862. 2011.

DONIS-KELLER, H.; GREEN, P.; HELMS, C.; CARTINHO, S.; WEIFFENBACH, B.; STEPHENS, K.; KEITH, T.P.; BOWDEN, D.W.; SMITH, D.R.; LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D.; AKOTS, G.; REDIKER, K.S.; GRAVIUS, T.; BROWN, V.A.; RISING, M.B.; PARKER, C.; POWERS, J.A.; WATT, D.E.; KAUFFMAN, E.R.; BRICKER, A.; PHIPPS, P.; MULLER-KAHLE, H.; FULTON, T.R.; NG, S.; SCHUMM, J.W.; BRAMAN, J.C.; KNOWLTON, R.G.; BARKER, D.F.; CROOKS, S.M.; LINCOLN, S.E.; DALY, M.J.; ABRAHAMSON, J. A genetic linkage map of the human genome. **Cell**. Vol. 51. Num. 2. p. 319-337. 1987.

DRAKE, R.L.; VOGL, W.; MITCHELL, A.W.M. **Gray's, anatomia para estudantes**. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 6. p.467-605. 2005.

DUNFORD, M. **Fundamentos de nutrição no esporte e no exercício**. São Paulo. Manole. 2012.

FARNFIELD, M. M.; CAREY, K. A.; GRAN, P.; TRENERRY, K.; CAMERON-SMITH, D. Whey protein ingestion activates mTOR-dependent signaling after resistance exercise in young men: A double-blinded randomized controlled trial. **Rev. Nutrients**. Vol. 1. Num. 2. p. 263-275. 2009.

FERNANDES, T.; SOCI, U. P. R.; ALVES, C. R.; CARMO, E. C.; BARROS, J. G.; OLIVEIRA, E. M. Determinantes moleculares da hipertrofia do músculo esquelético mediados pelo treinamento físico: estudo de vias de sinalização. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**. Vol. 7. Num. 1. p. 169-188. 2008.

FIGURA 1: Ilustração da proteína MTOR. Acessado em: < <https://cansar.icr.ac.uk/> > em 25/03/2018.

FIGURA 5: Ilustração da proteína MAFBX. Acessado em: < <https://cansar.icr.ac.uk/> > em 25/03/2018.

FIGURA 6: Ilustração da proteína MURF-1. Acessado em: < <https://cansar.icr.ac.uk/> > em 25/03/2018.

FOLETTA, V. C.; WHITE, L. J.; LARSEN, A. E.; LEGER, B.; RUSSELL, A. P. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**. Vol. 461, Num. 3. p. 325-335. 2011.

GOMES, M.D.; LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A.L. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 98. Num. 25. p.14440-14445. 2001.

HARAGUCHI, F.K.; MAGALHAES, C.L.B.; NEVES, L.X.; SANTOS, R.C.; PEDROSA, M.L.; SILVA, M.E. Whey protein modifies gene expression related to protein metabolism affecting muscle weight in resistance-exercised rats. **Nutrition**. Vol. 30. Num. [s.n]. p. 876-881. 2014.

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

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu Rev Biochem**. Vol 67. Num. [s.n]. p. 425-79. 1998.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. Washington, DC: The National Academies Press. 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. Capítulo 10. p. 182-186. 2008.

KARP, G. **Biologia celular e molecular conceitos e experimentos**. São Paulo. Manole. 2005.

KRISSANSEN, G.W. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. **Journal of the American College of Nutrition**. Vol. 26. Num. 6. p. 713S-723S. 2007.

KUANG, S.; GILLESPIE, M.A.; RUDNICKI, M.A. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. **Cell Stem Cell**. Vol. 2. Num. 1. p. 22-31. 2008.

LAMBERTUCCI, A.C.; LAMBERTUCCI, R.H.; HIRABARA, S.M.; CURI, R.; MORISCOT, A.S.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; GUIMARAES-FERREIRA, L.; LEVADA-PIRES, A.C.; VASCONCELOS, D.A.A.; SELLITTI, D.F.; PITHON-CURI, T.C. Glutamine Supplementation Stimulates Protein-Synthetic and Inhibits Protein-Degradative Signaling Pathways in Skeletal Muscle of Diabetic Rats. **PLoS ONE**. Vol. 7. Num. 12. p. e50390. 2012.

LANCHA JUNIOR, A.R.; CAMPOS-FERRAZ, P.L.; ROGERI, P.S. **Suplementação Nutricional no Esporte**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. Capítulo 8. p. 135-166. 2009.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D.M. mtor signaling in growth control and disease. **Cell**. Vol. 149. Num. 2. p. 274-293. 2012.

LEARY, S.; UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R.; CARTNER, S.; COREY, D.; GRANDIN, T.; GREENACRE, C.; GWALTNEY-BRANT, S.; MCCRACKIN, M.A.; MEYER, R.; MILLER, D.; SHEARER, J.; YANONG, R. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. **American Veterinary Medical Association**. Version 2013.

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Nutr**. Vol. 129. Num. (1S Suppl). p. 227S-37S. 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4ª edição. São Paulo. Sarvier. Capítulo 5. p. 89. 2006.

LOMONOSOVA, Y.N.; SHENKMAN, B.S.; KALAMKAROV, G.R.; KOSTROMINOVA, T.Y.; NEMIROVSKAYA, T.L. L-arginine Supplementation Protects Exercise Performance and Structural Integrity of Muscle Fibers after a

Single Bout of Eccentric Exercise in Rats. **PLoS ONE**. Vol. 9. Num. 4. p. e94448. 2014.

LOMONOSOVA, Y.N.; KALAMKAROV, G.R.; BUGROVA, A.E.; SHEVCHENKO, T.F.; KARTASHKINA, N.L.; LYSENKO, E.A.; SHVETS, V.I.; NEMIROVSKAYA, T.L. Protective Effect of L_Arginine Administration on Proteins of Unloaded m. soleus. **Biochemistry**. Vol. 76. Num. 5. p. 571-580. 2011.

LUO, J. Q.; CHEN, D. W.; YU, B. Upregulation of amino acid transporter expression. induced by L-leucine availability in L6 myotubes is associated with ATF4 signaling through mTORC1-dependent mechanism. **Nutrition**. Vol. 29. Num. 1. p. 284-90. 2013.

LUO, J.; CHEN, D.; YU, B. Effects of different dietary protein sources on expression of genes related to protein metabolism in growing rats. **British Journal of Nutrition**. Vol. 104. Num. 10. p. 1421-1428. 2010.

MALLINSON, J. E.; MURTON, A. J. Mechanisms responsible for disuse muscle atrophy: potential role of protein provision and exercise as countermeasures. **Nutrition**. Vol. 29. Num. 1. p. 22-28. 2013.

MCLVER, C.M.; WYCHERLEY, T.P.; CLIFTON, P.M. MTOR signaling and ubiquitin-proteasome gene expression in the preservation of fat free mass following high protein, calorie restricted weight loss. **Nutrition & Metabolism**. Vol. 9. Num. 83. p. [s.p]. 2012.

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

MILLER, P. E.; ALEXANDER, D. D.; PEREZ, V. Effects of Whey protein and resistance exercise on body composition: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Rockville. Vol. 33. Num. 2. p. 163-175. 2014.

MOBLEY, C.B.; HORNBERGER, T.A.; FOX, C.D.; HEALY, J.C.; FERGUSON, B.S.; LOWERY, R.P.; MCNALLY, R.M.; LOCKWOOD, C.M.; STOUT, J.R.; KAVAZIS, A.N.; WILSON, J.M.; ROBERTS, M.D. Effects of oral phosphatidic acid feeding with or without Whey protein on muscle protein synthesis and anabolic signaling in rodent skeletal muscle. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. Vol. 12. Num. 32. p. [s.p]. 2015.

MOBLEY, C.B.; FOX, C.D.; FERGUSON, B.S.; PASCOE, C.A.; HEALY, J.C.; McADAM, J.S.; LOCKWOOD, C.M.; ROBERTS, M.D. Effects of protein type and composition on postprandial markers of skeletal muscle anabolism, adipose tissue lipolysis, and hypothalamic gene expression. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. Vol. 12. Num. 14. p. [s.p]. 2015.

MOORE, D. R.; ROBINSON, M. J.; FRY, J. L.; TANG, J. E.; GLOVER, E. I.; WILKINSON, S. B.; PRIOR, T.; TARNOPOLSKY, M. A.; PHILLIPS, M. S. Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Rockville. Vol. 89. Num. 1. p. 161-168. 2009.

NORTON, L. E.; WILSON, G. J.; LAYMAN, D. K.; MOULTON, C. J.; GARLICK, P. J. Leucine content of dietary Proteins is a determinant of postprandial skeletal muscle protein synthesis in adult rats. **Nutrition & Metabolism**. Londres. Vol. 9. Num. 1. p. 67. 2012.

NEVES, S. M. P. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ**. São Paulo: FCF-IQ/USP. 216 p. 2013.

PAL, S.; RADAVELLI-BAGATINI, S. The effects of Whey protein on cardiometabolic risk factors. **Obesity Reviews**. Vol. 14. Num. 4. p. 324-343. 2013.

PAULSEN, F.; WASCHKE, J. **Sobotta - Livroto - Atlas de Anatomia Humana: Quadros de Músculos, Articulações e Nervos**. Guanabara Koogan. Capítulo 49. p. 63. 2012.

RAMOS, P.C. A via proteolítica dependente de ubiquitina/proteassoma. **BSQP**. Vol. 2. Num. 96. p. [s.p]. 2005.

ROM, O.; REZNICK, A.Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MURF-1 and MAFBx in loss of skeletal muscle mass. **Free Radical Biology and medicine**. Vol. 98. Num. [s.n]. p. 218-230. 2016.

SBCAL/COBEA. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório, 2012. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>.

SUN, X.; ZEMEL, M. B. Leucine modulation of mitochondrial mass and oxygen consumption in skeletal muscle cells and adipocytes. **Nutrition & Metabolism**. Vol. 6. Num. 26. p. 8p. 2009.

TERADA, L. C.; GODOI, M. R.; SILVA, T. C. V.; MONTEIRO, T. L. Efeitos metabólicos da suplementação do Whey Proteins em praticantes de exercícios com peso. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo. Vol. 3. Num. 16. p. 295-304. 2009.

VILLANUEVA, M. G.; HE, J.; SCHROEDER, E. T. Periodized resistance training with and without supplementation improve body composition and performance in older men. **Eur. Journal Appl. Physiology**. Vol. 114. Num. 5. p. 891-905. 2014.

VOLPI, E.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M.; MITTENDORFER, B.; WOLFE, R. R. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. **The**

American Journal of Clinical Nutrition. Rockville. Vol. 78. Num. 2. p. 250-258. 2003.

WITARD, O. C.; JACKMAN, S. R.; BREEN, L.; SMITH, K.; SELBY, A.; TIPTON, K. D. Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of Whey protein at rest and after resistance exercise. **The American Journal of Clinical Nutrition.** Rockville. Vol. 99. Num. 1. p. 86-95. 2014.

XIA, Z.; CHOLEWA, J.; ZHAO, Y.; YANG, Y. Q.; SHANG, H. Y.; GUIMARÃES-FERREIRA, L.; NAIMO, M. A.; SU, Q. S, ZANCHI, N. E. Hypertrophy-Promoting Effects of Leucine Supplementation and Moderate Intensity Aerobic Exercise in Pre-Senescent Mice. **Nutrients.** Basel. Vol. 2. Num. 8. p. 246. 2016.

YANG, Y.; BREEN, L.; BURD, N. A.; HECTOR, A. J.; CHURCHWARD-VENNE, T. A.; JOSSE, A. R.; TARNOPOLSKY, M. A.; PHILLIPS, S. M. Resistance exercise enhances myofibrillar protein synthesis with graded intakes of Whey protein in older men. **British Journal of Nutrition.** Cambridge. Vol. 108. Num. 10. p. 1780-1788. 2012.

ZAMBÃO, J. E.; ROCCO, C. S.; HEYDE, M. E. D. V. D. Relação entre a suplementação de proteína do soro do leite e hipertrofia muscular: uma revisão. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva.** São Paulo. Vol. 9. Num. 50. p.179-192. 2015.

10 ANEXOS

Anexo I - Parecer Consubstanciado Inicial de Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA.

Anexo II – Laudos de Comprovação de qualidade do H.I. Whey Protein



ALLERGEN & SENSITIZER INFORMATION AND SURVEY FORM

Date: January 11, 2009

Manufacturer's Name: Glanbia Foods, Inc.

Ingredient Name: Provon 292

Does the ingredient contain any of the following allergenic or sensitizing components, even if minor or trace amounts, such as incidental additives or process aids? Indicate even if components are found in the ingredient listing. If this ingredient is produced on shared equipment with other allergens or sensitizes, please indicate.

Allergen Food Source or it's Derivatives	Does this ingredient Contain any Foods Listed in Column 1	Provide the Specific Source	Is this Ingredient Produced on Shared Equipment With other Pds. Containing Foods From Column 1
Peanuts	NO		NO
Peanut Oil	NO		NO
Dairy/Milk	YES	Bovine	NO
Egg	NO		NO
Fish	NO		NO
Shellfish	NO		NO
Soy	YES	Lecithin	NO
Wheat	NO		NO
Almonds	NO		NO
Almond Oil	NO		NO
Brazil Nuts	NO		NO
Cashews	NO		NO
Hazelnuts	NO		NO
Macadamia Nuts	NO		NO
Pecans	NO		NO
Pine nuts	NO		NO
Pistachios	NO		NO
Walnuts	NO		NO
Other Tree Nuts	NO		NO
Other Tree Nut Oils	NO		NO
Sesame Seeds	NO		NO
Wheat Gluten	NO		NO
Rye Gluten	NO		NO
Oat Gluten	NO		NO
Barley Gluten	NO		NO
Sulfites	NO		NO
Tartrazine	NO		NO



ALLERGEN & SENSITIZER INFORMATION AND SURVEY FORM

Date: January 6, 2010

Manufacturer's Name: Glanbia Foods, Inc.

Ingredient Name: Thermax 690

Does the ingredient contain any of the following allergenic or sensitizing components, even if minor or trace amounts, such as incidental additives or process aids? Indicate even if components are found in the ingredient listing. If this ingredient is produced on shared equipment with other allergens or sensitizes, please indicate.

Allergen Food Source or it's Derivatives	Does this ingredient Contain any Foods Listed in Column 1	Provide the Specific Source	Is this Ingredient Produced on Shared Equipment With other Pds. Containing Foods From Column 1
Peanuts	NO		NO
Peanut Oil	NO		NO
Dairy/Milk	YES	Bovine	NO
Egg	NO		NO
Fish	NO		NO
Shellfish	NO		NO
Soy	NO		NO
Wheat	NO		NO
Almonds	NO		NO
Almond Oil	NO		NO
Brazil Nuts	NO		NO
Cashews	NO		NO
Hazelnuts	NO		NO
Macadamia Nuts	NO		NO
Pecans	NO		NO
Pine nuts	NO		NO
Pistachios	NO		NO
Walnuts	NO		NO
Other Tree Nuts	NO		NO
Other Tree Nut Oils	NO		NO
Sesame Seeds	NO		NO
Wheat Gluten	NO		NO
Rye Gluten	NO		NO
Oat Gluten	NO		NO
Barley Gluten	NO		NO
Sulfites	NO		NO
Tartrazine	NO		NO



Glanbia Foods Inc.
121 4th Ave. S.
Twin Falls, ID 83301
Phone 208-733-7555
Fax 208-733-9222

January 1, 2016

Anti-Doping Compliance

In regards to the following lists:

- Annex A of NSF306-Certification Guideline for Athletic Banned Substances
- NFL/NFLPA Banned Substances List
- World Anti-Doping Agency ("WADA") 2016 Prohibited List

None of the substances listed by these codes are added to any of Glanbia's products. Whey products may contain trace amounts of naturally-occurring hormones and growth factors, but no attempt is made on the part of the manufacturer to add such compounds to the products or to concentrate existing compounds within the products.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Brad Slater", with a long horizontal flourish extending to the right.

Brad Slater
Director of Quality
Glanbia Foods Inc.



To whom it may concern:

January 5, 2016

Drug residue testing and farm surveillance for these substances is regulated by the Center for Veterinary Medicine (CVM) of the Food and Drug Administration. CVM regulates the manufacture and the distribution of additives and drugs given to animals. These include food additives and drugs for pets. CVM is responsible for regulating drugs, devices, and food additives given to, or used on, pets, farm animals, poultry, cattle, swine, chickens, turkeys, horses, dogs, and cats.

Appendix N of the Pasteurized Milk Ordinance defines the drug residue testing and farm surveillance program for milk in the United States. Industry shall screen all bulk milk pickup tankers for beta-lactam drug residues. Additionally, FDA screens for other drug residues, employing a random sampling program on bulk milk pickup tankers. The random bulk milk pickup tanker sampling program shall represent and include, during any consecutive six months at least 4 samples collected in at least 4 months. These samples are tested by an FDA laboratory. Bulk milk testing shall be completed prior to processing.

“Safe levels” are used by FDA as guides for prosecutorial discretion. They do not legalize residue found in milk that are below the safe level. “Safe levels” are not and cannot be transformed into tolerances.

Southwest Cheese Company evaluates incoming milk supplies in accordance to Appendix N of the Pasteurized Milk Ordinance. The following routine drug residues are tested for and included is the “safe level” that corresponds to the drug.

Penicillin G	5 ppb
Amoxicillin	10 ppb
Ampicillin	10 ppb
Ceftiofur	50 ppb
Cephapirin	20 ppb
Cloxacillin	10 ppb



The amphenicol chloroamphenicol family of antibiotics includes such drugs as chloroamphenicol, florfenicol, and thiamphenicol. Chloroamphenicol has been banned for use in food producing animals. Tolerance and/or safe levels have a zero tolerance criteria.

The aminoglycosides antibiotic family includes streptomycin, gentamycin, neomycin, kanamycin, and others. Extra-label drug use must include a sufficiently extended withdrawal period so that no residues are found in meat and/or milk. Dairy Producers using aminoglycosides and veterinarians prescribing the use

of aminoglycosides will be in indefensible position should residues be found. Zero tolerance levels are inferred by regulation.

The macrolide family of antibiotic includes the well known drugs erythromycin, pirlimycin, lincomycin, tylosin, spiramycin and tilmicisin.

Spectinomycin is an antibiotic that functions as a bacteriostatic compound through the inhibition of protein synthesis in bacteria.

The Food and Drug Administration has amended tolerance levels for the combination of oxytetracycline, chlorotetracycline, and tetracycline residues in milk. The Center for Veterinarian Medicine has reevaluated toxicity and metabolism data used to establish oxytetracycline tolerance levels. The previous accepted safe levels for oxytetracycline, chlorotetracycline, and tetracycline in milk were 30 ppb, 30 ppb, and 80 ppb, respectively for a sum of 140 ppb. The new combined tolerance level is 300 ppb. There are no approved FDA-approved rapid screening tests for tetracycline in raw co-mingled milk.

“Safe levels” for sulfamethazine and sulfadimethoxine are stated as 10 ppb.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is positioned above a horizontal line.

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company



January 5, 2016

Anti-Doping Compliance

In regards to the following lists:

- Annex A of NSF306-Certification Guideline for Athletic Banned Substances
- NFL/NFLA Banned Substances List
- World Anti-Doping Agency ("WADA") 2012 Prohibited List

None of the substances listed by these codes are added to any of Southwest Cheese's products. Whely products may contain trace amounts of naturally-occurring hormones and growth factors, but no attempt is made on the part of the manufacturer to add such compounds to the products or to concentrate existing compounds within the products.

Regards,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is written over a horizontal line.

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company



Glanbia Foods Inc.
121 4th Ave. S.
Twin Falls, ID 83301
Phone 208-733-7555
Fax 208-733-9222

January 1, 2016

Bovine Spongiform Encephalopathy

To whom it may concern,

This is to certify that Dairy Products manufactured by Glanbia Foods Inc.

1. Are derived solely from fresh cow's milk.
2. The milk from which the product has been prepared has been heat treated at a minimum temperature of 75 C for a period of at least 15 seconds.
3. That Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) has never been detected in milk and there is not any scientific doubt about the absence of BSE in milk and therefore the mentioned product is regarded to be free from BSE and in this respect completely safe for human consumption.
4. The product has been prepared from milk originating from cows being under sanitary control of the State of Idaho, United States Department of Agriculture, and the Federal Food and Drug Administration.

Sincerely

Mary Pierson
Director of Quality Assurance
Glanbia Foods Inc.



Southwest Cheese Co., LLC
P. O. Box 1509
1141 Curry Road 4
Clovis, NM 88101
Tel: 575.742.9200
Fax: 575.769.1494

BSE CERTIFICATE

This is to certify that the milk sourced in the making of cheese and whey products from the Southwest Cheese Company:

1. Is derived solely from fresh cow's milk
2. The milk from which the product has been prepared has been heat treated at a minimum temperature of 161°F for a period of at least 15 seconds.
3. That Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) has never been detected in milk and there is not any scientific doubt about the absence of BSE in milk and therefore the mentioned product is regarded to be free from BSE and in this respect completely safe for human consumption.
4. The product has been prepared from milk originating from cows being under sanitary control of the State of New Mexico, United States Department of Agriculture, and the Federal Food and Drug Administration.
5. The US prohibits the feeding of meat and bone meal or other feeds which may have ruminant proteins (except for dairy proteins) to ruminant animals. This regulation is effectively enforced.

Regards,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is written over a horizontal line.

Signature of Authorized Representative
Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company

Date: January 5, 2016



Glanbia Foods Inc.
121 4th Ave. S.
Twin Falls, ID 83301
Phone 208-733-7555
Fax 208-733-9222

January 1, 2015

Certificate of Heavy Metal

Glanbia Foods, Inc. certifies that Thermax 690 produced at its manufacturing facilities meet the general Codex monograph specifications for heavy metals in whey products of less than 5 mg/kg (Pb) and lead and Arsenic not more than 0.5 mg/kg. Analytical results for Thermax 690 in this past year indicate

Heavy metal	Result	Method
Arsenic	<0.02 ppm	SM3113D
Lead	<0.01 ppm	SM3113B
Mercury	<0.01 ppm	SM3112D
Chromium	<0.02 ppm	SM3113B
Copper	<0.7 ppm	AOAC969.23
Selenium	< 0.7 ppm	AOAC969.23
Silver	< 0.01 ppm	AOAC 969.23
Cadmium	< 0.01 ppm	SM3113B

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Wyatt Bordewyk", written over a light blue horizontal line.

Wyatt Bordewyk
Contract Manufacture Quality Assurance Manager
Glanbia Nutritionals, Inc.

Glanbia Nutritionals
121 4th Avenue South
Twin Falls, ID 83301
PH: (208) 733-7555
FX: (208) 733-9222



July 6, 2016

Aflatoxin Testing

Glanbia Nutritionals is committed to producing safe and wholesome foods and food ingredients. To ensure that only safe foods are produced, Glanbia Nutritionals has implemented an extensive quality assurance program. Part of the quality assurance program includes testing for aflatoxin, yeast, and mold.

The products made by Glanbia Nutritionals are tested regularly for the presence of aflatoxin. As aflatoxins are produced by molds, Glanbia Nutritionals tests every lot for yeast and mold. If a product fails to meet internal specifications for Y&M it will not be sold as premium grade product.

Glanbia Nutritionals' quality assurance programs ensure our products are safe and are produced using good manufacturing practices. Our goal is to continue to deliver the safest and highest quality products possible.

Regards,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Brad Slater', is written over a horizontal line.

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company

5500 Nobel Dr Suite 250,
Fitchburg, WI 53711
USA

TF: 800 336 2183
PH: 608 316 8500
FX: 608 316 8504
www.glanbianutritionals.com



7. All domestic and foreign facilities that were engaged in the manufacture, processing, packing, or holding of each and every such article (excluding only "food contact materials" as defined) are registered with the U.S. Food and Drug Administration as required by the Public Health Security and Bioterrorism Preparedness and Response Act of 2002 and regulations promulgated thereunder (the "Bioterrorism Act"). Seller will comply with all the recordkeeping requirements of the Bioterrorism Act applicable to "non-Transporters" with respect to the Product;
8. Produced and sold in compliance with the U.S. Fair Labor Standards Act of 1938, as amended, and rules, regulations and orders of the administrator of the Wage and Hour Division issued under Section 14 thereof;

This is a continuing guarantee and this guarantee supersedes and revokes all previous continuing guarantees provided by Seller to Buyer for the Product.

GMO Status

The above-mentioned product is negative when tested for the presence of genetic modification markers via DNA extraction and PCR reactions. Currently, the limit of detection is <0.1%.

Gluten

The above-mentioned product does not contain any type of gluten, nor is it produced in a facility that handles any type of gluten products.

Kosher

The above-mentioned product is suitable for Kosher diet and is certified Kosher.

Halal

The above-mentioned product contains less than 0.5% of ethyl alcohol, does not contain pork or any other animal derived products (beyond dairy), and is suitable for Halal diet. It is Halal certified.

EU Certificate of Conformance

The above-mentioned product is produced from raw milk meeting the somatic cell count (400,000 per mL) and bacterial standard plate count (100,000 per mL) requirements of the European Commission Council Directive 853/2004 Annex III, Section IX, Chapter I, III Criteria for Raw Milk.

FDA-Issued EU Approval Number for Primary Manufacturing Facility: 2116263

Vegetarian / Vegan

The above-mentioned product is suitable for vegetarians. It is not suitable for vegans.

Allergen Statement



Glanbia Nutritionals, Inc
5500 Nobel Dr, Suite 250
Fitchburg, WI 53711
USA

TF: 800 336 2183
PH: 608 316 8500
FX: 608 316 8504

GMO Statement

To Whom It May Concern:

This is to certify that Thermax 690 manufactured by Glanbia Nutritionals, Inc. is negative when tested for the presence of genetic markers by DNA extractions and PCR reactions at detection limits of 0.1%

Sincerely,

Dated: February 4, 2016

A handwritten signature in blue ink that reads "Zach Lloyd".

Zach Lloyd
Compliance Quality Manager
Glanbia Nutritionals, Inc.



Southwest Cheese Co., LLC
P. O. Box 1509
1141 Curry Road 4
Clovis, NM 88101
Tel: 575.742.9200
Fax: 575.769.1494

GMP STATEMENT

We certify that the Southwest Cheese Company follows GMP (Good Manufacturing Practices) standards for food product processing and according to regulations established by the United States Food and Drug Administration for all food products to be sold for human consumption within the State of New Mexico, inter-states and/or to be exported from the United States of America.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater".

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company

Date: January 5, 2016



Southwest Cheese Co., LLC
P. O. Box 1509
1141 Curry Road 4
Clovis, NM 88101
Tel: 575.742.9200
Fax: 575.769.1494

Dated: January 5, 2016

HACCP Certificate

Southwest Cheese Company follows a documented Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) plan based on International Dairy Foods Association's recommendations. Southwest Cheese Company carries the strong belief HACCP is not a stand-alone system and that prerequisite programs must be in place to ensure an effective HACCP plan. The HACCP program follows the seven principles of HACCP as defined by the Codex Guidelines.

Principle 1: Hazard Analysis.

Principle 2: Determine Critical Control Point(s) CCP's.

Principle 3: Establish critical limit(s).

Principle 4: Establish monitoring frequencies.

Principle 5: Establish the corrective action.

Principle 6: Establish verification.

Principle 7: Establish documentation.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is written over a horizontal line.

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company



THE ISLAMIC FOOD AND NUTRITION COUNCIL OF AMERICA
المجلس الإسلامي الأمريكي للغذاء و التغذية

IFANCA HALAL PRODUCT CERTIFICATE

SOUTHWEST CHEESE COMPANY

1141 Curry County Road #4
Clovis, New Mexico 88101 USA

Document No.: **SOU.4272. 12903. 170019. US**

Date: March 15, 2017

To Whom It May Concern:

This is to certify that **SOUTHWEST CHEESE COMPANY** produces **Halal** products under the supervision of the Islamic Food and Nutrition Council of America (IFANCA) at the following location:

Clovis, New Mexico 88101 USA
USDA Plant: 35-0520

The following products are certified to be **Halal**. The company may use the **Crescent-M Halal** logo.

CHEESE (40# & 640#)

- Colored Cheddar
- White Cheddar
- Colby
- Colby Jack
- Monterey Jack
- Asadero
- Pepper Jack
- Mozzarella
- Muenster
- Gouda
- Queso
- Egmont

WHEY POWDER

- Provon 192 – WPI
- Provon 292 – Instantized WPI
- Provon 392 – Agglomerated WPI
- Avonlac 170
- Avonlac 180
- Avonlac 182 – 80% WPC
- Avonlac 282 – Instantized 80% WPC
- Avonlac 382 – Agglomerated 80% WPC
- Thermax 70
- Thermax 72
- Thermax 82
- Optisol 1001
- Optisol 1002
- Optisol 1290

OTHER ITEMS

- Whey Cream
- Sweet Cream
- Whey Permeate

This certificate is valid until **April 30, 2018** and subject to renewal at that time.


Muhammad Munir Chaudry, Ph.D.
President





المجلس الإسلامي الأمريكي للغذاء و التغذية

THE ISLAMIC FOOD AND NUTRITION COUNCIL OF AMERICA

IFANCA HALAL PRODUCT CERTIFICATE شهادة حلال

This is to certify that the following product(s) have been produced under the supervision of the Islamic Food and Nutrition Council of America (IFANCA®). The production facility as well as component ingredients have been reviewed and approved. The product(s) are in compliance with the halal requirements under Islamic laws.

Date: **March 14, 2017**

Document #: **1354.3460.II170028**

Company Name & Address: **Glanbia Nutritionals Inc. 5500 Nobel drive, Suite 250, Fitchburg, Wisconsin 53711 USA**
Plant Name & Address: **Mullins Whey Inc. 598 Seagull Drive, Mosinee, Wisconsin 54455 USA**
Plant USDA: **55-1854**

Product Name	Product Code	Halal-ID	Product Certificate #
1. Avonlac 182	-	B33210	HC-16GL4D50
2. Avonlac 260	-	B15552	HC-16GLJV02
3. Avonlac 282	-	A51844	HC-16GLOY47
4. Avonlac 382	-	B57614	HC-16GLJ923
5. Provon 192	1069906	B25720	HC-16GL8G16
6. Provon 290 IF	-	A95234	HC-16GLWA46
7. Provon 290 Improved Flavour	-	A93916	HC-16GLC437
8. Provon 292	-	A17535	HC-16GLN102

Muhammad Munir Chaudry
Muhammad Munir Chaudry, Ph.D.
President



This certificate is valid until **March 31, 2018** and subject to renewal at that time.

Page 1 of 1





Southwest Cheese Co., LLC
P. O. Box 1509
1141 Curry Road 4
Clovis, NM 88101
Tel: 575.742.9200
Fax: 575.769.1494

Halal Statement

To whom it may concern:

Southwest Cheese Company, LLC products are free of alcohol and swine products, and are certified as Halal under the supervision of the Islamic Food and Nutrition Council of America (IFANCA).

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is written over a horizontal line.

January 5, 2016

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company



Southwest Cheese Co., LLC
P. O. Box 1509
1141 Curry Road 4
Clovis, NM 88101
Tel: 575.742.9200
Fax: 575.769.1494

Certificate of Guarantee-Heavy Metals Provon 292

Such product is not adulterated or misbranded within the meaning of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. Such product is not an article, which may not, under the provisions of Sections 404 and 505 of said Federal Act, be introduced into interstate commerce, and is not adulterated or misbranded within the laws or ordinances to which the article is shipped.

Southwest Cheese further guarantees that our Provon 292 is tested annually continually testing at levels of:

- Arsenic ≤ 0.5 ppm
- Cadmium ≤ 0.5 ppm
- Lead ≤ 0.5 ppm
- Mercury ≤ 0.5 ppm

Sincerely,

January 6, 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is written over a horizontal line.

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company



Glanbia Foods, Inc.
121 4th Ave. S.
Twin Falls, Idaho 83301
Phone: 208-733-7555
Fax: 208-733-9222

January 1, 2016

Certificate of Irradiation

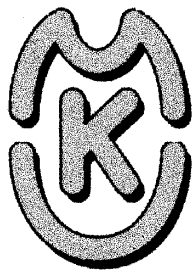
To whom it may Concern:

Glanbia Foods, Inc. does not use irradiation or any source of ionizing radiation to extend shelf-life or control microbial spoilage on any food products manufactured at its locations. This guarantee is extended to all products manufactured at our Richfield, Idaho, Twin Falls, Idaho, and Gooding, Idaho locations.

Sincerely

A handwritten signature in black ink that reads "Mary Pierson". The signature is written in a cursive, flowing style.

Mary Pierson
Director of Quality Assurance
Glanbia Foods Inc.



UMKosher

United Mehadrin Kosher
 1001 Prior Ave. S. • St. Paul, MN. 55116
 Phone: (651) 698-8300 • Fax: (651) 690-1144
 E-mail: rabbiz@umkosher.com

December 1, 2016

To Whom It May Concern:

This is to certify that the following food items produced, by SOUTHWEST CHEESE COMPANY in CLOVIS, NEW MEXICO, Plant Number 35-05-20, is produced under the Kashrut supervision and endorsement of the UMK (United Mehadrin Kosher), and accordingly is KOSHER.

Product	Status	Restriction
Avonlac 170	Dairy	UMK-D
Avonlac 180	Dairy	UMK-D
Avonlac 182	Dairy	UMK-D
Avonlac 282	Dairy	UMK-D
Optisol 1002	Dairy	UMK-D
Optisol 1290	Dairy	UMK-D
Optisol 1001	Dairy	UMK-D
Permeate	Dairy	UMK-D
Provon 192	Dairy	UMK-D
Provon 292	Dairy	UMK-D
Provon 392	Dairy	UMK-D
Thermax 70	Dairy	UMK-D
Thermax 72	Dairy	UMK-D
Thermax 82	Dairy	UMK-D
Sweet Cream	Dairy	UMK-D
Whey	Dairy	UMK-D
Whey Cream	Dairy	UMK-D

This certificate is valid through November 30, 2017 and is subject to renewal at that time.

Sincerely

UNITED MEHADRIK KOSHER

Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Administrator

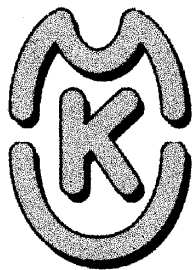
Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Director

Dairy - when bearing the UMK symbol must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 UMK - acceptable only when bearing the UMK symbol, or the letters UMK. If it is a dairy product it must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 Rabbi's stamp - acceptable only when the package bears the stamp of UMKosher.
 Lot L.O.C. - acceptable only with a Letter of Certification for the specific lot number.

Southwest Cheese Company

Valid through 11/30/2017

Page 1 of 1



UMKosher

United Mehadrin Kosher
 1001 Prior Ave. S. • St. Paul, MN. 55116
 Phone: (651) 698-8300 • Fax: (651) 690-1144
 E-mail: rabbiz@umkosher.com

March 1, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that the following food items manufactured by GLANBIA FOODS Inc. of TWIN FALLS, IDAHO, in GOODING, IDAHO, at USDA PLANT # 16-61 are under the Kashrut supervision and endorsement of UMKosher (United Mehadrin Kosher) and accordingly are KOSHER.

Bulk transport requires separate kosher certification.

Product	Status	Restriction
Avonlac 134	Dairy	UMK-D
Avonlac 134G	Dairy	UMK-D
Bioferrin 1000	Dairy	UMK-D
Bioferrin 2000	Dairy	UMK-D
Bioferrin 3000	Dairy	UMK-D
Bioferrin 4000	Dairy	UMK-D
Bioferrin 5000	Dairy	UMK-D
Co-Isolate	Dairy	UMK-D
Lactose	Dairy	UMK-D
Rejuverrin	Dairy	UMK-D
Thermax	Dairy	UMK-D
Whey Cream	Dairy	UMK-D
Whey Factor Isolate	Dairy	UMK-D
Whey Protein Isolate	Dairy	UMK-D
Whey Protein NXP	Dairy	UMK-D

This certificate is valid through February 28, 2018 and is subject to renewal at that time.

Sincerely

UNITED MEHADRIN KOSHER

Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Administrator

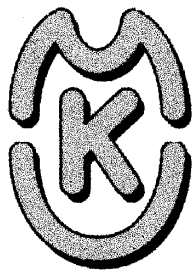
Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Director

Dairy - when bearing the UMK symbol must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 UMK - acceptable only when bearing the UMK symbol, or the letters UMK. If it is a dairy product it must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 Rabbi's stamp - acceptable only when the package bears the stamp of UMKosher.
 Lot L.O.C. - acceptable only with a Letter of Certification for the specific lot number.

Glanbia Foods Inc.

Valid through 02/28/2018

Page 1 of 1



UMKosher

United Mehadrin Kosher
 1001 Prior Ave. S. • St. Paul, MN. 55116
 Phone: (651) 698-8300 • Fax: (651) 690-1144
 E-mail: rabbiz@umkosher.com

March 1, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that the following food items manufactured for GLANBIA FOODS Inc. of TWIN FALLS, IDAHO, at Plant No. 55-1854 are under the Kashrut supervision and endorsement of UMKosher (United Mehadrin Kosher) and accordingly are KOSHER.

Product	Status	Restriction
Provon 192	Dairy	UMK-D
Provon 292	Dairy	UMK-D
Provon 290 IF	Dairy	UMK-D

This certificate is valid through February 28, 2018 and is subject to renewal at that time.

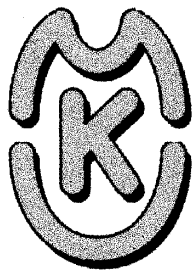
Sincerely

UNITED MEHADRIN KOSHER

Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Administrator

Rabbi Asher Zeilingold
Executive Director

Dairy - when bearing the UMK symbol must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 UMK - acceptable only when bearing the UMK symbol, or the letters UMK. If it is a dairy product it must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 Rabbi's stamp - acceptable only when the package bears the stamp of UMKosher.
 Lot L.O.C. - acceptable only with a Letter of Certification for the specific lot number.



UMKosher

United Mehadrin Kosher
 1001 Prior Ave. S. • St. Paul, MN. 55116
 Phone: (651) 698-8300 • Fax: (651) 690-1144
 E-mail: rabbiz@umkosher.com

March 1, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that the following food items manufactured by GLANBIA FOODS Inc. of TWIN FALLS, IDAHO, in RICHFIELD, IDAHO, at USDA PLANT # 16-60 are under the Kashrut supervision and endorsement of UMKosher (United Mehadrin Kosher) and accordingly are KOSHER.

Product	Status	Restriction
Actinos G2	Dairy	UMK-D
Alpha Lactalbumin	Dairy	UMK-D
Avonlac 170	Dairy	UMK-D
Avonlac 180	Dairy	UMK-D
Avonlac 185	Dairy	UMK-D
Barflex 171	Dairy	UMK-D
Barflex 181	Dairy	UMK-D
BarFlex 185	Dairy	UMK-D
BarFlex 188	Dairy	UMK-D
BevFlex 191	Dairy	UMK-D
BevWise A-100W	Dairy	UMK-D
BevWise I-300W	Dairy	UMK-D
CAPOLAC MM-0525 BGU	Dairy	UMK-D
CFM Nitro P	Dairy	UMK-D
CVH 15	Dairy	UMK-D
CVH 47	Dairy	UMK-D
GelWise 100W	Dairy	UMK-D

This certificate is valid through February 28, 2018 and is subject to renewal at that time.

Sincerely

UNITED MEHADRIK KOSHER

Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Administrator

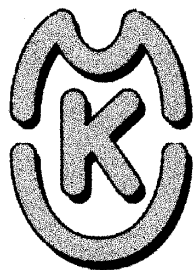
Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Director

Dairy - when bearing the UMK symbol must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 UMK - acceptable only when bearing the UMK symbol, or the letters UMK. If it is a dairy product it must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.
 Rabbi's stamp - acceptable only when the package bears the stamp of UMKosher.
 Lot L.O.C. - acceptable only with a Letter of Certification for the specific lot number.

Glanbia Foods Inc.

Valid through 02/28/2018

Page 1 of 4



UMKosher

United Mehadrin Kosher
 1001 Prior Ave. S. • St. Paul, MN. 55116
 Phone: (651) 698-8300 • Fax: (651) 690-1144
 E-mail: rabbiz@umkosher.com

March 1, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that the following food items manufactured by GLANBIA FOODS Inc. of TWIN FALLS, IDAHO, in RICHFIELD, IDAHO, at USDA PLANT # 16-60 are under the Kashrut supervision and endorsement of UMKosher (United Mehadrin Kosher) and accordingly are KOSHER.

Product	Status	Restriction
GelPro 30	Dairy	UMK-D
NOP-47	Dairy	UMK-D
Micellar Whey	Dairy	UMK-D
Optisol 1000	Dairy	UMK-D
Optisol 1200	Dairy	UMK-D
PepForm Arginine	Dairy	UMK-D
PepForm A-Tryptophan	Dairy	UMK-D
PepForm A-Fatigue Fighter	Dairy	UMK-D
PepForm A BCAA 2-1-1	Dairy	UMK-D
PepForm BCAA 2-1-1	Dairy	UMK-D
PepForm Carnitine	Dairy	UMK-D
PepForm Citrulline	Dairy	UMK-D
PepForm Creatine	Dairy	UMK-D
PepForm Glutamine	Dairy	UMK-D
PepForm Leucine	Dairy	UMK-D
PepForm Micellar Leucine	Dairy	UMK-D
PepForm Tryptophan	Dairy	UMK-D
PhytoForce Fenugreek	Dairy	UMK-D

This certificate is valid through February 28, 2018 and is subject to renewal at that time.

Sincerely

UNITED MEHADRIN KOSHER

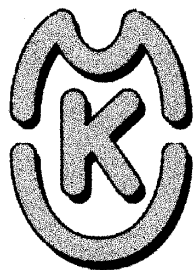
Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Administrator

Dairy - when bearing the UMK symbol must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.

UMK - acceptable only when bearing the UMK symbol, or the letters UMK. If it is a dairy product it must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.

Rabbi's stamp - acceptable only when the package bears the stamp of UMKosher.

Lot L.O.C. - acceptable only with a Letter of Certification for the specific lot number.



UMKosher

United Mehadrin Kosher
 1001 Prior Ave. S. • St. Paul, MN. 55116
 Phone: (651) 698-8300 • Fax: (651) 690-1144
 E-mail: rabbiz@umkosher.com

March 1, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that the following food items manufactured by GLANBIA FOODS Inc. of TWIN FALLS, IDAHO, in RICHFIELD, IDAHO, at USDA PLANT # 16-60 are under the Kashrut supervision and endorsement of UMKosher (United Mehadrin Kosher) and accordingly are KOSHER.

Product	Status	Restriction
PhytoForce Tongkat Ali	Dairy	UMK-D
Provon 190	Dairy	UMK-D
Provon 190 HS	Dairy	UMK-D
Provon 195	Dairy	UMK-D
Provon 690	Dairy	UMK-D
Provon 990	Dairy	UMK-D
Salibra 700	Dairy	UMK-D
Salibra 800	Dairy	UMK-D
Salibra 850	Dairy	UMK-D
Salibra NT	Dairy	UMK-D
Activated Thermax 690	Dairy	UMK-D
Thermax 690	Dairy	UMK-D
Thermax 695	Dairy	UMK-D
Thermax 70	Dairy	UMK-D
Trucal D-50	Dairy	UMK-D
Trucal D-7	Dairy	UMK-D
Trucal D-7 FX	Dairy	UMK-D
Trucal D-50 FX	Dairy	UMK-D

This certificate is valid through February 28, 2018 and is subject to renewal at that time.

Sincerely

UNITED MEHADRIK KOSHER

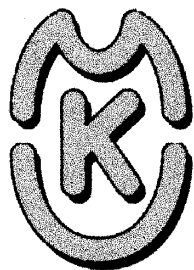
Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Administrator

Dairy - when bearing the UMK symbol must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.

UMK - acceptable only when bearing the UMK symbol, or the letters UMK. If it is a dairy product it must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.

Rabbi's stamp - acceptable only when the package bears the stamp of UMKosher.

Lot L.O.C. - acceptable only with a Letter of Certification for the specific lot number.



UMKosher

United Mehadrin Kosher
 1001 Prior Ave. S. • St. Paul, MN. 55116
 Phone: (651) 698-8300 • Fax: (651) 690-1144
 E-mail: rabbiz@umkosher.com

March 1, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that the following food items manufactured by GLANBIA FOODS Inc. of TWIN FALLS, IDAHO, in RICHFIELD, IDAHO, at USDA PLANT # 16-60 are under the Kashrut supervision and endorsement of UMKosher (United Mehadrin Kosher) and accordingly are KOSHER.

Product	Status	Restriction
VPO-Max	Dairy	UMK-D
Whey Protein Concentrate	Dairy	UMK-D

This certificate is valid through February 28, 2018 and is subject to renewal at that time.

Sincerely

UNITED MEHADRIN KOSHER

Rabbi Asher Zeilingold
 Executive Administrator

Dairy - when bearing the UMK symbol must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.

UMK - acceptable only when bearing the UMK symbol, or the letters UMK. If it is a dairy product it must have a 'D' (Dairy) next to the symbol.

Rabbi's stamp - acceptable only when the package bears the stamp of UMKosher.

Lot L.O.C. - acceptable only with a Letter of Certification for the specific lot number.



Southwest Cheese Co., LLC
P. O. Box 1509
1141 Curry Road 4
Clovis, NM 88101
Tel: 575.742.9200
Fax: 575.769.1494

Mycotoxin Statement

To Whom It May Concern:

Mycotoxins are highly toxic fungal metabolites that occur in fungal-infected wheat products, seed crops and peanuts. Because Southwest Cheese is a Co-Operative we also have control over the Dairies supplying raw milk to our plant.

Dairy products are of low risk from most Mycotoxins because the cow is able to prevent most Mycotoxins that might be consumed in her feed from entering the milk. Southwest Cheese routinely tests our raw milk and finished products for Aflatoxin M1. Our limit is ≤ 20 ppt for Aflatoxin M1.

Regards,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is written over a horizontal line.

Date: January 6, 2016

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company



Southwest Cheese Co., LLC
P. O. Box 1509
1141 Curry Road 4
Clovis, NM 88101
Tel: 575.742.9200
Fax: 575.769.1494

Certificate of Pesticide Analysis

Glanbia Foods Inc. has initiated a pesticide monitoring program in order to determine the risk of pesticides in cheese and whey products. Residues include: Organophosphorous pesticides, Organosulfur pesticides, Phenylurea Herbicides, Carbamate Pesticides, Organonitrogen Pesticides, and Halogenated Pesticides.

Since the inception of the program, no pesticides or herbicides have been detected.

Pesticides are not introduced at any stage of the manufacturing process of cheese and whey products.

Testing is conducted by a 3rd party lab, Exova.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brad Slater", is written over a horizontal line.

Date: January 5, 2016

Brad Slater
Quality Assurance Director
Southwest Cheese Company



Glanbia Foods Inc.
121 4th Ave. S.
Twin Falls, ID 83301
Phone 208-733-7555
Fax 208-733-9222

Certificate of Pesticide Analysis

January 1, 2016

Glanbia Foods Inc. has initiated a pesticide monitoring program in order to determine the risk of pesticides in whey products. Residues include: Organophosphorous pesticides, Organosulfur pesticides, Phenylurea Herbicides, Carbamate Pesticides, Organonitrogen Pesticides, and Halogenated Pesticides.

Since the inception of the program, no pesticides or herbicides have been detected.

Pesticides are not introduced at any stage of the manufacturing process of whey products.

Testing is conducted by a 3rd party lab, Exova.

Sincerely

A handwritten signature in black ink that reads "Mary Pierson". The signature is written in a cursive, flowing style.

Mary Pierson
Director of Quality Assurance
Glanbia Foods Inc.



Certificate of Analysis

Delivery
PO number
Date shipped

815912656
CAMBO#100
06/15/2017

Customer Number: 1659683
Protesa Distribuidora de
Nutricionais Ltd
Av. Candido de Abreu 776 Cj 803
CURITIBA, PARANA
80530-000
BRAZIL

Glanbia Nutritionals Inc.
1141 Curry Road 4
CLOVIS NM 88101-1807
USA

1020202 PROVON 292 WPI 20KG

Batch Number 1447701 1457701 1467701
Quantity Shipped 153 BAG 595 BAG 152 BAG
Weight - KG 3,060.000 11,900.000 3,040.000
Manufacturing Date 05/24/2017 05/25/2017 05/26/2017

Analysis

	Result	Result	Result
Expiration date, shelf life	05/23/2019	05/24/2019	05/25/2019
Protein Dry Basis (%)	93.24	92.79	93.32
Moisture %	4.85	4.38	4.27
pH	6.35	6.33	6.28
Fat (%)	0.77	0.82	0.67
Std Plate Count (cfu/g)	100	300	< 100
Coliforms (cfu/g)	< 1	< 1	< 1
Yeasts & Moulds (cfu/g)	< 10	< 10	< 10
Salmonella / 375g	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE
Ash (%)	2.48	2.60	2.45
S.aureus Coagulase Pos (cfu/g)	< 1 CF	< 1 CF	< 1 CF
Listeria in 25g	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE
Color	18.04	22.15	23.28
Scorched Particles 25g	A	A	A
Protein As is %	88.72	88.72	89.34
Bulk Density			

CALCULATION

AOAC 927.05 17TH ED.
AOAC 981.12
SMEDP 17TH ED. 15,086
SMEDP 17TH ED 6.020 SPC
BAM CH4
SMEDP 17TH ED. 8.114
AOAC 2003.09 / EXT LAB
AOAC 954.46 GRAVIMETRIC
AOAC 2001.05/RAPID STAPH
AOAC 997.03/EXT LAB
HUNTER DP 5000 / C340
ADPI B.916
AOAC 991.20



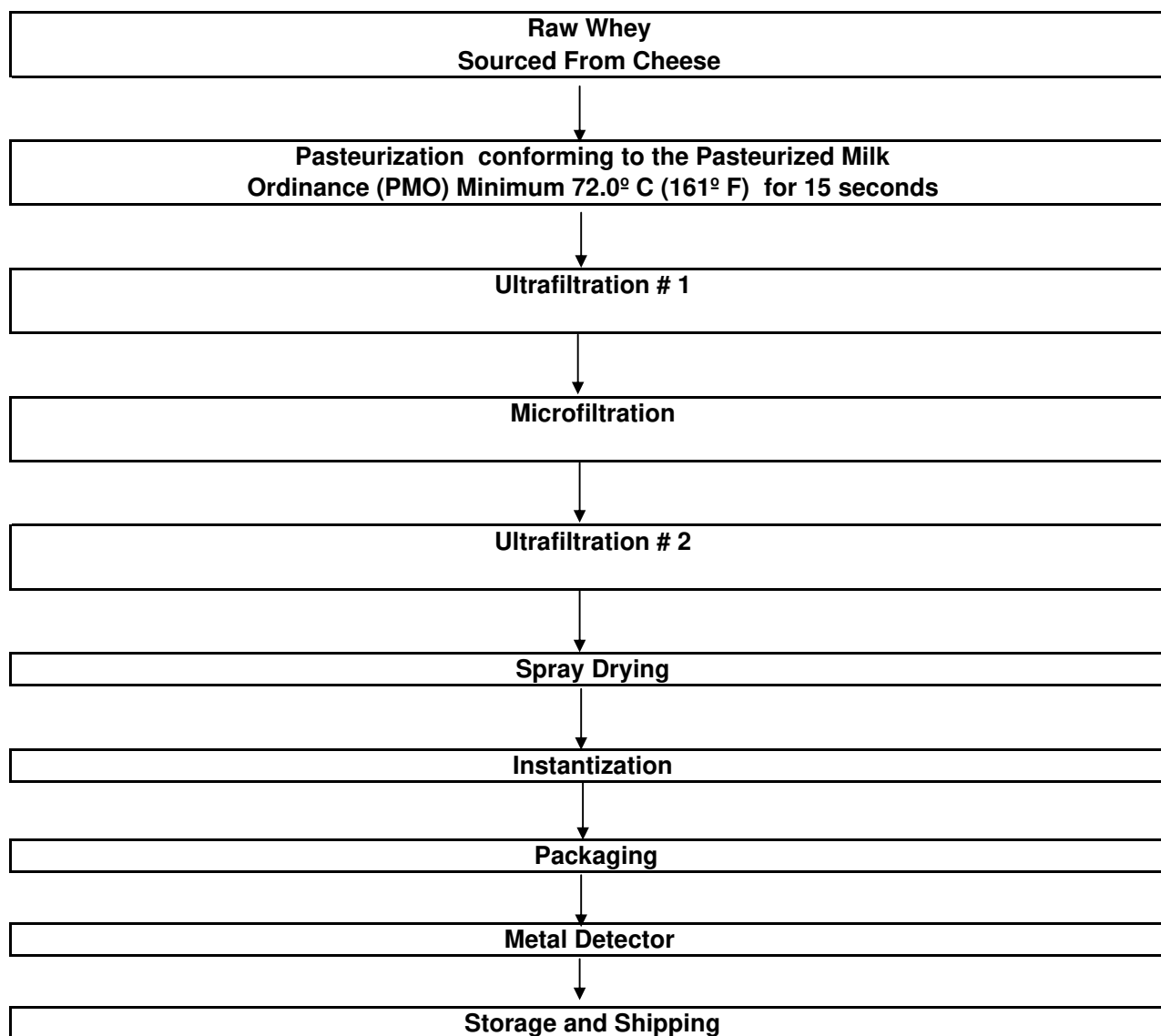
Provon 292
WPI derived from Sweet Dairy Whey

Flow Chart - Glanbia Foods Inc.

Date: 10/24/06

Revision date: 6/27/07

Revision # 1



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 101815/2016

CONTRATANTE: INP Industria de Alimentos Eireli Essentia
ENDEREÇO: Rua Palmira Laura Florêncio, 1997 - Real Parque - São José/SC
DATA DA COLETA: Não consta
RESPONSÁVEL PELA COLETA: Coleta realizada pelo solicitante
DATA E HORA DO RECEBIMENTO: 09/12/2016 14:15:37
PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS: 13/12/2016 a 29/12/2016

DADOS DO PRODUTO

PRODUTO: H.I. Whey
DESCRIÇÃO/EMBALAGEM: Amostra recebida em embalagem original lacrada.
QUANTIDADE DE AMOSTRA RECEBIDA: 375g
DATA DE FABRICAÇÃO: Não consta
DATA DE VALIDADE: Março/2018
LOTE: 4619

RESULTADOS

ENSAIOS DE ELEMENTOS MINERAIS			
DESCRIÇÃO DO ENSAIO	RESULTADO	UNIDADE	LQ
Arsênio total (As)	< 0,006	mg/Kg	0,006
Cádmio (Cd)	< 0,006	mg/kg	0,0060
Chumbo (Pb)	< 0,011	mg/kg	0,0110
Mercúrio (Hg)	< 0,006	mg/kg	0,0060

LQ: Limite de Quantificação calculado com base na alíquota de amostra analisada.

MÉTODOS ENSAIOS DE ELEMENTOS MINERAIS
Arsênio total (As):AOAC Official Method 2013.06 adaptado [PNT005-AB]
Cádmio (Cd):AOAC Official Method 2013.06 adaptado [PNT005-AB]
Chumbo (Pb):AOAC Official Method 2013.06 adaptado [PNT005-AB]
Mercúrio (Hg):AOAC Official Method 2013.06 adaptado [PNT005-AB]

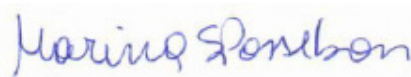
Considerações Finais

Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam exclusivamente à amostra ensaiada. O relatório de ensaio só deverá ser reproduzido na íntegra, não deve ser parcialmente reproduzido sem a prévia autorização do Laboratório Alac.

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 101815/2016

Garibaldi, 29 de dezembro de 2016

Código de Assinatura Eletrônica: 1613A7E1A54617751786937DC2417343



Marina Salvadori Possebon
Engenheira de Alimentos
CREA-BA 050931774-0



Certificate of Analysis

Delivery
PO number
Date shipped

815668221
CAMBO#98

Customer Number: 1697066
RIJA Importacao e Exportacao Ltda
sala 107 Centro
Rua Samuel Heusi, 463
ITAJAI, SC
88301-320
BRAZIL

Glanbia Nutritionals Inc.
1216 E. Highway 26
RICHFIELD ID 83349-5314
USA

1031553 THERMAX 690 LOW NA 20KG

Batch Number	1007321	1017321	1027321	1057321	1067321	1077321	1087321
Quantity Shipped	76 BAG	130 BAG	129 BAG	70 BAG	133 BAG	137 BAG	25 BAG
Weight - KG	1,520.000	2,600.000	2,580.000	1,400.000	2,660.000	2,740.000	500.000
Manufacturing Date	04/10/2017	04/11/2017	04/12/2017	04/15/2017	04/16/2017	04/17/2017	04/18/2017

Analysis	Result	Result	Result	Result	Result	Result	Test Methods
Expiration date, shelf life	09.04.2019	10.04.2019	11.04.2019	14.04.2019	15.04.2019	16.04.2019	AOAC 991.20
Protein As Is %	88.37	87.29	87.51	87.74	88.65	87.54	CALCULATION
Protein Dry Basis (%)	91.20	90.03	90.53	90.62	91.41	90.45	AOAC 927.05
Moisture %	3.10	3.05	3.34	3.18	3.03	3.21	ADP1 B.916
Scorched Particles 25g	A	A	A	A	A	A	SMEDP 17TH ED 6.020
Sid Plate Count (cfu/g)	200	200	200	900	< 100	100	BAM 8TH ED. CH. 4
Coliforms (cfu/g)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	BAM 8TH ED. CH. 18
Yeasts & Moulds (cfu/g)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	ASTM E313
Color	8.72	11.40	9.79	12.08	10.21	7.99	VENKEL DENSITY TAPPER
Bulk Density (g/ml)	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	AOAC 2003.09 / EXT LAB
Salmonella / 375g	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	SMEDP 17TH ED 15.022
pH	7.39	7.37	7.31	7.41	7.50	7.45	



Thermax 690
WPI derived from Sweet Dairy Whey

Flow Chart - Glanbia Foods Inc.

Date Reviewed: 02.26.15
Supersedes Date: 02.11.14
Revision # 4

