

Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite com baixo teor de fenilalanina

Preparation of whey protein concentrate hydrolysates with low phenylalanine content

ABSTRACT

SILVA, M. C.; SILVA, V. D. M.; FERNANDES, T. F.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of whey protein concentrate hydrolysates with low phenylalanine content. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 35, n. 1, p. 29-46, abr. 2010.

The objective of this work was to obtain enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate with low phenylalanine content. Seventeen enzymatic hydrolysates were prepared and the effects of some parameters, such as type of enzyme; enzyme:substrate ratio; substrate concentration and time of hydrolysis were evaluated. Activated carbon was used as adsorbent and showed to be efficient for removing phenylalanine, leading to values above 70%. The best results were obtained using pancreatin in an enzyme: substrate ratio of 1:100, a substrate concentration of 10% after 5 hours of hydrolysis, obtaining 81.3% of removal and a final phenylalanine content of 394.1 mg/100g of hydrolysate.

Keywords: Whey protein concentrate.
Enzymatic hydrolysis. Phenylalanine.
Phenylketonuria.

**MAITÊ COSTA DA SILVA¹;
VIVIANE DIAS MEDEIROS
SILVA¹; TATIANE FRANÇA
FERNANDES¹; MARIALICE
PINTO COELHO SILVESTRE¹**

¹Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Endereço para correspondência:

Profa. Marialice Pinto Coelho Silvestre.

Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Avenida Antonio Carlos, 6627 – sala 3070-B3.

CEP 31270-901.

Belo Horizonte, MG, Brasil.
e-mail:

malice@farmacia.ufmg.br

Agradecimentos:

os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue la obtención de hidrolizados enzimáticos con bajo contenido de fenilalanina, a partir de concentrado proteico de suero de leche. Se prepararon 17 hidrolizados enzimáticos y se evaluó el efecto de algunos parámetros como: tipo de enzima, relación enzima: sustrato, concentración de la materia prima y tiempo de hidrólisis. Carbón activado fue utilizado como medio adsorbente, y se mostró eficaz en la remoción de fenilalanina, se obteniendo porcentuales sobre 70%. El mejor resultado fue encontrado usando pancreatina en una relación enzima: sustrato de 1:100, con concentración de materia prima de 10% y 5 horas de hidrólisis, consiguiendo 81,3% de remoción y el contenido final de fenilalanina de 394,1 mg/100g de hidrolizado.

Palabras clave: Concentrado proteico de suero de leche. Hidrólisis enzimática. Fenilalanina. Fenilcetonuria.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados enzimáticos, a partir do concentrado proteico do soro do leite com baixo teor de fenilalanina. Foram preparados 17 hidrolisados enzimáticos, avaliando-se o efeito de alguns parâmetros, como tipo de enzima, relação enzima:substrato, concentração da matéria-prima e tempo de hidrólise. O carvão ativado foi utilizado como meio adsorbente, e mostrou-se eficaz na remoção da fenilalanina, obtendo-se percentuais acima de 70%. O melhor resultado foi encontrado utilizando-se a pancreatina na relação enzima:substrato de 1:100, com a concentração da matéria-prima de 10% após 5 horas de hidrólise, atingindo 81,3% de remoção e o teor final de fenilalanina de 394,1mg/100g de hidrolizado.

Palavras-chave: Concentrado proteico do soro do leite. Hidrólise enzimática. Fenilalanina. Fenilcetonúria.

INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética causada pela mutação do gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), ativa no fígado e responsável pela transformação da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr) (LOPEZ-BAJONERO et al., 2006; MARTINS; FISBERG; SCHMIDT, 1993; STRYER, 1996). A deficiência ou inatividade da PAH resulta no acúmulo da Phe e seus metabólitos no sangue e outros tecidos, acarretando retardo mental, microcefalia, hiperatividade, ou comportamento autista, tremor, falhas de crescimento, convulsões, menor pigmentação da pele e cabelos e odor característico na urina (MIRA; MARQUEZ, 2000).

A incidência da fenilcetonúria é bastante variável, abrangendo números que vão de 1:3.000 nascidos vivos na Turquia até 1:60.000 no Japão. Nos Estados Unidos, a fenilcetonúria atinge aproximadamente uma criança para cada 15.000 nascidas. No Brasil, a prevalência gira em torno de 1:15.000 a 1:20.000 nascidos vivos (BRASIL, 2004).

O tratamento para a PKU consiste, acima de tudo, numa dieta pobre em Phe, que deve ser iniciada o mais precocemente possível e mantida por toda a vida (LOPEZ-BAJONERO et al., 2006; MARTINS; FISBERG; SCHMIDT., 1993; MIRA; MARQUEZ, 2000; SHIMAMURA et al., 1999). As necessidades proteicas dos fenilcetonúricos são, geralmente, supridas pelas misturas de aminoácidos livres, isentas de fenilalanina, disponíveis no mercado, podendo ser acrescidas de outros nutrientes. Entretanto, essas misturas possuem odor e paladar desagradáveis, são monótonas, dispendiosas, hiperosmóticas, além de apresentarem elevado custo (GUADIX et al., 2000; MIRA; MARQUEZ, 2000).

Dessa forma, os hidrolisados proteicos isentos ou com baixo teor de fenilalanina, constituem boa alternativa para o tratamento dos fenilcetonúricos, pois, apresentam melhor tolerância, sabor e odor agradável e menor osmolaridade (MIRA; MARQUEZ, 2000).

As formulações especiais descritas na literatura para fenilcetonúricos são elaboradas a partir de fontes proteicas como caseína e concentrado proteico do soro (KITAGAWA et al., 1987; LOPEZ-BAJONERO et al., 2006). O concentrado proteico do soro de leite (CPS) foi a matéria-prima de escolha do presente trabalho por apresentar alto teor proteico (34%) e conter proteínas de elevado valor nutricional e biológico (BRANS et al., 2004; HUFFMAN; HARPER, 1999).

O CPS é um produto originado da separação em membranas das proteínas do soro do leite, podendo apresentar de 35 a 80% de proteínas. Diversas aplicações importantes estão associadas ao CPS, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos como carnes, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas (BRANS et al., 2004; KINSELLA; WHITEHEAD, 1989).

Os métodos utilizados para a remoção da Phe baseiam-se na liberação deste aminoácido por hidrólise química ou enzimática, sendo posteriormente removidos por

processos diferenciados, tais como tratamento com carvão ativado ou resina de troca iônica, uso de peneira molecular e cromatografia de troca iônica. A desaminação com a enzima fenilalanina amônio liase também é sugerida. A escolha do método deve sempre considerar a relação custo/eficiência (LOPEZ-BAJONERO et al., 2006; MOSZCZYNSKI; IDZIAK, 1993).

O carvão ativado e uma resina de adsorção foram testados, anteriormente, em outros estudos, tendo sido eficientes na remoção de Phe de hidrolisados proteicos de fontes diversas e empregando condições de hidrólises variadas (CAPOBIANGO et al., 2007; DELVIVO et al., 2006; LOPES et al., 2008; SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2006).

A eficiência da remoção de Phe é efetuada por meio de sua quantificação na matéria-prima, assim como em seus hidrolisados proteicos após tratamento por um meio adsorvente. Para quantificar o teor de Phe em proteínas ou em hidrolisados proteicos, a espectrofotometria derivada segunda (EDS) tem sido utilizada por diversos autores, mostrando ser uma técnica rápida, útil e confiável (CAHILL; PADERA, 1980; GRANT; BHATTACHARYYA, 1985; O'HARVER, 1979). Esta técnica foi, igualmente, utilizada para a avaliação da porcentagem de remoção de Phe de hidrolisados de leite em pó desnatado (LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005; SOARES et al., 2006), de soro de leite em pó (LOPES et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), de arroz (VIEIRA et al., 2008) e do feijão (LOPES et al., 2008).

O presente trabalho apresentou como objetivo a obtenção de hidrolisados proteicos com baixo teor de fenilalanina, a partir do concentrado proteico do soro do leite. Dessa forma, verificou-se o efeito de diversos parâmetros neste processo, tais como, tipo de enzima; relação enzima:substrato; concentração da matéria-prima e tempo de hidrólise.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

O concentrado proteico do soro do leite (CPS) na forma de pó (Kerrylac 750) foi gentilmente doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A papaína (Corolase® L10) foi comprada da AB Enzymes (Darmstadt, Alemanha). As demais proteases foram gentilmente doadas pela Prozyn (São Paulo, Brasil) (*B. subtilis* - Protemax N200 e *B. subtilis* - Protezyn L) e pela AB Enzymes (*B. stearotothermophilus* - Corolase® TS, pancreatina - Corolase® PP, *A. sojae* - Corolase® LAP; *A. oryzae* - Flavourzyme e *B. amyloquefaciens* - Protemax N411). Algumas características destas enzimas estão apresentadas na tabela 1. Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O carvão ativado (granulado nº 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil).

Tabela 1 – Características das proteases utilizadas para o preparo dos hidrolisados proteicos

Grupo	Nome comercial	Origem	Atividade enzimática ⁵	Estabilidade	
			U/mL	pH	T (°C)
Metalto protease	Corolase® TS ²	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	44,13	7<pH<8	60<T<80
Serino e Metalto protease	Corolase® PP ²	Pancreatina	34,71	7<pH<9	45<T<55
Cisteíno Protease	Corolase® L10 ²	<i>Carica papaya</i>	31,56	3<pH<9	50<T<70
Metalto protease	Corolase® LAP ²	<i>Aspergillus sojae</i>	63,19	3<pH<9	50<T<70
Metalto protease	Flavourzyme® ¹	<i>Aspergillus oryzae</i>	512,43	6<pH<9	50<T<70
Serino protease	Protemax N411 ¹	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	53,00	7<pH<7,5	55
Serino protease	Protemax ® N200 ¹	<i>Bacillus subtilis</i>	20,19	4,5<pH<7	50<T<55
Serino protease	Protezyne® L ¹	<i>Bacillus subtilis</i>	29,83	9	55

Fonte: ¹PROZYN (2005); ^{2,3,4}AB ENZYME (2001, 2002, 2003); ⁵ Atividade enzimática U/mL: valor determinado no presente trabalho de acordo com a metodologia descrita por DIAS et al., 2008.

¹PROZYN. Especificações técnicas de enzimas. s.n., 2005. 2p;

²AB ENZYMES. Corolase® PP, Corolase® 7089, Corolase® LAP, Corolase® N: *Description and Specification*. Rev. Nr. 02. 2001, 8p;

³AB ENZYMES. Corolase® TS: *Description and Specification*. Rev. Nr. 00. 2002, 2p;

⁴AB ENZYMES. Corolase® L10: *Description and Specification*. Rev. Nr. 03. 2003, 2p.

⁵CALIK et al., (2002). *Enzyme and Microbial Technol.*, 31, pp. 685-697; KUMAR, C.G. (2002). *Letters in Applied Microbiology*, 34, pp. 13-17.

MÉTODOS

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

A composição química do CPS foi determinada segundo os métodos descritos na Association of Official Analytical Chemists (1995), sendo todas as análises realizadas em triplicata. O método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP), a 105°C até peso constante, foi utilizado para a determinação da umidade; o teor de cinzas foi determinado por incineração, em mufla a 550°C; os lipídios, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas, pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína total (NIELSEN, 1998); e o teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteínas, lipídios totais e cinzas totais.

PREPARO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

Foram preparados 17 hidrolisados enzimáticos a partir de soluções do CPS, variando-se os seguintes parâmetros: tipo de enzima, relação enzima:substrato (E:S), concentração da matéria-prima (p/v) e tempo de hidrólise (Tabela 2). A relação proteína: carvão ativado (CA) utilizada foi de 1:88.

Tabela 2 – Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados proteicos do concentrado proteico do soro do leite (CPS)

Hidrolisados	Enzima	pH (ótimo)	Temperatura (°C)	E:S	CPS (p/v)	Tempo (h)
H1	<i>B.subtilis</i> (Protezyn L)	9	55	1:100	10%	5
H2	<i>A. sojae</i> (Corolase LAP)	9	55	1:100	10%	5
H3	<i>B.subtilis</i> (Protemax N200)	7	55	1:100	10%	5
H4	Papaína (Corolase L10)	7	55	1:100	10%	5
H5	<i>B. amyloquefaciens</i> (Protemax N411)	7	55	1:100	10%	5
H6	<i>A. oryzae</i> (Flavourzyme)	7	50	1:100	10%	5
H7	<i>B. stearothermo-philus</i> (Corolase TS)	8	60	1:100	10%	5
H8	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	5
H9	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	2:100	10%	5
H10	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	4:100	10%	5
H11	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	7%	5
H12	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	8%	5
H13	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	9%	5
H14	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	1
H15	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	2
H16	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	3
H17	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	4

CPS = Concentrado proteico do soro do leite; E:S = relação enzima:substrato

Para a obtenção dos hidrolisados, 100mL de solução do CPS a 10% (p/v) foram inicialmente colocados em um erlenmeyer e o pH foi ajustado a um valor compreendido na faixa ótima apresentada nas fichas técnicas de cada enzima, disponibilizadas pelos fornecedores. Em seguida, a temperatura foi estabilizada, também de acordo com as especificações técnicas dos fornecedores, e as enzimas adicionadas em quantidade suficiente para se obter a relação E:S desejada. Ao final da reação, o processo foi interrompido por aquecimento em banho-maria a 75°C, por 15 segundos, a fim de inativar a enzima, o que foi confirmado pela medida da atividade enzimática, antes e após o tratamento enzimático, pelo método descrito por Dias et al. (2008), porém sem adição de caseína.

REMOÇÃO DE FENILALANINA DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

A Phe foi removida dos hidrolisados proteicos do CPS pela utilização do carvão ativado como meio adsorvente. Foi empregado o procedimento de passagem por coluna, desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho (SOARES et al., 2006). O CA foi hidratado com água destilada por 10min sob agitação constante e, em seguida, colocado em seringa descartável de 10mL contendo filtro de nylon com lâ de vidro. A coluna de carvão ativado foi montada colocando-se embaixo o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por cima o de maior granulometria. Em sequência, os hidrolisados foram passados pela coluna, em quantidade suficiente para atingir a relação proteína: CA desejada, e submetidos à pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE 11778, São Paulo, SP, Brasil), tendo sido recolhidos os eluatos.

EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE O PREPARO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA

Os parâmetros estudados estão citados na tabela 2. O efeito do tipo de enzima foi testado empregando-se seis diferentes proteases de microrganismos, uma pancreatina e uma papaína. A enzima que levou à obtenção do hidrolisado com o maior percentual de remoção de fenilalanina, foi utilizada para a avaliação dos demais parâmetros: relação enzima:substrato, concentração da matéria-prima e tempo de hidrólise. Para o estudo da influência da relação enzima:substrato, foram utilizadas as relações de 1:100, 2:100 e 4:100. A relação enzima:substrato que obteve o melhor resultado foi mantida para a avaliação dos demais parâmetros: concentração da matéria-prima e tempo de hidrólise. O efeito da concentração da matéria-prima foi estudado nos valores de 7%, 8%, 9% e 10% (p/v). A concentração da matéria-prima utilizada no preparo do hidrolisado proteico que levou à obtenção do maior percentual de remoção de fenilalanina foi utilizada para testar o tempo de hidrólise. Finalmente, estudou-se o efeito do tempo de hidrólise, sendo testados os valores de 1, 2, 3, 4 e 5 horas.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

A avaliação da eficiência da remoção de Phe foi realizada pela medida do teor de Phe livre, no CPS e em seus hidrolisados, após tratamento com CA, empregando-se a espectrofotometria derivada segunda (LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005). As amostras foram submetidas à hidrólise ácida (HCl a 5,7mol/L, 110°C, 24h) e, após ajuste do pH para 6,0, com solução de fosfato de sódio dibásico (1mol/L), foram submetidas às leituras de absorbância na faixa de 250 a 280nm. Foram traçados os espectros de derivada segunda (Espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Hanslope, Inglaterra) e a área do terceiro pico negativo foi usada para calcular a quantidade de Phe presente nas amostras, empregando-se a curva padrão. O software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, EUA) foi utilizado para traçar os espectros da derivada segunda.

Para a curva padrão, soluções estoques de Phe ($6,05 \times 10^{-4}$ mol/L), Tyr ($5,52 \times 10^{-4}$ mol/L) e Trp ($4,90 \times 10^{-4}$ mol/L) foram preparadas em tampão fosfato de sódio a 0,01mol/L (pH 6,0). Em seguida, 10mL de cada uma destas soluções foram misturados e a solução obtida foi diluída, sucessivamente, de maneira a se obter concentrações de Phe variando de 0,067 a $2,018 \times 10^{-4}$ mol/L.

A eficiência da remoção de Phe foi calculada de acordo com a equação (1).

$$\% \text{ Remoção de Phe} = \frac{[A (B \times C / D)]}{A} \times 100 \quad (1)$$

sendo:

A = Teor de Phe no concentrado proteico do soro do leite.

B = Teor de Phe no hidrolisado proteico, após tratamento com CA.

C = Teor de proteína no concentrado proteico do soro do leite.

D = Teor de proteína no hidrolisado proteico do concentrado proteico do soro do leite.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em 3 repetições, e as análises realizadas em triplicata. Para comparar a porcentagem de remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan para comparação de médias, ambos a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO DO SORO DE LEITE

O conhecimento da composição química do CPS é relevante, pois esse concentrado representa a matéria-prima para o desenvolvimento de novos ingredientes ou produtos que, no caso do presente trabalho, serão destinados a um grupo específico de pacientes, os fenilcetonúricos.

Observa-se, na tabela 3, que os teores obtidos para proteínas, cinzas totais e lactose estão próximos aos encontrados por outros autores. Além disso, o teor de umidade está de acordo com a ficha técnica do produto que informa apenas sobre este valor (> 5g%), porém é superior aos obtidos pelos outros autores. Por outro lado, a quantidade de lipídeos aqui encontrada é bem inferior à reportada na literatura. Esta diferença, encontrada em outros trabalhos da literatura (MORTENSON; VICKERS; REINECCIUS, 2008; SAMMEL; CLAUS, 2003), deve estar relacionada ao fato de que o método utilizado para a determinação deste nutriente não foi o mesmo do presente trabalho.

Tabela 3 – Composição química do concentrado proteico de soro do leite

Componentes	¹ Valores obtidos (g%)	Resultados encontrados na literatura		
		CPS 1 (g%)	CPS 2 (g%)	CPS 3 (g%)
Proteínas	32,64	—	34,5	38,6
Umidade	5,06	> 5	3,5	2,4
Lipídeos	0,15	—	3,5	2,8
Cinzas totais	7,40	—	6,4	6,5
Lactose	54,75	—	52,1	49,8

¹Valores encontrados após análise do concentrado proteico do soro de leite utilizado no experimento (KERRYLAC 750, Kerry do Brasil Ltda, MG, Brasil). CPS 1- Valores disponibilizados na ficha técnica do produto KERRYLAC 750 da Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil); CPS 2 - Valores encontrados por SAMMEL e CLAUS, 2003 analisando o CPS Foremost 365 (Foremost Farms, Baraboo, WI, USA). CPS 3 – Valores encontrados por MORTENSON et al. (2008).

Outros autores (ONWULATA; KONSTANCE; TOMASULA, 2004) também relataram diferenças na composição química de CPS proveniente de diversas empresas. Assim, foram observaram significantes variações na composição química de 6 concentrados proteicos de soro de leite fornecidos por diferentes empresas, especialmente com relação aos teores de umidade, proteína, lipídios, cinzas e carboidratos.

EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Nas tabelas 4 a 7, estão representados os resultados obtidos para a remoção de Phe dos hidrolisados do concentrado proteico do soro do leite.

Os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg Phe/100g de hidrolisado do concentrado proteico do soro), sendo esta última forma a mais apropriada para os cálculos de adequação das prescrições dietéticas de substitutos proteicos destinados a fenilcetonúricos, além de atender à regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos no Brasil (BRASIL, 2003). O teor de Phe encontrado no CPS foi de 2106,7mg de Phe/100g do produto,

sendo que não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre o teor de Phe do CPS utilizado no presente trabalho (CPS com 32,64% de proteína, conforme tabela 3). Entretanto, foi encontrado na literatura um trabalho realizado com CPS proveniente da empresa Mahaan (New Delhi, USA) contendo 75,6% de proteína, o qual apresentou teor de Phe de 3620mg de Phe/100g do produto (SINHA et al., 2007).

Tabela 4 – Avaliação do tipo de enzima sobre o percentual de remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos do concentrado proteico do soro do leite

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg Phe/100 g do hidrolisado de CPS ¹)
H1	77,8 ^b	467,6
H2	61,7 ^{d,e,f}	806,4
H3	55,6 ^g	934,1
H4	64,7 ^d	743,2
H5	60,8 ^{e,f}	826,4
H6	79,0 ^{a, b}	441,1
H7	69,6 ^c	641,2
H8	81,3 ^a	394,1

^{a,b,c,d,e,f} Médias seguidas por letras distintas diferem, entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.
¹CPS=concentrado proteico do soro do leite.

Tabela 5 – Avaliação da relação enzima:substrato sobre o percentual de remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos do concentrado proteico do soro do leite, obtidos com pancreatina

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg Phe/100 g do hidrolisado de CPS ¹)
H8	81,3 ^a	394,1
H9	63,0 ^b	778,6
H10	63,2 ^b	775,3

^{a,b} Médias seguidas por letras distintas diferem, entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.
¹CPS=concentrado proteico do soro do leite.

Tabela 6 – Avaliação da concentração da matéria-prima sobre o percentual de remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos do concentrado proteico do soro do leite, obtidos com pancreatina

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg Phe/100g do hidrolisado de CPS ¹)
H8	81,3 ^a	394,1
H 11	62,7 ^b	785,5
H 12	62,3 ^b	794,8
H 13	59,1 ^c	861,8

^{a,b,c} Médias seguidas por letras distintas diferem, entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.
¹CPS=concentrado proteico do soro do leite.

Tabela 7 – Avaliação do tempo de hidrólise sobre o percentual de remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos do concentrado proteico do soro do leite, obtidos com pancreatina

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mgPhe/100g do hidrolisado de CPS ¹)
H8	81,3 ^a	394,1
H 14	19,4 ^b	1697,3
H 15	22,6 ^b	1631
H 16	30,3 ^c	1468,4
H 17	33,5 ^c	1400,9

^{a,b,c} Médias seguidas por letras distintas diferem, entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.
¹CPS=concentrado proteico do soro do leite.

Como pode ser observado, o uso do carvão ativado mostrou-se eficaz na remoção de Phe dos hidrolisados proteicos do CPS, tendo o percentual de remoção variado de 19,4% a 81,3%, e o teor final de Phe de 394,1 a 1697,3mg de Phe/100g de hidrolisado de CPS, dependendo dos parâmetros empregados. Ressalta-se, ainda que, dos 17 hidrolisados estudados, o H8 foi o que apresentou a maior remoção de Phe (81,3%).

Levando-se em conta que o teor máximo de Phe permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002) para pacientes fenilcetonúricos é de 0,1 g/100g de produto, o hidrolisado H8 poderia ser utilizado como fonte proteica na elaboração de um suplemento nutricional para fenilcetonúricos na quantidade de 25,4g, o que corresponde a 0,1g de Phe/100g

e a um teor proteico de 8,28 g/100 g. Apesar deste valor ser bem menor que o do CPS, representa um valor superior ao teor proteico de alimentos convencionais, fontes de proteínas, tais como o leite (3,0%), bebida láctea (2,0%) e iogurte (3,0%) (TACO, 2006).

Vale a pena ressaltar que a possibilidade de introduzir o CPS na dieta de fenilcetonúricos, através da utilização do hidrolisado H8 em uma formulação dietética, teria um elevado impacto nutricional, já que os alimentos de origem animal não são permitidos na alimentação destes pacientes, devido ao elevado teor de Phe.

Além disso, a introdução de proteínas na forma hidrolisada na dieta destes pacientes é vantajosa, do ponto de vista nutricional, uma vez que os oligopeptídios, especialmente di-tripeptídios, são mais rapidamente absorvidos do que misturas de aminoácidos livres (FRENHANI; BURINI, 1999), que são normalmente usadas na alimentação de fenilcetonúricos.

Deve-se ressaltar, ainda, que a presença de uma certa quantidade de Phe no produto final para fenilcetonúricos é desejável, do ponto de vista nutricional, uma vez que, por ser um aminoácido essencial, a Phe é fundamental para o crescimento normal de crianças. Além disso, as condições operacionais necessárias para atingir cerca de 100% de remoção de Phe aumentariam demasiadamente os custos do processo (LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2006; SOARES et al., 2006).

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre a remoção de Phe de CPS. Embora outros trabalhos (DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007) já tenham sido realizados para a remoção da fenilalanina do soro de leite líquido, estes utilizaram uma metodologia diferente da utilizada no presente trabalho. Ressalta-se ainda que o soro de leite em sua forma concentrada, apresenta como vantagens a facilidade de manipulação laboratorial, o menor risco de contaminação microbiológica e a facilidade de armazenamento, principalmente quando se trata de produção em larga escala. Além disso, em termos nutricionais, ao se calcular o volume oferecido para um indivíduo para que o mesmo possa alcançar suas necessidades diárias proteicas, quando se trata do soro de leite em sua forma concentrada, este volume será reduzido, ao se comparar com o soro de leite líquido. Em outros trabalhos encontrados na literatura, a remoção de Phe foi realizada partindo-se de outras fontes proteicas. Assim, o CA foi utilizado com eficiência para a remoção de Phe de leite em pó (93,6 a 99%) (LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2006; SOARES et al., 2006), do soro de leite (75 a 99%) (DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007), do arroz (85 a 100%) (LOPES et al., 2008) e do fubá de milho (68,63 a 97,55%) (CAPOBIANGO et al., 2007). Observa-se que, para a maioria dos hidrolisados de CPS aqui estudados, a porcentagem de remoção de Phe está próxima dos valores destes outros trabalhos.

EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

O efeito do tipo de enzima foi avaliado com o intuito de se obter o hidrolisado proteico com o maior percentual de remoção de Phe. Os demais parâmetros – relação

enzima:substrato (E:S), concentração da matéria-prima (p/v) e tempo de hidrólise – foram analisados levando-se, igualmente, em consideração a redução dos custos do processo para adaptação em larga escala. Assim, o emprego de uma menor relação E:S está associado à utilização de menor quantidade de enzima necessária para hidrólise; a utilização de uma maior concentração da matéria-prima, facilita posterior processo de secagem na obtenção do produto final; e o menor tempo de hidrólise está associado à diminuição da contaminação bacteriana, à redução da formação de produtos de degradação, além de menor gasto de energia.

EFEITO DO TIPO DE ENZIMA

Para a avaliação do efeito do tipo de enzima, foram comparados os hidrolisados de H1 até H8. Dentre as enzimas utilizadas, a pancreatina (H8) foi a mais eficiente, levando à obtenção do hidrolisado com o menor teor final de Phe (394,1mg Phe/100g). Este resultado poderia ser, pelo menos em parte, explicado pelo fato de que a pancreatina é um complexo enzimático que apresenta tanto endopeptidases (tripsina, quimiotripsina) como exopeptidases (carboxipeptidase A e B) sendo, portanto, capaz de hidrolisar ligações peptídicas tanto no interior quanto nas porções N- ou C- terminais da cadeia peptídica, favorecendo uma maior exposição da fenilalanina, o que facilitaria a sua remoção pelo carvão ativado. Da mesma maneira, a ação desta mesma papaína levou a uma maior remoção de Phe de hidrolisados proteicos de feijão (81,5%), quando comparada com a ação de proteases de cinco diferentes microrganismos (70,26%, em média) (LOPES, et al., 2008).

Pode-se observar, ainda, na tabela 4, que o emprego de duas enzimas obtidas do mesmo microrganismo (*B. subtilis*; H1 e H3) levou a resultados diferentes, tanto para a atividade enzimática quanto para a remoção de Phe. De fato, como essas enzimas foram preparadas por fabricantes distintos, os processos utilizados não devem ter sido os mesmos, o que influenciaria na composição dos extratos enzimáticos, alterando não apenas a quantidade, mas também a qualidade das atividades das enzimas.

O efeito do tipo de enzima sobre a remoção de Phe de hidrolisados proteicos foi, anteriormente, avaliado por Soares et al. (2006), sendo observado que ao se utilizar uma papaína (Biobrás, Montes Claros, Brasil) e uma pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para preparar hidrolisados proteicos de leite em pó, não foi encontrada diferença significativa nos percentuais de remoção de Phe (97,6% e 97,1%, respectivamente). Por outro lado, o uso desta mesma papaína na obtenção de hidrolisados proteicos de farinha de arroz levou a maior remoção de Phe (94,1%) do que a obtida com uma pancreatina (AB Enzymes, Darmstadt, Alemanha, 69,1%) ou proteases de quatro diferentes microrganismos (76,67%, em média) (VIEIRA et al., 2008).

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores comparando o efeito do uso de diferentes enzimas na remoção de Phe de hidrolisados proteicos.

EFEITO DA RELAÇÃO ENZIMA:SUBSTRATO

Visando manter constantes os demais parâmetros, para se avaliar o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe, foram comparados entre si os seguintes hidrolisados obtidos pela ação da pancreatina: H8 (E:S = 1:100), H9 (E:S = 2:100) e H10 (E:S = 4:100). Observa-se, na tabela 5, que a vantagem da utilização de uma menor quantidade de enzima (menor relação E:S) foi obtida ao se comparar E:S de 2:100 (63% de remoção) com 1:100 (81,3% de remoção). O mesmo não ocorreu ao se comparar E:S de 4:100 com 2:100, uma vez que os resultados obtidos foram praticamente os mesmos.

Capobiango et al. (2007), utilizando o fubá de milho como matéria-prima, testaram diversas condições de hidrólise, e os valores reportados foram bastante variados, sendo que, em alguns casos, o emprego de uma menor relação E:S (1:100 e 2:100) levou a uma remoção de Phe mais elevada (86,68% e 79,01%, respectivamente), como aconteceu no presente trabalho ao se comparar 1:100 e 2:100. Entretanto, Lopes et al. (2008) observaram que o emprego de uma menor relação E:S não afetou a remoção de Phe de hidrolisados proteicos de arroz, assim como ocorreu ao se comparar 2:100 com 4:100 no presente trabalho.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores comparando o efeito do uso de diferentes relações E:S na remoção de Phe de hidrolisados proteicos.

O conjunto destes resultados demonstra que, apesar de se esperar, teoricamente, que o emprego de uma maior relação E:S leve a um maior grau de hidrólise e, conseqüentemente, a uma maior exposição de Phe e a um menor teor final de Phe, na prática, esse procedimento é bem mais complexo do que o esperado e depende de outros fatores, tais como tipo e atividade da enzima, tipo e concentração de substrato e pH.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A avaliação do efeito deste parâmetro pode ser feita comparando-se os hidrolisados obtidos pela ação da pancreatina H11 (7%), H12 (8%), H13 (9%) e H8 (10%). Observa-se na tabela 6, que o emprego de uma maior concentração da matéria-prima (10%) foi altamente favorável, uma vez que obteve-se o hidrolisado com o maior percentual de remoção de Phe (81,3%). Entretanto, ao se comparar os hidrolisados H11 (7%) e H12 (8%), observou-se que o emprego de uma menor concentração da matéria-prima não teve efeito sobre o percentual de remoção de Phe (62,7% e 62,3%, respectivamente), os quais não diferiram significativamente entre si.

Lopes et al. (2008), avaliando a concentração do extrato proteico do arroz sobre a remoção de Phe, também, observaram que a utilização de uma maior concentração da matéria-prima (3 g/100mL) foi favorável, pois levou a 95% de remoção de Phe, ao passo que ao se usar 2 g/100mL este percentual caiu para 90%.

Entretanto, Capobiango et al. (2007), ao avaliarem a concentração do extrato proteico do fubá de milho, observaram que o emprego de um maior valor (2g/100mL) foi prejudicial, uma vez que obteve-se percentual de remoção de Phe (68,72%) bem inferior ao obtido com a concentração de 1g/100mL, cujo valor obtido foi de 97,31%.

Estes resultados demonstram que o efeito da concentração da matéria-prima sobre a remoção de Phe é mais complexo do que o esperado e pode estar associado a outros parâmetros empregados no processo. Dessa forma, o aumento vantajoso da concentração proteica poderia levar a resultados tanto positivos quanto negativos. Assim, se por um lado contribuiria para aumentar a probabilidade da enzima entrar em contato com o substrato, levando a uma maior exposição e remoção de Phe, por outro, uma maior quantidade de proteínas poderia provocar uma sobrecarga na coluna de carvão, reduzindo, conseqüentemente, a remoção de Phe.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores avaliando-se o efeito da concentração da matéria-prima sobre a remoção de Phe de hidrolisados proteicos.

EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO

A avaliação deste efeito pode ser feita comparando-se os hidrolisados H14 (1h), H15 (2h), H16 (3h), H17 (4h) e H8 (5h). Os resultados apresentados na tabela 7 indicam que não foi observada a vantagem da utilização de um menor tempo de reação, uma vez que uma hidrólise por tempo mais curto levou a uma menor remoção de Phe. Na verdade, quanto maior o tempo de reação, mais pronunciada foi a remoção de Phe, sendo que o tempo de 5h foi muito mais vantajoso que os demais valores testados. Este resultado está de acordo com que seria esperado teoricamente, uma vez que o emprego de um maior tempo de reação deve ser capaz de promover uma hidrólise mais acentuada das proteínas, elevando a exposição de Phe e facilitando a sua adsorção pelo carvão ativado.

Não foram encontrados na literatura dados sobre o efeito do tempo de hidrólise na eficiência da remoção de Phe.

CONCLUSÕES

Empregando-se várias proteases para a hidrólise das proteínas do concentrado proteico do soro do leite, e o CA como meio adsorvente, foi possível obter hidrolisado proteico com baixo teor de Phe (394,1mg/100g), que poderia ser utilizado em uma quantidade de até 25,4g/100g como ingrediente alimentar ou alimento na dieta de fenilcetonúricos. O melhor resultado obtido foi aquele em que se utilizou a pancreatina na relação E:S de 1:100, concentração da matéria-prima de 10% e tempo de reação de 5 horas, tendo atingido 81,3% de remoção de Phe.

REFERÊNCIAS/REFERENCES

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2 v.
- BRANS, G.; SCHRÖEN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Memb. Sci.*, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial, [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 dez. 2003. p. 33.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Políticas, Programas e Ações: alguns exemplos. In: Seminário Nacional de Saúde da População Negra, 2004, Brasília. *Anais...*
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 4 nov. 2002, p. 83.
- CAHILL, J. E.; PADERA, F. G. Derivate analysis of UV/visible spectra. *Am. Lab.*, v. 12, n. 4, p. 101-112, 1980.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D. C. F.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; SEGALL, S. D.; SILVESTRE, M. P. C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.*, v. 3, n. 6, p. 1-19, 2007.
- DELVIVO, F. M.; VIEIRA, C. R.; BIASUTTI, E. A. R.; AFONSO, W. O.; SILVESTRE, M. P. C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SILVESTRE, M. P. C.; SCHWAN, R. F. Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 24, n. 10, p. 2027-2034, 2008.
- FRENHANI, P. B.; BURINI, R. B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-235, 1999.
- GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P. K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chromatog. A*, v. 347, p. 219-235, 1985.
- GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PÁEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharm.*, v. 41, n. 1, p. 79-89, 2000.
- HUFFMAN, L. M.; HARPER, W. J. Maximizing the value of milk through separation technologies. *J. Dairy Sci.*, v. 82, n. 10, p. 2238-2244, 1999.
- KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr Res.*, v. 33, p. 343-438, 1989.
- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low-phenylalanine peptide. *Enzyme*, v. 38, n. 1-4, p. 321-327, 1987.
- LOPES, D. C. F.; BIZZOTTO, C. S.; SILVA, V. D. M.; AFONSO, W. O.; LOPES Jr., C. O.; SILVESTRE, M. P. C. Obtenção de low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J. Food Technol.*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPES, D. C. F.; DELVIVO, F. M.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M. J. B.; STARLING, A. L. P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.

- LOPES, D. C. F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C. Dietary Supplements for Phenylketonuria: Removing Phe by Activated Carbon. *Nutr. Food Sci.*, v. 36, n. 2, p. 96-104, 2006.
- LOPES, D. C. F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- LOPEZ-BAJONERO, L. J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, n. 4, p. 938-942, 2006.
- LOPES JR, C. O. *Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina*. 81 p. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- MARTINS, A. M.; FISBERG, R. M.; SCHMIDT, B. J. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica. *Nestlé*, São Paulo, v. 54, p. 1-12, 1993.
- MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pública.*, v. 34, n. 1, p. 86-96, 2000.
- MORTENSON, M. A.; VICKERS, Z. M.; REINECCIUS, G. A. Flavor of whey protein concentrates and isolates. *Int. Dairy J.*, v. 18, n. 6, p. 649-657, 2008.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochem. Microbiol.*, v. 29, n. 3, p. 302-306, 1993.
- NIELSEN, S. S. *Food Anal.* Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- O´HARVER, T. C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, n. 9, p. 1548-1553, 1979.
- ONWULATA, C. I.; KONSTANCE, R. P.; TOMASULA, P. M. Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. *J. Dairy Sci.*, v. 87, n. 3, p. 749-756, 2004.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14a. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.
- SAMMEL, L. M.; CLAUS, J. R. Whey protein concentrates effects on pink color development in a cooked ground turkey breast model system. *Meat Sci.*, v. 65, n. 4, p. 1293-1299, 2003.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. *Peptide mixture and products thereof*. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, V. D. M.; MARCO, L. M.; AFONSO, W. O.; LOPES, D. C. F.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M. J. B.; STARLING, A. L. P.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Technol.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.*, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007.
- SOARES, R. D. L.; BIASUTTI, E. A. R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C. R.; SILVA, V. D. M.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M. J. B.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bom.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.

STRYER, L. *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

TACO. *Tabela brasileira de composição de alimentos*. 2 ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2006. 113 p. versão II.

VIEIRA, C. R.; SILVA, V. D. M.; SILVA, A. L. S.; AMORIM, A. C. P.; SILVESTRE, M. P. C. Elaboração de hidrolisados protéicos de farinha de arroz destinados a dietoterapia de pacientes com fenilcetonúria. *Rev. Bras. Nutr. Clin*, v. 23, n. 2, p. 83-90, 2008.

Recebido para publicação em 14/04/09.

Aprovado em 11/03/10.