

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estimativa dos teores de fenilalanina em sopas desidratadas
instantâneas: importância do nitrogênio de origem não protéica

Claudia Passos Guimarães

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Ursula M. Lanfer-Marquez

São Paulo

2003

Claudia Passos Guimarães

Estimativa dos teores de fenilalanina em sopas desidratadas instantâneas: importância do nitrogênio de origem não protéica

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez
Orientador/presidente

Prof^a. Dr^a. Deborah Helena M. Bastos

Prof^a. Dr^a. Marilene De Vuono Camargo Penteadó

São Paulo, ____ de _____ de 2003.

Agradecimentos

À Professora Ursula M. Lanfer Marquez pela orientação, confiança e dedicação no desenvolvimento deste trabalho e por acreditar na minha capacidade.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos e B14 Alexandre, Daniela, Elaine, Carissa, Patrícia, Riana, Priscila, Raquel, Céphora e Ana Vlândia pela amizade e pelos momentos divertidos.

Às amigas Renata, Elma e Fabiana pelo companheirismo, pelos momentos tão divertidos e apoio nos momentos difíceis. Esta amizade me ajudou a superar muitos obstáculos. Adoro vocês!

À adorável Inês Maria Henrique pelo carinho, amizade e ajuda incondicional em todos os momentos.

Aos técnicos do Laboratório de Análise de Alimentos e amigos Rosa, Márcio e Magda pelo suporte técnico e pelos momentos alegres e descontraídos.

Ao Jorge, Elaine e Benedita, da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia, pela atenção e pronto atendimento.

Às secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Mônica e Tânia pelo atendimento e simpatia.

Aos funcionários do Laboratório de Informática Luiz, Auriluce e Renato pelo auxílio técnico.

Às bibliotecárias Adriana e Leila pela atenção e revisão das referências bibliográficas.

Ao Victor Belchior pela simpatia e pelas inúmeras ajudas nas encadernações.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Laboratório de Análises da AJINOMOTO INTERAMERICANA, em especial aos funcionários Vanderlei Toledo, Everton Soares Mantovani, Aldeir Soares de Oliveira e Ana Cândido Ursulino de Assis pela atenção e auxílio técnico nas análises de glutamato.

Aos meus queridos pais, Geraldo e Carmem, pelo amor, dedicação, carinho, incentivo e confiança. Os momentos mais difíceis da minha vida só foram superados porque vocês estavam ao meu lado. Amo vocês!

À minha irmã Patrícia que mesmo distante sempre me incentivou com palavras amigas. Obrigada pelo amor incondicional e amizade tão maravilhosa.

Ao Marcelo pelo amor, carinho, paciência e companheirismo. Muito obrigada pela grande ajuda na fase final deste trabalho. Te amo muito.

À todos os meus familiares, em especial tia Sônia, Tião, tia Lena, tio Miguel e Silvane que sempre estiveram muito presentes na minha vida acadêmica.

À Francisca Ana que sempre me tratou como filha com a preocupação de me agradar com seus pratos gostosos. Obrigada pela compreensão e paciência nos meus dias cinzentos.

Ao meu bom DEUS que permitiu que eu estivesse aqui. Com VOCÊ no meu coração sei que nada me faltará.

*Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro
promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar
inovações no seu próprio interior.*

*Estas atitudes se refletirão em mudanças positivas no seu
ambiente familiar.*

*Deste ponto em diante, as mudanças se expandirão em
proporções cada vez maiores.*

Tudo o que fazemos produz efeito, causa algum impacto.

Dalai Lama

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estimar a concentração de Phe em 22 amostras de sopas desidratadas instantâneas, por serem úteis na diversificação do cardápio de fenilcetonúricos. Foi analisada a concentração de glutamato monossódico (GMS) por ser uma provável fonte de N não protéico (NNP) que pode resultar em concentrações protéicas superestimadas. A concentração de proteína real estimada foi realizada após precipitação da proteína com TCA 10%, seguida da análise do N pelo método de Kjeldahl, o qual foi convertido para proteína por um fator de conversão (F_c) adequado. A legislação Brasileira estabelece um F_c de 5,75 para proteínas vegetais, 6,25 para proteínas da carne e misturas de proteínas e 6,38 para proteínas lácteas. A concentração de GMS foi determinada por método enzimático com eletrodo sensível a amônia. A concentração de proteína bruta ($N_{total} \times F_c$) variou entre 6,05 e 21,51%, tendo sido estes valores, na maioria das vezes, similares aos declarados no rótulo, indicando que os fabricantes utilizam o $N_{total} \times F_c$ para expressar o conteúdo protéico. A concentração protéica real estimada foi baixa, variando entre 1,28 e 16,31%. A concentração de NNP teve uma variação de 0,33 a 1,27g/100g de amostra, representando de 11,10 a 81,33% do NT presente. A concentração de GMS variou entre 1,01 e 7,86g/100g de amostra, sendo que o N proveniente deste realçador de sabor contribuiu com 2,53 a 47,71% na quantidade total de N. A diferença entre a concentração de proteína bruta e real estimada se deve à presença de NNP, na forma de GMS. Com base nos valores protéicos reais estimados, foram calculados os teores de Phe que variaram entre 51,16 e 652,24mg de Phe/100g de amostra. Assim, recomenda-se que todos os alimentos adicionados de realçadores de sabor sejam analisados quanto à concentração de proteína real para que a Phe seja corretamente estimada.

SUMMARY

The aim of this work was to estimate the concentration of Phe in 22 samples of commercially available dehydrated soups, as they are useful to add variety to the diet for phenylketonurics. The monosodium glutamate (MSG) contents had been analyzed as it is a likely source of non protein N (NPN) that might result in overestimated protein contents. The true protein content was accomplished after protein precipitation with 10% TCA and followed by N analysis according to the Kjeldahl method, which was converted to protein by a suitable conversion factor (F_c). The Brazilian legislation establishes a F_c of 5,75 for vegetables proteins, 6,25 for meat and blended proteins and 6,38 for milk proteins. The MSG concentration was determined by an enzymatic method employing an ammonia gas-sensitive electrode. The crude protein content (total $N \times F_c$) varied from 6,05 to 21,51% and were similar, in most cases, to those stated on the label, showing that manufacturers use total $N \times F_c$ to express the protein content. Nevertheless, the true protein content was low, varying from 1,28 to 16,31%. The NPN concentration varied from 0,33 to 1,27g/100g of sample, which represents from 11,10 to 81,33% of the existing total N. The MSG concentration varied from 1,01 to 7,86g/100g of sample; the N arose from this flavor enhancer gives about 2,53 to 47,71% of the total quantity of N. The difference between the crude protein and true protein contents is due to the presence of MSG-like NPN. The Phe concentrations were calculated in accordance with the true protein values and varied from 51,16 to 652,24 mg/100g of sample. Thus, we recommend the analysis of all flavor-enhancer-added foods, in order to get reliable results for Phe estimation from the protein contents.

SUMÁRIO

	pág
Resumo	I
Summary	II
1. Introdução	01
2. Revisão da literatura	04
2.1 Fenilcetonúria	04
2.2 Fenilcetonúria materna	07
2.3 Tratamento da fenilcetonúria (PKU)	07
2.4 Determinação da composição em aminoácidos e de fenilalanina nos alimentos	10
2.5 Determinação da concentração protéica em alimentos	12
2.6 Fator de conversão nitrogênio : proteína (N:P)	23
3. Objetivos	36
4. Material e métodos	37
4.1 Material	37
4.1.1 Amostras	37
4.1.2 Reagentes	37
4.2 Métodos	37
4.2.1 Preparo das amostras	37
4.2.2 Análises químicas	38
4.2.2.1 Umidade e nitrogênio total	38
4.2.2.2 Determinação de nitrogênio protéico e não protéico	38
4.2.2.3 Determinação de glutamato monossódico	39

(a) Equipamento	40
(b) Preparo dos reagentes	40
(c) Extração do glutamato monossódico	41
(d) Determinação potenciométrica do glutamato monossódico (GMS)	41
(e) Calibração do equipamento	41
(f) Cálculos	42
5. Resultados e discussão	43
6. Conclusões	62
7. Referências bibliográficas	64

Lista de tabelas

	pág
Tabela 1. Peso molecular, número de átomos de nitrogênio (N) e percentagem de N dos 20 aminoácidos	27
Tabela 2. Fatores de conversão nitrogênio : proteína (N:P) sugeridos por diversos autores	34
Tabela 3. Composição em umidade, nitrogênio total (NT), proteína bruta (NTxF _c) e proteína real estimada (NPxF _c) de sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais	47
Tabela 4. Concentração de nitrogênio total (NT), nitrogênio protéico (NP) e nitrogênio não protéico (NNP) em sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais	52
Tabela 5. Contribuição de nitrogênio não protéico (%NNP), em percentagem, na concentração de nitrogênio total de sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais	53
Tabela 6. Concentração de glutamato monossódico (GMS) nas sopas desidratadas instantâneas	56
Tabela 7. Contribuição do nitrogênio proveniente do glutamato monossódico (%N-GMS), em percentagem, na concentração de nitrogênio total	57
Tabela 8. Concentração de fenilalanina (Phe), em mg/100 g de amostra de sopa desidratada e por porção de 200ml de sopa preparada	60

Lista de figuras

	pág
Figura 1. Comparação entre a concentração de proteína bruta (NTxF _c), declarada no rótulo e real estimada (NPxF _c) de sopas desidratadas instantâneas	48
Figura 2. Contribuição percentual de nitrogênio protéico (NP) e nitrogênio não protéico (NNP) em sopas desidratadas instantâneas	51
Figura 3. Comparação entre a concentração de fenilalanina (Phe), em mg/porção de 200mL de sopa preparada, calculada a partir do teor protéico real estimado (NPxF _c) e declarado no rótulo de sopas desidratadas instantâneas	61

1. Introdução

A fenilcetonúria é uma doença hereditária decorrente do erro inato do metabolismo da fenilalanina, que resulta em atraso intelectual e de desenvolvimento se não for tratada por meio de dietas com quantidades controladas de fenilalanina. Essas dietas incluem fórmula metabólica isenta de fenilalanina e alimentos pobres em proteína para fornecer ao organismo apenas a quantidade de fenilalanina imprescindível para a síntese e regeneração de proteínas, garantindo o desenvolvimento normal da criança.

Embora pareça ser uma tarefa fácil, são muitas as dificuldades encontradas por pais de crianças fenilcetonúricas e profissionais da área na elaboração de cardápios para fenilcetonúricos. As principais dificuldades encontradas são o reduzido número de alimentos com baixo teor protéico, a falta de alimentos industrializados especiais, destinados a esses pacientes e ainda o desconhecimento dos teores de fenilalanina na grande maioria dos alimentos comercializados no país.

Enquanto nos EUA e na Europa já existem Tabelas de Composição de Alimentos, específicas para fenilcetonúricos (SCHUETT, 1995; ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE DIÄTETIK, 1995), contendo principalmente dados sobre alimentos industrializados, a preocupação, aqui no Brasil, com esta parcela da população e o interesse na fabricação de alimentos especiais é apenas incipiente.

A análise quantitativa de fenilalanina tem um custo muito elevado e a quantificação deste aminoácido em alimentos industrializados é muito

difícil, fazendo com que o teor de fenilalanina seja determinado em um número reduzido de alimentos.

Assim, a estimativa da concentração deste aminoácido é feita rotineiramente por cálculo, a partir do teor protéico do alimento, considerando que toda proteína contém de 3 a 5% de fenilalanina em sua composição.

Os métodos utilizados para a determinação do conteúdo total de proteína em alimentos baseiam-se na determinação de nitrogênio total e na conversão deste em proteína, por um fator de conversão adequado. Na maioria dos alimentos, calcula-se que o nitrogênio representa aproximadamente 16% do peso da proteína, assim, em 100g de proteína tem-se 16g de nitrogênio, e $100/16 = 6,25$, que corresponde ao fator de conversão de nitrogênio para proteína. Por esta razão, o fator de conversão é usualmente 6,25. Mas alguns alimentos têm fator de conversão menor ou maior dependendo da proporção de nitrogênio em suas proteínas e da presença de nitrogênio não protéico.

O método comumente utilizado para a determinação de nitrogênio em alimentos é o método de Kjeldahl. Este método baseia-se na análise da concentração de nitrogênio total, quantificando tanto nitrogênio protéico como nitrogênio não protéico, supondo que todo nitrogênio é proveniente de proteína. Este fato pode resultar em valores superestimados de proteína em alimentos que possuem quantidade considerável de nitrogênio não protéico, como é o caso de muitos vegetais e alguns alimentos industrializados.

O propósito deste trabalho foi estudar a fração nitrogenada protéica e não protéica e os teores de fenilalanina em sopas desidratadas de diferentes marcas comerciais. Este estudo se justifica pelo fato destas sopas serem úteis para diversificar o cardápio de pacientes fenilcetonúricos, constituído geralmente por vegetais.

2. Revisão da literatura

2.1 Fenilcetonúria

A hiperfenilalaninemia é o nome genérico dado ao erro inato do metabolismo do aminoácido essencial fenilalanina (Phe), sendo de herança autossômica recessiva. Caracteriza-se por uma deficiência no sistema de hidroxilação deste aminoácido, podendo ser causada pela ausência ou redução da atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase, responsável pela conversão da Phe em tirosina. A deficiência da fenilalanina hidroxilase resulta em níveis tóxicos de Phe no sangue e deficiência de tirosina (CHAMPE E HARVEY, 1994; DUTRA *et al.*, 1986; ACOSTA *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 1999; MIRA E LANFER MARQUEZ, 2000).

Existem diferentes tipos de hiperfenilalaninemias com diferentes denominações, de acordo com o erro metabólico envolvido, tais como fenilcetonúria (PKU) clássica, moderada, leve ou branda, persistente e atípica (BURGARD *et al.*, 1996; DUTRA *et al.*, 1986; KOCH E WENZ, 1987). Alguns autores referem-se à PKU moderada, leve ou branda, persistente e atípica como hiperfenilalaninemias, reservando o termo PKU para a fenilcetonúria clássica.

Alguns autores classificam as hiperfenilalaninemias baseando-se na concentração plasmática de Phe. Concentrações iguais ou superiores a 19,82mg/dL, mudanças nos níveis de tirosina, excreção de diversos metabólitos de Phe na urina, ausência ou redução da atividade da fenilalanina hidroxilase, caracterizam a PKU clássica, sendo esta a de maior gravidade (GREVE *et al.*, 1994, HUNT; BERRY E WHITE, 1985; KOCH E WENZ, 1987).

As demais hiperfenilalaninemias caracterizam-se por uma variação da concentração de Phe no sangue entre 3,96mg/dL a 9,91mg/dL, com atividade da fenilalanina hidroxilase reduzida (KOCH E WENZ, 1987; PASCUAL, 1989).

No Brasil, a classificação do Ministério da Saúde é semelhante à classificação mencionada anteriormente, baseada no percentual de atividade enzimática e nos níveis plasmáticos de Phe encontrados. Caracterizando de PKU clássica quando os níveis plasmáticos de Phe são superiores a 20mg/dL e atividade da fenilalanina hidroxilase inferior a 1% da atividade normal; de PKU leve níveis plasmáticos de Phe entre 10 a 20mg/dL e atividade da enzima entre 1 a 3% e como hiperfenilalaninemia transitória ou permanente quando a atividade enzimática é superior à 3% e os níveis plasmáticos de Phe variam entre 4 a 10mg/dL (Portaria n. 847, de 06 de Novembro de 2002, do Ministério da Saúde).

GÜTTLER e GULDBERG (1996) realizaram estudos com 123 crianças com idade até 5 anos para classificar a PKU de acordo com a tolerância à Phe. Os autores estabeleceram que crianças que toleram menos de 250-350mg de Phe/dia para manter a concentração de Phe sanguínea em 4,96mg/dL apresentam PKU clássica. Crianças que toleram 350-400mg de Phe/dia apresentam PKU moderada. Crianças que toleram 400-600mg de Phe/dia apresentam PKU branda. Crianças que conseguem manter níveis sanguíneos de Phe entre 6,61 a 9,91mg/dL com uma dieta normal, sem restrição de Phe, são classificadas como tendo hiperfenilalaninemia branda.

A PKU atípica é causada por um erro metabólico das enzimas que sintetizam ou reduzem a coenzima tetrahydrobiopterina (BH₄), um cofator essencial na hidroxilação da Phe, elevando indiretamente os níveis de Phe sangüínea. A BH₄ é também requerida pelas enzimas tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase que catalisam as reações que antecedem a síntese dos neurotransmissores serotonina e dopamina (DUTRA *et al.*, 1986; CHAMPE E HARVEY, 1994). A PKU atípica não responde à dietoterapia e o tratamento consiste na administração simultânea de BH₄, 5-hidroxitriptofano, L-Dopa e um inibidor da Dopa descarboxilase, para permitir a penetração da BH₄ no sistema nervoso central e a correção da biossíntese dos neurotransmissores (GIUGLIANI *et al.*, 1983; PASCUAL, 1989).

A PKU pode ocorrer em todos grupos étnicos e, devido à sua grande variabilidade genética, a incidência em recém-nascidos pode variar de 1:2600 a 1:26000 (SCRIVER, KAUFMAN E WOO, 1989). No Brasil, SCHMIDT *et al.* (1987) estimam que na cidade de São Paulo 1:12000 a 1:15000 de recém-nascidos são portadores de PKU clássica, com base em levantamentos realizados em postos de saúde e berçários. Na região sul do país, JARDIM *et al.* (1996) reportam uma razão de 1:12500, estudo o qual o autor não considerou os demais tipos de PKU.

2.2 Fenilcetonúria maternal

Na PKU maternal, a elevada concentração plasmática de Phe da mãe produz uma síndrome clínica característica no feto. Alguns estudos levantam a hipótese de que a alta concentração sanguínea de Phe materna provoca a inibição do transporte competitivo de outros aminoácidos aromáticos, como triptofano e tirosina, para dentro da placenta, acarretando a deficiência de tirosina, provavelmente responsável pela síndrome ocorrida no feto (KUDO E BOYD, 1996). O elevado nível plasmático de Phe na mãe faz com que o nível de Phe no embrião seja ainda maior, devido ao gradiente positivo transplacentário, acarretando a PKU embrionária na maioria dos bebês de mães fenilcetonúricas. O elevado nível plasmático de Phe no feto resulta em baixo peso ao nascer, doença cardíaca congênita e danos cerebrais irreversíveis antes do nascimento, como microcefalia e retardo mental (DAVIDSON, 1989; GUNGOR *et al.*, 1996; KOCH E WENZ, 1987; SHEARD, 2001). Mulheres fenilcetonúricas devem receber dietas especiais, com baixa concentração de Phe antes e durante a gravidez, para reduzir os níveis plasmáticos de Phe. Os danos causados à prole de mães com PKU persistente ou branda são menores que os causados à prole de mães com PKU clássica (KOCH E WENZ, 1987).

2.3 Tratamento da fenilcetonúria (PKU)

Uma vez diagnosticada, o tratamento da PKU clássica e moderada é realizado exclusivamente por meio de uma dieta com baixo teor de fenilalanina, com predominância de alimentos de origem vegetal, visando reduzir os níveis

plasmáticos de Phe para uma concentração próxima à de uma criança normal (0,99-1,32 mg/dL). O tratamento deve ter início nos primeiros meses de vida para evitar o retardo mental, manifestação clínica mais severa da doença. Na ausência de tratamento ou quando o tratamento é iniciado tardiamente, danos severos e irreversíveis no desenvolvimento intelectual e neurológico são inevitáveis e aparecem entre o terceiro e sexto mês de vida caracterizando-se por retardo mental, eczema e hiperatividade (ACOSTA *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 1999; MIRA E LANFER MARQUEZ, 2000).

A intenção da dieta é a de fornecer ao organismo apenas a quantidade de Phe imprescindível para a síntese e regeneração de proteínas, garantindo um desenvolvimento normal da criança. A quantidade de Phe que pode ser ingerida depende dos níveis de Phe no plasma, da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase e da tolerância à Phe, que pode variar de indivíduo para indivíduo. Os requerimentos dos demais nutrientes seguem os padrões para indivíduos saudáveis, estabelecidos para cada faixa etária pela Food and Agriculture Organization, World Health Organization - FAO/WHO (1985) e representam a base para o cálculo e formulação de dietas para pacientes fenilcetonúricos. A manutenção da dieta, mesmo durante a vida adulta, é sugerida por diversos pesquisadores, e tem sido assunto de intensos debates na literatura (CERONE *et al.*, 1999; FITZGERALD *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 1999; KOCH *et al.*, 1996; MIRA E LANFER MARQUEZ, 2000; WEGLAGE *et al.*, 1996). Atualmente, recomenda-se a continuidade do tratamento pela vida inteira, conforme documento elaborado por especialistas, baseado exclusivamente em

evidências científicas, publicado em outubro de 2000 pelo “National Institute of Health” (CONSENSUS STATEMENT – NIH, 2000).

Os alimentos de origem animal são poucos utilizados na dieta dos fenilcetonúricos, resultando em baixa ingestão de proteínas. As necessidades protéicas são supridas, geralmente, por fórmulas especiais contendo misturas de aminoácidos livres isentas de Phe. Apesar desses produtos oferecerem facilidade na prescrição e distribuição aos pacientes, possuem odor e paladar desagradáveis e o custo é elevado (ACOSTA *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 1999; MIRA E LANFER MARQUEZ, 2000).

A formulação de cardápios para pacientes fenilcetonúricos requer o conhecimento preciso do teor de Phe presente nos alimentos, para que se possa controlar a ingestão desse aminoácido. Embora pareça ser uma tarefa fácil, as dificuldades em compor o cardápio para estes pacientes são grandes. Diversas causas podem ser apontadas: primeiramente o reduzido número de alimentos com baixo conteúdo protéico, a falta de alimentos industrializados especiais formulados para esta parcela da população, bem como o desconhecimento dos teores de Phe na grande maioria dos alimentos comercializados no país (GUIMARÃES E LANFER MARQUEZ, 2002).

2.4 Determinação da composição em aminoácidos e de fenilalanina nos alimentos

O elevado custo da análise quantitativa de Phe por métodos instrumentais tais como, cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, além da dificuldade em quantificar este aminoácido nos alimentos industrializados de formulação complexa, faz com que a concentração de fenilalanina seja determinada em um número reduzido de alimentos. A análise direta de aminoácidos costuma ser feita, na maioria das vezes, em alimentos com elevado teor protéico, como carnes, ovos, leite, sementes de leguminosas e cereais, visando avaliar o valor nutricional da proteína, a partir do seu perfil de aminoácidos (LOURENÇO *et al.*, 1998; LANFER MARQUEZ E PENTEADO, 1997). Dessa forma, as informações sobre as concentrações de aminoácidos, em especial da Phe, em alimentos com baixa concentração protéica são escassas, pois não há interesse em quantificar aminoácidos em alimentos que não são considerados fontes de proteína.

A concentração de Phe pode ser determinada também por método fluorimétrico, baseado em uma reação da Phe com a ninhidrina, na presença de um peptídeo, produzindo um composto fluorescente. Porém, este método não é apropriado para quantificar Phe na presença de aminoácidos aromáticos, tais como tirosina, triptofano e prolina que apresentam o mesmo comportamento da Phe. Este método é utilizado apenas para quantificar Phe livre em materiais biológicos, como urina, soro e tecidos (MCCAMAN E ROBINS, 1961).

Assim, em alimentos com reduzido teor protéico, a estimativa da concentração de Phe costuma ser feita por cálculo, a partir da concentração de proteína no alimento e da porcentagem de Phe nesta proteína (LANFER MARQUEZ E PENTEADO, 1997). A concentração de Phe na proteína pode variar entre 3 a 5% (BREMER, ANNINOS E SCHULZ, 1996), sendo que nenhuma proteína é isenta de Phe. Dessa forma, a precisão da estimativa da concentração de Phe depende, primeiramente, da exatidão da análise de proteína.

2.5 Determinação da concentração protéica em alimentos

Inúmeros métodos foram desenvolvidos para determinar a concentração protéica em alimentos. Os métodos diretos baseados em reações colorimétricas e os métodos indiretos, como o método de *Kjeldahl* e método de *Dumas*, são os mais utilizados para este propósito. A espectroscopia de infravermelho próximo é um método alternativo que também vem sendo empregado mais recentemente para estimar o conteúdo protéico de alimentos, e tem se mostrado uma ferramenta eficiente para controlar a linha de produção industrial de alimentos. Contudo, não é um método apropriado para análises quantitativas precisas (KRISHNAN *et al.*, 1994; ALMENDINGEN *et al.*, 2000).

Dentre os métodos colorimétricos utilizados mais rotineiramente na determinação de proteína estão o método de *Bradford* (1976), *Lowry* (1951), Biureto, Bicinchonínico (BCA) e absorção em ultravioleta (UV) a 280nm. Estes métodos são baseados em propriedades específicas das proteínas, resíduos específicos de aminoácidos na proteína ou ligações peptídicas presentes na proteína ou em peptídeos, e exigem extração, isolamento e, em algumas vezes, purificação prévia da proteína, sendo mais apropriados para quantificar proteínas em solução (SIMONNE *et al.*, 1997).

O método de *Bradford* baseia-se na reação colorimétrica da proteína com um corante orgânico (*Coomassie Brilliant Blue G*) que reage quantitativamente com a proteína, formando um complexo de coloração azul e a absorbância da solução pode ser lida em comprimento de onda de 595nm. É um método simples, rápido e de baixo custo, pois requer apenas um reagente e

a reação ocorre em menos de 5 minutos (BRADFORD, 1976; PETERSON, 1983; STOSCHECK, 1990). Tem sido muito utilizado para quantificar proteínas purificadas em solução de origem animal e microbiana (MARKS, BUCHSBAUM E SWAIN, 1985; JONES, HARE E COMPTON, 1989). Porém, estas proteínas devem estar com a estrutura intacta após o processo de extração, pois o corante reage principalmente com os resíduos ou cadeias laterais de arginina e em menor grau com a histidina, lisina, tirosina, triptofano, e fenilalanina (COMPTON E JONES, 1985; STOSCHECK, 1990; DANELL E EAKER, 1992; CONKLIN-BRITAIN *et al.*, 1999). O método de *Bradford* pode sofrer interferência de detergentes iônicos e não iônicos, não sendo um método recomendado para a análise de proteína de membranas celulares, onde é necessária a utilização de detergentes no processo de extração deste tipo de proteína (BRADFORD, 1976; PETERSON, 1983; STOSCHECK, 1990). Além disso, o corante *Coomassie Brilliant Blue G* não reage de maneira uniforme com todas as proteínas, podendo ocorrer uma variação na intensidade da coloração da solução, sendo impróprio para comparar a concentração protéica de alimentos que apresentam uma composição variada de proteína ou que sejam provenientes de diferentes espécies vegetais (MARKS, BUCHSBAUM E SWAIN, 1985; KANAYA E HIROMI, 1987).

O método de *Lowry* é freqüentemente utilizado na determinação de proteínas em líquido, plasma sanguíneo, saliva humana, tecido animal, suco biliar, membranas, leite humano, plantas, e produtos alimentícios (ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). O princípio do método baseia-se na reação de complexação dos íons de cobre, em condições alcalinas, com os resíduos

dos aminoácidos aromáticos, tirosina e triptofano. O complexo formado reage com o reagente Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico), formando uma solução de coloração azulada com absorção máxima em 750nm (LOWRY *et al.*, 1951; PETERSON, 1983; STOSCHECK, 1990; ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). Apesar de ser um método sensível, simples e rápido para a determinação da concentração de proteína, o método de *Lowry* apresenta algumas desvantagens. O fenol pode reagir com compostos fenólicos, comumente presentes em quantidades significativas na maioria dos vegetais, sendo necessária uma etapa adicional para isolar a proteína ou remover os compostos fenólicos (MARKS, BUCHSBAUM E SWAIN, 1985; CONKLIN-BRITTAIN *et al.*, 1999). O método de *Lowry* está sujeito a muitos interferentes, tais como agentes acidificantes ou redutores do cobre, agentes quelantes, lipídeos, açúcares, sulfato de amônio, tampão tris-HCl e alguns íons, como K^+ , Na^+ e Mg^{2+} (BRADFORD, 1976; PETERSON, 1983; STOSCHECK, 1990; ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). O reagente Folin-Ciocalteu reage, principalmente, com os resíduos de triptofano e tirosina, o que pode resultar em uma variação na intensidade da coloração da solução, uma vez que a proporção destes aminoácidos varia de proteína para proteína, não sendo, assim, recomendado para alimentos que contêm misturas complexas de proteína e para comparar a concentração protéica entre diferentes espécies vegetais (LOWRY *et al.*, 1951; MARKS, BUCHSBAUM E SWAIN, 1985; KANAYA E HIROMI, 1987; STOSCHECK, 1990; ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998).

O método do biureto tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas em plasma sangüíneo, urina, saliva, fibrinogênio, tecido animal e alimentos, como cereais e feijão. É considerado um método rápido, de baixo custo e não apresenta grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas (NOLL, SIMMONDS E BUSHUK, 1974; SODEK *et al.*, 1976; ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998; ZAIA, VERRI E ZAIA, 2000). Seu princípio básico é a reação, em condições alcalinas, entre sais de cobre e compostos que apresentam duas ou mais ligações peptídicas, resultando na formação de um complexo de coloração púrpura. A solução resultante apresenta duas bandas de absorção, uma em 270nm e outra em 540 nm, e a intensidade da coloração da solução é proporcional à concentração de proteína. Apesar da banda na região de 270nm aumentar a sensibilidade do método, o comprimento de onda 540nm é mais utilizado para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270nm, causando muita interferência no método (ROBINSON E HODGEN, 1940; KANAYA E HIROMI, 1987; ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). A presença de pigmentos pode interferir na análise, sendo necessário, como no caso da análise das proteínas do feijão, por exemplo, a remoção prévia da casca que contém os pigmentos (SODEK *et al.*, 1976). Uma extração prévia da proteína deve ser feita em alimentos ricos em carboidratos e lipídeos, pois a presença destas substâncias pode tornar a solução turva, o que impede a leitura espectrofotométrica. Os sais de cobre podem reagir com peptídeos de baixo peso molecular, sendo necessário um pré-tratamento como diálise ou

precipitação da proteína para remover as substâncias de baixo peso molecular (KANAYA E HIROMI, 1987).

O método do ácido bicinchonínico (BCA) é uma modificação do método de *Lowry*, feita com o objetivo de minimizar os efeitos de substâncias interferentes. O reagente Folin-Ciocalteu é substituído pelo reagente BCA que é mais estável em condições alcalinas e tem a vantagem de ser mais simples no preparo dos reagentes. O método do BCA é tão sensível quanto o método de *Lowry* e relativamente rápido, sendo aplicado na determinação de proteínas em células, leite e outros produtos alimentícios (ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). O princípio do método do BCA baseia-se na reação do Cu^{2+} com proteínas, em meio alcalino, produzindo Cu^+ e formando um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de 560nm. Por ser um reagente mais específico para complexar o Cu^+ , o BCA diminui a possibilidade que outras substâncias reduzam o Cu^{2+} para Cu^+ (SMITH *et al.*, 1985; STOSCHEK, 1990; ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). Porém, a variação na intensidade da coloração da solução, quando se quantifica diferentes tipos de proteínas, apesar de ser menos acentuada do que no método de *Lowry*, também é observada neste método (SMITH *et al.*, 1985; STOSCHEK, 1990; SCHOEL, WELZEL E KAUFMANN, 1995). O método BCA apresenta também dependência da temperatura de incubação das amostras e variação da absorbância com o tempo (ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). O método do BCA pode ser utilizado como um método alternativo em situações em que o método de *Lowry* não puder ser aplicado,

porém é necessário um estudo prévio para verificar a compatibilidade do método com o tipo de amostra a ser analisada.

O método de absorção de luz ultravioleta (UV) a 280nm vem sendo muito utilizado no monitoramento da concentração protéica durante processos de isolamento e purificação de proteínas em sistemas cromatográficos, por ser um método rápido, não destrutivo, onde a análise é feita diretamente na amostra em solução, sem adição de reagentes. Os aminoácidos triptofano e tirosina são responsáveis pela máxima absorção na região de UV em comprimento de onda a 280nm. Sua aplicação é limitada, pois diversas substâncias absorvem no comprimento de onda referido tornando os resultados pouco confiáveis (PETERSON, 1983; STOSCHEK, 1990). Os ácidos nucleicos também são fortemente absorvidos no mesmo comprimento de onda, sendo necessário fazer a leitura da amostra nos comprimentos de onda a 260 e 280nm. A concentração de proteína da amostra deverá ser calculada pela razão entre as duas absorbâncias levando-se em conta o fator multiplicador verificado na Tabela de Estimativa de Proteína por Absorção Ultravioleta (LAYNE, 1957) para o comprimento de onda de 280nm. O princípio do método de absorção de luz UV em 280nm sugere que este método não é apropriado para quantificar proteínas pobres em triptofano e tirosina, como, por exemplo, a gelatina, devido à baixa absorção no comprimento de onda indicado (PETERSON, 1983; STOSCHEK, 1990).

Os métodos colorimétricos e espectroscópicos são úteis na determinação de proteínas solúveis, mas não são adequados para alimentos

de matriz complexa e contendo uma variedade de proteínas com solubilidades distintas.

A espectroscopia de infravermelho próximo é um método alternativo que também pode ser utilizado para estimar o conteúdo protéico de alimentos, e seu uso tem crescido significativamente nos últimos anos. É um método amplamente utilizado para analisar nutrientes do milho, trigo, soja, leite e derivados (ORMAN E SCHUMANN, 1991; LEE, JEON E HARBERS, 1997), além de ser uma ferramenta promissora para monitorar a coagulação do queijo (LAPORTE E PAQUIN, 1999). É um método preciso, não destrutivo, rápido e não necessita de preparação prévia da amostra. É baseado na propriedade dos diferentes grupos funcionais presentes nos alimentos absorverem diferentes frequências de radiação, assim, as proteínas e peptídeos são absorvidos em faixas características de luz infravermelha. Pela irradiação de um alimento com o comprimento de onda de infravermelho específico para um dado composto, é possível estimar a concentração deste composto pela energia refletida ou transmitida pelo alimento, e esta energia é inversamente proporcional à energia absorvida. Seu uso ainda é limitado, pois é um método dispendioso e requer o uso de equipamentos de alto custo que devem ser calibrados adequadamente para cada tipo de composto a ser quantificado (ORMAN E SCHUMANN, 1991; KRISHNAN, *et al.*, 1994; ALBANELL *et al.*, 1999; ALMENDINGEN *et al.*, 2000).

O método de *Kjeldahl* (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995) e de *Dumas* são métodos indiretos, especialmente indicados para amostras sólidas, baseados na quantificação da concentração

de nitrogênio, sendo este convertido para proteína por um fator de conversão adequado. O método de *Kjeldahl* é o método oficial para determinação da concentração de proteínas, a partir da concentração de nitrogênio total. O método de *Dumas* tem o mesmo princípio do *Kjeldahl*, porém o método de *Kjeldahl* é atualmente o mais utilizado na determinação de nitrogênio total (BARRETO, 1990, STOSCHECK, 1990, SIMONNE *et al.*, 1997).

O método de *Dumas* baseia-se na conversão, por combustão, de toda forma de nitrogênio presente na amostra em óxidos de nitrogênio gasosos (No_x), redução destes gases à N_2 , seguida da quantificação do N_2 em cromatógrafo gasoso, utilizando detector de condutividade térmica (SIMONNE *et al.*, 1997).

O método de *Kjeldahl* consiste basicamente na digestão da amostra, onde o N total é convertido em amônio (NH_4^+), e este é quantificado por titulação com solução fatorada de ácido clorídrico. A concentração de N total (NT) é convertida para proteína por um fator de conversão nitrogênio-proteína (N:P) adequado. Na maioria dos alimentos o N corresponde aproximadamente a 16% do peso da proteína, o que implica indiretamente que em 100g de proteína tem-se 16g de N, e $100/16 = 6,25$, que corresponde ao fator de conversão de N:P. Dessa maneira, quando a concentração de N total é convertida em proteína utilizando o fator de conversão 6,25, considera-se que todo N recuperado durante a digestão é proveniente, principalmente, da proteína e que a contribuição de substâncias nitrogenadas não protéicas, como N inorgânico (nitrato, nitrito) e outras fontes de N orgânico (nucleotídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos livres,

pequenos peptídeos, quitina, clorofila), é desprezível. O fator de conversão N:P 6,25 foi estabelecido por JONES já em 1931, para proteínas da carne, que contêm 16% de nitrogênio na sua constituição e uma quantidade reduzida de N não protéico. Contudo, o fator de conversão 6,25 não pode ser aplicado universalmente a todos os alimentos, pois a porcentagem de nitrogênio na proteína é variável em função da composição em aminoácidos, além da presença de nitrogênio de outras origens. Assim, o teor proteína bruta (NTx6,25) de alimentos que contêm quantidades significativas de N não protéico é provavelmente superestimado, pois o método de *Kjeldahl* baseia-se na análise da concentração de N total e não na concentração de N protéico (NP), convertendo para proteína tanto N protéico como N não protéico (TOKORO *et al.*, 1987; LUCAS *et al.*, 1988; MOSSÉ, 1990; SOSULSKI E IMAFIDON, 1990; DANELL E EAKER, 1992; HERNÁNDEZ *et al.*, 1995; TSHINYANGU E HENNEBERT, 1996; YEOH E TRUONG, 1996; SALO-VÄÄNÄNEN E KOIVISTOINEN, 1996; SIMONNE *et al.*, 1997; LOURENÇO *et al.*, 1998).

TOKORO *et al.* (1987) estudaram a fração nitrogenada de alguns vegetais comuns no Japão, entre eles repolho, cenoura, repolho chinês, pepino, berinjela, alface, cebola, espinafre e tomate. Os autores verificaram que o espinafre apresentou a maior concentração de N protéico (71%) e a cebola apresentou a menor concentração (27,2%). A porcentagem de N proveniente de aminoácidos em todos os vegetais, com exceção do espinafre, variou entre 23 a 44%, e aproximadamente metade da

concentração de N total do repolho, cenoura, repolho chinês, pepino, berinjela, alface, cebola e tomate corresponde ao N de origem não protéica.

Um estudo feito por IMAFIDON e SOSULSKI (1990)^a em alimentos de origem animal e vegetal mostrou que o N dos ácidos nucléicos representa 0,1 a 9,6% do N total. Estes mesmos autores estudaram a concentração de N não protéico em alimentos de origem animal e vegetal e verificaram que produtos cárneos, lácteos, ovos e cereais apresentam baixa concentração de N não protéico, variando entre 0,6 a 4,4%, porém, alguns alimentos de origem vegetal, como tubérculos, raízes, folhas e frutas, apresentam uma concentração de N não protéico maior, variando entre 6,5 a 28,8% (IMAFIDON E SOSULSKI, 1990)^b.

DANELL e EAKER (1992) realizaram um estudo comparativo entre a concentração protéica de cogumelo comestível (*Cantharellus cibarius*), determinada pela análise de N, utilizando o método de *Kjeldahl*, e pela análise de aminoácidos. O valor da concentração de proteína bruta (NTx6,25) (166g de proteína/kg de amostra seca), era aproximadamente 68% superior ao valor obtido pela análise de aminoácidos (99g de proteína/kg de amostra seca), provavelmente superestimado pela presença de quitina, uréia e nucleotídeos.

Outros autores estudaram a concentração protéica de cogumelos comestíveis e determinaram um fator de conversão específico para estes vegetais, como FUJIHARA *et al.* (1995) que determinaram os fatores de conversão de 13 espécies de cogumelos comestíveis e sugeriram um valor médio de $5,99 \pm 0,16$. Os autores observaram também que a concentração

de N não protéico representava, em média, 33% da concentração de N total. Os autores compararam os valores obtidos a partir da somatória do peso dos resíduos de aminoácidos com a concentração protéica, calculada pelo tradicional fator de conversão 6,25, e encontraram diferenças significativas entre os dois valores. Porém, a concentração protéica, calculada a partir da concentração de N total, subtraída da concentração de N não protéico, então multiplicada pelo fator de conversão específico para os cogumelos comestíveis ($5,99 \pm 0,16$), apresentou valores bem próximos aos da somatória do peso dos resíduos de aminoácidos.

IZHAKI (1993) estudou a influência de substâncias nitrogenadas não protéicas na determinação da concentração protéica, a partir da concentração de N total de *Kjeldahl*, em frutas com caroço. O autor observou que em algumas espécies, a concentração de N não protéico representava 50% ou mais da concentração de N total, entretanto, algumas espécies de frutas apresentavam uma concentração de N não protéico que representava menos do que 20% da concentração de N total. Estes resultados revelam que a concentração de N não protéico pode variar amplamente entre as espécies de frutas, interferindo consideravelmente nos teores protéicos estimados pelo método de *Kjeldahl* e invalidando freqüentemente comparações entre teores protéicos destes vegetais. Portanto, a concentração protéica de diferentes espécies de frutas com caroço, determinada a partir da concentração de N total de *Kjeldahl*, multiplicada pelo fator de conversão 6,25, pode estar superestimada ou mesmo subestimada.

2.6 Fator de conversão nitrogênio : proteína (N:P)

O fator de conversão N:P 6,25 é amplamente utilizado para estimar a concentração de proteína bruta em alimentos industrializados e de origem vegetal, como frutas e legumes. Entretanto, estes alimentos costumam apresentar um conteúdo de N diferente de 16% em suas proteínas e quantidades apreciáveis de N não protéico. Como o método de *Kjeldahl* não distingue N não protéico de N protéico, alguns autores recomendam que a concentração de N não protéico seja subtraída da concentração de N total de *Kjeldahl*, ou que seja feita uma extração prévia da proteína para se obter um valor mais próximo da concentração real de proteína (SOSULSKI E IMAFIDON, 1990; IZHAKI, 1993; FUJIHARA *et al.*, 1995; LEVEY, BISSEL E O'KEEFE, 2000; LOURENÇO *et al.*, 2002). A determinação de fatores de conversão N:P específicos para alimentos ou grupos de alimentos também é uma alternativa para se obter um teor protéico que represente uma aproximação do verdadeiro teor de proteína do alimento.

Na literatura encontramos muitos trabalhos que descrevem formas diferentes de calcular o fator de conversão N:P. Basicamente, o fator de conversão N:P pode ser definido como a razão entre a concentração total de proteína e a concentração de nitrogênio total do alimento. Teoricamente, esta definição parece clara e simples, entretanto, podem surgir algumas dúvidas em torno do conteúdo de N contido nas proteínas que pode variar de proteína para proteína, e a origem do N total pode não ser proveniente exclusivamente das proteínas.

O fator de conversão N:P costuma ser determinado, por cálculo, de três formas diferentes. A primeira corresponde à razão entre a somatória do peso total dos resíduos dos 20 aminoácidos protéicos (AAres) recuperados após a hidrólise ácida da proteína e a somatória do conteúdo de N destes mesmos aminoácidos (AAN), excluindo o conteúdo de N amídico (-NH₂) da glutamina e asparagina, resultando na equação $F_c = (\Sigma AAres / \Sigma AAN)$ (YEOH E WEE, 1994; YEOH E TRUONG, 1996).

Os aminoácidos glutamina e a asparagina são desaminados durante a hidrólise ácida e quantificados na forma de ácido glutâmico e ácido aspártico, respectivamente. O N liberado destes aminoácidos é quantificado na forma de amônia (NH₃). Assim, os conteúdos de ácido glutâmico e ácido aspártico quantificados na análise de aminoácidos, podem corresponder ao ácido glutâmico + glutamina e ácido aspártico + asparagina, respectivamente, sendo representados pelas siglas Glx e Asx (MOSSÉ, 1990; YEOH E WEE, 1994; YEOH E TRUONG, 1996). Neste caso, não é possível diferenciar a origem do NH₃, podendo ser proveniente da proteína, do pool de aminoácidos livres ou de outras origens.

A segunda forma é pela razão entre a somatória do peso total dos AAres e a somatória de AAN, entretanto, incluindo o conteúdo de N amídico da glutamina e asparagina. A amônia recuperada após a hidrólise ácida corresponde, grosso modo, ao N proveniente da desamidação da glutamina e da asparagina (MOSSÉ, 1990; YEOH E WEE, 1994; FUJIHARA *et al.*, 1995; YEOH E TRUONG, 1996).

A terceira forma de calcular o fator de conversão N:P é pela razão entre a somatória de AAres e a concentração de N total, determinado pelo método de *Kjeldahl* ($\Sigma\text{AAres}/\text{NT}$). Esta concentração de N total pode corresponder tanto ao N de origem protéica como não protéica e tem um valor prático, considerando a contribuição do N de ambas as fontes, e tende a ser menor do que os outros fatores calculados pelas outras duas formas (YEOH E WEE, 1994; YEOH E TRUONG, 1996).

Assim, o fator de conversão vai variar em função da concentração de N que é considerada no cálculo. Nas duas primeiras definições citadas anteriormente, a relação para o cálculo do fator é baseada exclusivamente na somatória dos pesos dos aminoácidos, dividida pelo total de N proveniente desses mesmos aminoácidos. Na terceira definição, o denominador da razão corresponde ao N total (*Kjeldahl*), geralmente superior ao N dos aminoácidos devida à inclusão de N não protéico. Portanto, o fator de conversão calculado pela $\Sigma\text{AAres}/\Sigma\text{AAN}$ é maior que o fator de conversão calculado pela $\Sigma\text{AAres}/\text{NT}$ (MOSSÉ, 1990; YEOH E TRUONG, 1996; LOURENÇO *et al.*, 2002).

Outro fator importante que pode influenciar de maneira significativa no cálculo do fator de conversão N:P, é a variação no perfil de aminoácidos da proteína. As proteínas alimentares isoladas possuem de 13,4 a 19,1% de nitrogênio em sua composição, sendo que esta variação é devida ao desbalanceamento na composição de aminoácidos. Algumas proteínas, por exemplo, as proteínas do ovo, carne, arroz, ervilha e feijão, são ricas em aminoácidos com alta proporção de nitrogênio, como a arginina, lisina, e

histidina, conhecidos como aminoácidos básicos. Já as proteínas do leite, queijo, milho, batata e trigo são ricas em aminoácidos que apresentam reduzido conteúdo de nitrogênio, como ácido aspártico, ácido glutâmico, tirosina, glicina, serina, treonina, chamados de aminoácidos ácidos. Esta variação na proporção de N é explicada pelo fato de cada aminoácido apresentar peso molecular próprio e um número de átomos de N que varia entre 1 e 4, como mostra a **Tabela 1**. As proteínas ricas em aminoácidos básicos tendem a apresentar um fator de conversão N:P inferior ao das proteínas ricas em aminoácidos ácidos. Alimentos com elevadas concentrações de aminoácidos multi-N, ou seja diferentes de 1, terão fatores de conversão N:P significativamente diferentes (TKACHUK, 1969, LOURENÇO *et al.*, 1998, SOSULSKI E IMAFIDON, 1990).

Tabela 1. Peso molecular, número de átomos de nitrogênio (N) e percentagem de N dos 20 aminoácidos

<i>Aminoácido</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>N. ° de átomos de N</i>	<i>% N no aminoácido</i>
Arginina	174,2	4	32,1
Histidina	155,2	3	27,1
Lisina	146,2	2	19,2
Asparagina	132,1	2	21,2
Glutamina	146,1	2	19,2
Glicina	75,1	1	18,6
Alanina	89,1	1	15,7
Triptofano	204,2	2	13,7
Serina	105,1	1	13,3
Prolina	115,1	1	12,2
Valina	117,1	1	12,0
Treonina	119,1	1	11,8
Cisteína	121,2	1	11,6
Isoleucina	131,2	1	10,7
Leucina	131,2	1	10,7
Ácido Aspártico	133,1	1	10,5
Ácido Glutâmico	147,1	1	9,5
Metionina	149,2	1	9,4
Fenilalanina	165,2	1	8,5
Tirosina	181,2	1	7,7

Outra definição que merece atenção quando se discute o cálculo de fator de conversão N:P é o peso dos, assim chamados, “resíduos de aminoácidos”, termo utilizado quando o aminoácido está inserido na proteína. Os aminoácidos estão ligados entre si por ligações peptídicas que por sua vez são formadas pela remoção de uma molécula de água do grupo carboxila de um aminoácido e do grupo α -amino do outro aminoácido, formando cadeias de aminoácidos. Porém, durante a hidrólise ácida estas

ligações são rompidas, e as moléculas de água anteriormente removidas são agregadas novamente aos aminoácidos. Dessa forma, o peso dos resíduos de aminoácidos é calculado, subtraindo-se o peso da molécula de água, removida durante a formação da ligação peptídica, do peso de cada aminoácido, seguindo-se a proporção existente entre o peso molecular de cada aminoácido e o peso molecular da água. O valor obtido representará o conteúdo real de proteína da amostra (TKACHUK, 1969; SOSULSKI E IMAFIDON, 1990; FUJIHARA *et al.*, 1995; FUJIHARA, KASUGA E AOYAGI, 2001).

Em estudos com vegetais comumente consumidos no Japão, TOKORO *et al.* (1987) calcularam o fator de conversão dividindo a concentração protéica de cada vegetal, incluindo os aminoácidos livres, pela respectiva concentração de N total, obtida pelo método de *Kjeldahl*. A concentração protéica foi determinada pela precipitação da proteína com TCA 10% seguida da análise de N pelo método de *Kjeldahl* e os aminoácidos livres por reação com ninhidrina. O valor médio do fator de conversão para converter N em proteína dos vegetais estudados foi de $4,66 \pm 0,12$.

YEOH e WEE (1994) calcularam o fator de conversão de 90 espécies vegetais, utilizando as três formas anteriormente mencionadas. Os autores chamaram de K_A o fator de conversão calculado a partir do conteúdo de nitrogênio recuperado de cada aminoácido, após a hidrólise ácida, excluindo o N amídico da glutamina e asparagina; de K_A' o fator de conversão que inclui no cálculo o nitrogênio proveniente da amônia recuperada durante a hidrólise ácida; e de K_P o fator de conversão calculado com a concentração de N total, determinado pelo método de *Kjeldahl*. Os

autores concluíram que o fator de conversão K_P é o mais apropriado para estimar a concentração protéica das espécies vegetais estudadas, sugerindo um valor médio de $4,43 \pm 0,40$ para uma estimativa prática e rápida da concentração protéica a partir da análise do N total.

SOSULSKI e IMAFIDON (1990) estudaram a composição de aminoácidos de alimentos de origem animal e vegetal e determinaram seus respectivos fatores de conversão N:P. Os fatores de conversão foram calculados a partir da razão entre a somatória do peso total dos resíduos dos aminoácidos e a somatória do conteúdo de N dos mesmos aminoácidos, incluindo o N proveniente do NH_3 que corresponde ao fator de conversão K_A , estabelecido por YEOH e WEE (1994). Os alimentos lácteos apresentaram fatores de conversão que variaram entre 6,02 a 6,15, enquanto os fatores de conversão do ovo, da carne e dos cereais variaram entre 5,61 a 5,93. Os legumes, as verduras e as frutas apresentaram uma variação maior, apresentando fatores de conversão entre 5,14 e 6,26. A concentração protéica de cada alimento, determinada pela multiplicação da concentração de N total pelo respectivo fator de conversão, resultou em valores discretamente maiores do que os valores obtidos a partir da concentração do total de aminoácidos. Os autores recomendam o uso de fatores de conversão específicos para cada alimento, para obter valores de concentração protéica mais próximos aos reais.

SALO-VÄÄNÄNEN e KOIVISTOINEN (1996) realizaram um estudo comparativo entre a concentração de proteína bruta ($NT \times 6,25$) e concentração protéica real, determinada pela soma dos resíduos de

aminoácidos, em diferentes grupos de alimentos, dentre eles leite e derivados, carne e produtos cárneos, peixes e derivados, cereais, frutas e diversos alimentos processados. Verificaram que peixes, carnes e produtos derivados destes apresentaram quantidades maiores de N não protéico do que os outros produtos investigados (leite e derivados, cereais, pães e frutas). Os autores calcularam um fator de conversão N:P específico (somatória dos resíduos de aminoácidos/NT), correspondente ao K_p , para cada alimento estudado e um fator de conversão N:P médio (análise de regressão linear entre os valores da somatória dos resíduos de aminoácidos e N total). A concentração de proteína, calculada a partir da multiplicação do fator de conversão médio pelo N total de *Kjeldahl*, resultou em valores muito próximos aos da concentração de proteína real, determinada pela somatória dos resíduos de aminoácidos. Os fatores de conversão N:P específicos foram, em média, 5 a 20% menores que o fator de conversão N:P 6,25, e o fator de conversão N:P médio foi aproximadamente 15% menor que o fator 6,25, indicando que uma quantidade significativa de N era proveniente de substâncias nitrogenadas não protéicas.

FUJIHARA, KASUGA e AOYAGI (2001) calcularam os fatores de conversão para determinar a concentração protéica, a partir da concentração de N total., de vários vegetais como repolho, cenoura, repolho chinês, pepino, berinjela, alface, cebola, abóbora, espinafre e tomate. Os autores utilizaram a definição do K_p pra calcular o fator de conversão destes vegetais. Os fatores de conversão específicos, determinados para cada vegetal, foram menores que o fator de conversão 6,25 comumente utilizado,

e o valor do fator médio foi 4,39. Os autores verificaram, a partir da análise de aminoácidos, que o N proveniente dos aminoácidos, ligados a proteína ou livres, representavam 73% da concentração de N total, e os 27% restantes poderiam representar outras substâncias nitrogenadas, que provavelmente superestimam a concentração de proteína quando o fator 6,25 é utilizado. Os autores sugerem que a somatória dos resíduos de aminoácidos seja utilizada para estimar, com exatidão, a concentração de proteína. Para alguns vegetais, o uso do fator de conversão específico multiplicado pela concentração de N total, subtraída da concentração de N não protéico, também resulta em valores similares aos da somatória dos resíduos de aminoácidos.

Na **Tabela 2**, apresentamos fatores de conversão sugeridos por diversos autores. É possível observar que o fator de conversão sugerido por um autor é diferente do fator sugerido por outros autores para o mesmo alimento. Por exemplo, SALO-VÄÄNÄNEN e KOIVISTOINEN (1996) sugerem um fator de conversão de 5,17 para a carne, já SOSULSKI e IMAFIDON (1990) sugerem um fator de conversão de 5,72. Os valores de concentração protéica calculados a partir dos fatores de conversão sugeridos para carne (5,17 e 5,72) apresentam uma variação de aproximadamente 10%. Apesar dessa diferença, a utilização de diferentes fatores de conversão para o cálculo da concentração de proteína de um dado alimento, a partir da concentração de N total, não ocasionaria prejuízos em dietas de indivíduos saudáveis, sem erros no metabolismo de aminoácidos, ou para a rotulagem nutricional de alimentos e bebidas embalados. Porém, para os pacientes fenilcetonúricos que necessitam controlar rigorosamente a

ingestão do aminoácido Phe, cuja concentração é estimada a partir do teor protéico, a escolha de um fator de conversão N:P correto para converter N para proteína é de crucial importância. A utilização de um fator de conversão específico para cada tipo de alimento, pode resultar em estimativas de concentração protéica muito próximas aos da concentração protéica real, tornando a estimativa do teor de Phe mais precisa.

As variações entre os fatores de conversão para o mesmo alimento, observadas na **Tabela 2**, são devidas, provavelmente, à forma de cálculo utilizada pelos autores para determinar o fator de conversão. Os valores dos fatores de conversão calculados segundo o K_P são menores que os calculados segundo K_A , isto porque no cálculo do K_P inclui-se a quantidade total de N presente, ou seja, N protéico e não protéico. Já no cálculo do K_A considera-se apenas o N proveniente exclusivamente da proteína.

A Legislação Brasileira (Resolução RDC n. 40 de 21 março de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelece que a concentração de proteína de um alimento deve ser determinada pelo método de *Kjeldahl*, e recomenda a utilização de três fatores de conversão N:P distintos, diferenciados por grupo de alimento, sendo 5,75 para proteínas vegetais, 6,25 para proteínas da carne ou misturas de proteínas e 6,38 para proteínas lácteas. Dessa forma, quando utilizamos os fatores estabelecidos pela Legislação, não consideramos a presença de N de origem não protéica, o que resulta em uma superestimação da concentração protéica, pois se converte para proteína tanto N protéico como não protéico. Estes valores diferem significativamente dos fatores de conversão sugeridos pelos

diversos autores mencionados, em diferentes grupos de alimentos, apresentados na **Tabela 2**. Porém, estes valores de fator de conversão estabelecidos pela legislação brasileira podem representar uma média dos fatores de conversão sugeridos por diversos autores e o conteúdo protéico calculado a partir desses fatores de conversão já representam uma aproximação aos valores reais de proteína.

Um outro problema verificado é que a maioria dos alimentos industrializados contém substâncias nitrogenadas não protéicas e o conteúdo protéico declarado no rótulo é calculado pela multiplicação do teor de N total por 6,25, 5,75 ou 6,38 dependendo da origem da proteína. Muitos destes alimentos poderiam ser utilizados por pacientes fenilcetonúricos, se o teor real de proteína fosse conhecido. As indústrias alimentícias optam por multiplicar a concentração de N total (*Kjeldahl*) pelos fatores de conversão estabelecidos pela legislação, sem no entanto, considerar a presença de N não protéico que superestima os teores de proteína.

Tabela 2. Fatores de conversão nitrogênio : proteína (N:P) sugeridos por diversos autores

Alimento	Fator de conversão N:P	Referência
Abóbora	4,27	Fujihara <i>et al.</i> , 2001
Alface	5,14	Sosulski e Imafidon, 1990
Alface	4,10	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Arroz	5,61	Sosulski e Imafidon, 1990
Aveia	5,52	Mossé, 1990
Banana	5,32	Sosulski e Imafidon, 1990
Batata	5,18	Sosulski e Imafidon, 1990
Berinjela	4,53	Fujihara <i>et al.</i> , 2001
Berinjela	4,84	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Carne	5,72	Sosulski e Imafidon, 1990
Carne	5,17	Salo-Väänänen e Koivistoinen, 1996
Cebola	4,87	Fujihara <i>et al.</i> , 2001
Cebola	4,19	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Cenoura	5,80	Sosulski e Imafidon, 1990
Cenoura	4,77	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Cogumelo comestível	3,99	Fujihara <i>et al.</i> , 1995
Espinafre	4,21	Fujihara <i>et al.</i> , 2001
Espinafre	4,92	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Frango	5,82	Sosulski e Imafidon, 1990
Leite	6,02	Sosulski e Imafidon, 1990
Leite	5,94	Salo-Väänänen e Koivistoinen, 1996
Maçã	5,72	Sosulski e Imafidon, 1990
Mandioca	3,24	Yeoh e Truong, 1996
Milho	5,72	Sosulski e Imafidon, 1990
Ovo	5,73	Sosulski e Imafidon, 1990
Peixe	5,82	Sosulski e Imafidon, 1990
Peixe	4,94	Salo-Väänänen e Koivistoinen, 1996
Pepino	4,65	Fujihara <i>et al.</i> , 2001
Pepino	4,77	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Queijo	6,13	Sosulski e Imafidon, 1990
Repolho	4,54	Fujihara <i>et al.</i> , 2001
Repolho	4,11	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Soja	5,46	Mossé, 1990
Tomate	6,26	Sosulski e Imafidon, 1990
Tomate	5,37	Tokoro <i>et al.</i> , 1987
Trigo	5,56	Mossé, 1990

Isto deixa clara a necessidade do estabelecimento de fatores de conversão N:P específicos para cada alimento ou grupos de alimentos, para que se possa estimar o conteúdo protéico que mais se aproxime do valor real, resultando em valores mais precisos acerca da concentração de Phe dos alimentos.

3. Objetivos

O nosso trabalho teve como objetivos:

- determinar a fração nitrogenada protéica e não protéica de sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais e diversos sabores;
- estudar a contribuição do nitrogênio de origem não protéica na concentração de nitrogênio total e proteína;
- determinar a concentração de glutamato monossódico;
- estimar a concentração de fenilalanina, considerando a presença de substâncias nitrogenadas não protéicas;
- avaliar a adequação da rotulagem nutricional das sopas desidratadas quanto ao teor de proteína.

4. Material e métodos

4.1 Material

4.1.1 Amostras

As sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais e diversos sabores, comercializadas em embalagem plástica revestida internamente com alumínio, com validade variando entre 10 a 24 meses, foram adquiridas no comércio local da cidade de São Paulo, SP, e armazenadas em local fresco até o momento da análise. As amostras utilizadas eram de 3 lotes diferentes, sendo cada lote analisado em triplicata.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes β -nicotinamida adenina dinucleotídeo, adenosina 5'-difosfato, ácido L-glutâmico, e a enzima L-glutamato desidrogenase foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das amostras

As 22 amostras de sopas desidratadas foram pulverizadas uniformemente em moinho analítico POLYMIX-KCH-Analytical Mill A 10 (Kinematica AG, Luzern, Swiss), acondicionadas em frascos herméticos e armazenadas em local fresco até as análises subsequentes.

4.2.2 Análises químicas

4.2.2.1 Umidade e nitrogênio total

A umidade foi determinada de acordo com o método gravimétrico descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), por secagem em estufa a 105 °C durante 4 horas. A concentração de nitrogênio total foi realizada de acordo o método *Kjeldahl* (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995) e o resultado multiplicado por F_c , onde F_c é o fator de conversão nitrogênio : proteína, sendo 5,75 para proteínas vegetais, 6,25 para proteínas da carne ou misturas de proteínas e 6,38 para proteínas lácteas.

4.2.2.2 Determinação de nitrogênio protéico e não protéico

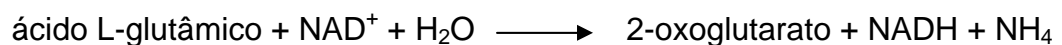
A determinação de nitrogênio protéico (NP) foi realizada precipitando-se as proteínas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (GAINES, 1977; TSHINYANGU E HENNEBERT, 1996; ROSENBERG, 1996). O precipitado e sobrenadante resultantes foram analisados quanto ao teor de nitrogênio pelo método de *Kjeldahl* (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995).

Em um tubo de centrífuga de 40mL foi adicionado 1g de amostra e 10mL de TCA 10% e homogeneizado com auxílio de uma bastão de vidro. O tubo foi colocado em agitador Julabo SW-20, sob agitação, por 1 hora, em temperatura controlada de 10 °C. Após este período o precipitado foi separado por centrifugação, em centrífuga Sorvall RC-5B (Du Pont Company[®], Newtown, USA), rotor SS34, a 2500 rpm, por 10 minutos,

temperatura de 10 °C. O sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta de *pasteur*. O precipitado foi lavado com mais 10mL de TCA 10%, repetindo-se a etapa de centrifugação e de extração do sobrenadante. Os sobrenadantes resultantes da extração foram reunidos e colocados em balão volumétrico ajustando-se o volume para 50 mL com água destilada. O precipitado foi então transferido para uma placa de Petri, previamente tarada, com auxílio de 20mL de solução de éter:etanol (1:1). Após a evaporação da solução de éter:etanol, o precipitado foi pesado e em seguida removido cuidadosamente da placa de Petri com auxílio de espátula, triturado em gral e acondicionado em frasco hermético. A análise do teor de nitrogênio pelo método de *Kjeldahl* foi realizada em 100mg de precipitado e 1mL de sobrenadante.

4.2.2.3 Determinação de glutamato monossódico

A determinação do glutamato monossódico foi realizada por método potenciométrico. O método baseia-se numa reação enzimática, onde o ácido L-glutâmico é desaminado, na presença da enzima glutamato desidrogenase, de acordo a equação descrita abaixo (NIKOLELIS, 1987) :



Quando uma amostra contendo ácido glutâmico é pipetada em um sistema tampão contendo a enzima e o $\beta\text{-NAD}^+$, o potencial do eletrodo sensível à amônia decresce com o tempo e a mudança da taxa inicial de

potencial está diretamente relacionada com a concentração do ácido glutâmico (NIKOLELIS, 1987).

(a) Equipamento

Eletrodo automatizado sensível à amônia Biochemicals AS-210 Automated Enzyme Electrode Analyzer (A&T).

(b) Preparo dos reagentes

- *Solução de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NAD⁺), 0,0060M* : em um balão volumétrico foram dissolvidos 0,400 g de β -NAD⁺ em água destilada e o volume ajustado para 100mL.
- *Solução tampão Tris-HCL 0,10M, pH=8,5* : 12,1 g de Tris foram dissolvidos em água destilada, o pH foi ajustado para 8,5 com solução de ácido clorídrico 6M. A solução foi transferida para um balão volumétrico e o volume acertado para 1000 mL com água destilada.
- *Solução de adenosina 5'-difosfato (ADP), 0,50 mM* : em um balão volumétrico foram dissolvidos 21,4 mg de ADP em água destilada e o volume acertado para 100 mL.
- *Solução estoque de L-glutamato desidrogenase, 25 U/mL* : 50 μ L de suspensão de enzima L-glutamato desidrogenase, E.C. 1.4.1.3, de fígado bovino (Sigma Chemical), solução de glicerol 50%, 37 U/mg de proteína] foram diluídos em solução de ADP 0,50 mM em balão volumétrico e o volume ajustado para 10 mL.
- *Solução estoque de ácido L-glutâmico, 0,010M* : dissolveu-se 0,0735 g de ácido glutâmico em 1,5 mL de ácido clorídrico concentrado em balão volumétrico e o volume foi ajustado para 10 mL com água destilada. As soluções padrões de trabalho foram preparadas nas concentrações de

0,1mM, 0,5mM e 1,0mM a partir da solução estoque pela diluição com água destilada.

(c) Extração do glutamato monossódico

Adicionou-se 1g de amostra em balão volumétrico de 100mL, completando-se o volume com água destilada. Foi adicionada 1 gota de HCl (1:2,5) para prevenir a conversão do ácido glutâmico em pirrolidona. A solução resultante foi filtrada, utilizando-se papel de filtro Whatman n° 41. O filtrado foi armazenado em frasco hermético, em geladeira, até o momento da análise.

(d) Determinação potenciométrica do glutamato monossódico (GMS)

Na célula termostática de reação do equipamento ($T=37\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) foram pipetados 4 mL de tampão Tris-HCl 0,01M ($\text{pH}=8,5$), 1 mL de $\beta\text{-NAD}^+$ $6,0\times 10^{-3}\text{M}$ e 0,2mL de solução estoque de L-glutamato desidrogenase (5U). O eletrodo sensível à amônia foi imerso na solução da célula termostática, sendo necessário aguardar de 1 a 2 minutos até que ocorra a estabilização do eletrodo. Após a estabilização do eletrodo foi pipetado na célula termostática 1mL do filtrado proveniente da extração do glutamato monossódico.

(e) Calibração do equipamento

A calibração do equipamento foi realizada seguindo o mesmo procedimento da determinação potenciométrica do glutamato monossódico, utilizando-se a solução estoque de ácido glutâmico nas concentrações 0,1mM, 0,5mM e 1,0mM e solução tampão Tris-HCl 0,01M ($\text{pH}=8,5$).

(f) Cálculos

Os cálculos foram realizados pelo próprio equipamento que detecta a taxa inicial de potencial da amostra, interpola estes valores com a taxa inicial de potencial do branco e curva padrão e expressa os resultados da concentração da amostra (C_{equip}) em mg/dL. A concentração de glutamato monossódico é dada pela equação:

$$[\text{GMS}] = \frac{C_{\text{equip}} \times F_D}{F_{\text{Conv}}},$$

onde F_D é o fator de diluição e F_{Conv} é o fator de conversão ácido glutâmico-GMS que correspondem, respectivamente, a 100 e 1,2743.

5. Resultados e discussão

Na **Tabela 3**, estão apresentados os teores de N total (NT), os valores de proteína bruta ($NT \times F_c$) e proteína real estimada ($NP \times F_c$) de 22 amostras de sopas desidratadas, onde F_c é o fator de conversão N:P estabelecido pela legislação brasileira, sendo 5,75 para proteínas vegetais, 6,25 para proteínas da carne e misturas de proteína e 6,38 para proteínas lácteas (Resolução RDC n. 40, de 21 de março de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Na mesma tabela estão apresentados também os conteúdos em umidade para que todos os resultados pudessem ser expressos em base seca, facilitando comparações com eventuais resultados que forem obtidos no futuro. O presente trabalho está relacionado com um projeto mais amplo, no qual os resultados obtidos farão parte da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos para Fenilcetonúricos. Desde 1999 ela se encontra disponível na web no site www.fcf.usp.br/fenilcetonuricos, sendo útil especialmente para pais de crianças fenilcetonúricas e nutricionistas que a utilizam na elaboração dos cardápios.

Os teores de N total variaram entre 1,05 e 3,44g/100g de amostra, que corresponde a uma variação entre 6,05 e 21,51g de proteína bruta/100g de amostra. As sopas à base de ervilha e feijão apresentaram as maiores concentrações de proteína bruta, 21,51 e 18,41g/100g, respectivamente. As sopas à base de carne e galinha, com exceção da sopa de galinha com arroz, apresentaram concentrações de proteína bruta intermediárias, variando entre 9,90 e 14,35g/100g. As sopas à base de cebola, creme de batata com mandioquinha e creme de legumes apresentaram os menores teores de

proteína bruta, da ordem de 6,05 a 8,98g/100g de amostra. Normalmente associamos as sopas à base de carne, galinha e queijo com teores maiores de proteína, porém, as sopas a base de leguminosas foram as que apresentaram as concentrações protéicas mais elevadas.

A concentração de N de origem exclusivamente protéica (NP) foi determinada para estimar a concentração de fenilalanina (Phe), a partir da concentração protéica real. A concentração de N total representa o N de origem protéica e não protéica, dessa forma foi determinada também a fração de N de origem não protéica, para verificar sua contribuição na concentração de N total. A concentração de N protéico foi realizada, precipitando-se as proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 10%, seguida da análise do teor de N no precipitado, pelo método de *Kjeldahl*. A concentração deste N, multiplicada pelo fator F_c resultará numa concentração protéica mais próxima à real, que chamaremos de concentração protéica real estimada. A concentração de N não protéico foi determinada pela análise de N (método de *Kjeldahl*) no sobrenadante, resultante da precipitação ácida.

Ainda na **Tabela 3** é possível observar a concentração de proteína real estimada ($NP \times F_c$). A concentração de proteína real estimada, como era de se esperar, foi inferior à concentração de proteína bruta e proteína declarada no rótulo, variando entre 1,28 e 16,31g/100g de amostra. Isto pode ser explicado pela presença de substâncias nitrogenadas não protéicas que elevam a concentração de N, resultando em teores protéicos superestimados. A legislação brasileira, como mencionado anteriormente, estabelece que a quantidade de proteína declarada no rótulo de alimentos e bebidas

embalados deve ser calculada a partir da multiplicação da concentração total de N, determinada pelo método de *Kjeldahl*, pelo fator de conversão N:P correspondente, segundo o tipo de alimento em questão (Resolução RDC n. 40, de 21 de março de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Porém, quando se utiliza o fator de conversão estabelecido pela legislação, consideramos que todo N presente é proveniente da proteína.

Grande parte dos alimentos industrializados possui na composição substâncias nitrogenadas não protéicas na forma de realçadores de sabor, corantes, aromatizantes, entre outras substâncias. Esta é a grande problemática encontrada quando se estima Phe a partir do conteúdo protéico declarado no rótulo e muitas vezes desconhecida por pais de crianças fenilcetonúricas e profissionais da área da nutrição.

A comparação entre os valores de concentração protéica calculados pelo $NT \times F_c$, declarados no rótulo e calculados por $NP \times F_c$ pode ser observada na **Figura 1**. Os valores de proteína bruta foram, na maioria das vezes, similares aos declarados no rótulo das sopas, indicando que os fabricantes determinam a concentração protéica destes alimentos multiplicando o teor de N pelo fator conversão estabelecido pela legislação brasileira. As 22 amostras de sopas desidratadas apresentaram conteúdos protéicos brutos e declarados nos rótulos superiores às concentrações de proteína real estimada, comprovando a presença de N de origem não protéica.

A sopa de cebola (amostra nº 10) apresenta 0g de proteína/porção de sopa desidratada declarada no rótulo, e por conseqüência, 0g/100g de sopa

desidratada. Segundo o Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados (Resolução – RDC n. 40, de 21 de março de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária) alimentos cujas porções apresentarem quantidades de proteína menores que 0,5g, o valor correspondente declarado no rótulo pode ser expresso como zero. Contudo, quando se utiliza uma quantidade maior que uma porção, o conteúdo protéico correspondente não será zero. Apesar da rotulagem estar de acordo com a legislação vigente, a forma de arredondamento impossibilita o cálculo do teor real de proteína quando várias porções são consumidas. Evidentemente, este fato não acarreta prejuízo significativo à população sadia de um modo geral, porém, torna-se relevante para os pacientes fenilcetonúricos que necessitam de informações exatas sobre o conteúdo protéico dos alimentos.

Tabela 3. Composição em umidade, nitrogênio total (NT), proteína bruta (NTx F_c) e proteína real estimada (NPx F_c) de sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais

Amostras	Umidade ¹	NT ¹	Proteína Bruta ¹ (NTx F_c)	Prot. Real Estimada ¹ (NPx F_c)
	g/100g			
(1) Creme batata c/ mandioquinha (Knorr)	6,19 ± 0,10	1,15 ± 0,01	6,62 ± 0,02	2,51 ± 0,03
(2) Creme cebola (Knorr)	5,32 ± 0,36	1,07 ± 0,02	6,18 ± 0,14	2,36 ± 0,03
(3) Creme ervilha c/ bacon (Knorr)	6,46 ± 0,23	3,44 ± 0,03	21,51 ± 0,19	16,31 ± 0,13
(4) Creme milho verde (Knorr)	6,08 ± 0,11	1,75 ± 0,01	10,06 ± 0,07	7,02 ± 0,03
(5) Creme galinha (Maggi)	4,09 ± 0,10	2,30 ± 0,04	14,35 ± 0,27	8,28 ± 0,01
(6) Sopa carne c/ macarrão conchinha (Knorr)	6,31 ± 0,05	2,20 ± 0,02	13,74 ± 0,10	8,77 ± 0,05
(7) Creme Legumes (Knorr)	5,88 ± 0,06	1,46 ± 0,09	8,37 ± 0,50	4,30 ± 0,26
(8) Sopa galinha c/ fidelini (Knorr)	6,50 ± 0,14	2,29 ± 0,02	14,31 ± 0,11	11,60 ± 0,21
(9) Sopa galinha c/ arroz (Maggi)	5,82 ± 0,07	1,24 ± 0,04	7,76 ± 0,23	5,20 ± 0,02
(10) Sopa cebola (Knorr)	3,89 ± 0,06	1,56 ± 0,01	8,98 ± 0,03	1,48 ± 0,18
(11) Creme queijo (Arisco)	4,50 ± 0,02	2,05 ± 0,02	13,06 ± 0,12	9,06 ± 0,04
(12) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Knorr)	6,92 ± 0,37	1,94 ± 0,01	12,10 ± 0,07	8,99 ± 0,03
(13) Sopão feijão c/ macarrão e couve (Knorr)	5,19 ± 0,17	2,94 ± 0,12	18,41 ± 0,73	15,55 ± 0,02
(14) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Knorr)	5,52 ± 0,27	2,07 ± 0,01	12,91 ± 0,05	9,91 ± 0,08
(15) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Knorr)	7,02 ± 0,23	1,85 ± 0,03	11,57 ± 0,17	8,06 ± 0,15
(16) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Arisco)	5,63 ± 0,16	2,07 ± 0,04	12,95 ± 0,26	8,61 ± 0,20
(17) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Arisco)	7,86 ± 0,15	1,58 ± 0,01	9,90 ± 0,10	4,27 ± 0,01
(18) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Arisco)	9,73 ± 1,34	1,85 ± 0,01	11,55 ± 0,20	8,47 ± 0,02
(19) Creme de cebola (Arisco)	4,43 ± 0,10	1,05 ± 0,02	6,05 ± 0,11	2,96 ± 0,02
(20) Creme de cebola (Maggi)	3,51 ± 0,18	1,44 ± 0,01	8,29 ± 0,07	4,33 ± 0,01
(21) Sopa de cebola (Maggi)	3,62 ± 0,17	1,53 ± 0,06	8,82 ± 0,36	4,18 ± 0,04
(22) Sopa de cebola (Arisco)	3,23 ± 0,07	1,12 ± 0,01	6,45 ± 0,01	1,28 ± 0,01

¹Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3).

NP= nitrogênio protéico

F_c = fator de conversão nitrogênio:proteína estabelecido pela legislação brasileira (6,25 para proteínas da carne ou misturas de proteína, 5,75 para proteínas vegetais e 6,38 para proteínas lácteas).

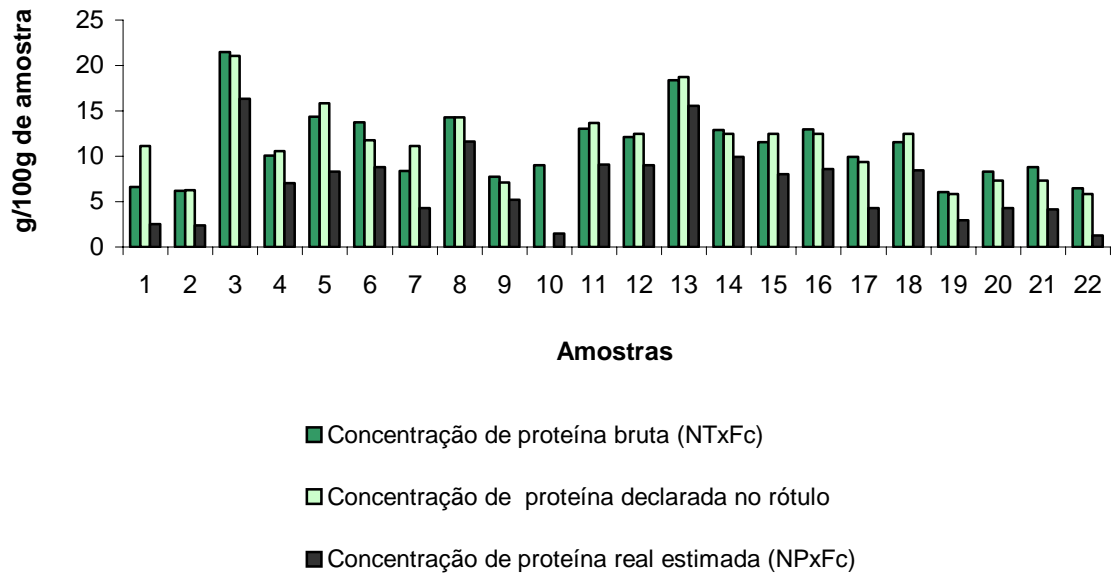


Figura 1. Comparação entre a concentração de proteína bruta ($NTxF_c$), declarada no rótulo e real estimada ($NPxF_c$) de sopas desidratadas instantâneas

As concentrações de N total, N protéico e N não protéico estão apresentadas na **Tabela 4**. Nas sopas estudadas, as concentrações de N protéico foram consideravelmente menores que as concentrações de N total, variando entre 0,22 e 2,61g/100g de amostra, indicando que grande parte do N presente nas amostras pertence à fração nitrogenada não protéica. As concentrações de N não protéico variaram entre 0,33 e 1,27g/100g de amostra. Observa-se ainda que a soma de N protéico e N não protéico correspondeu a uma recuperação total de N presente na amostra, tendo havido perdas insignificantes.

Foi calculada a contribuição do N não protéico, em porcentagem, na concentração de N total, e os valores estão apresentados na **Tabela 5**. Foi possível verificar que 16,18 a 81,33% do N total presente provém de substâncias nitrogenadas não protéicas. Em algumas sopas, como o creme de batata com mandioquinha, creme de cebola (Knorr), canjão de galinha com arroz e legumes, sopas de cebola esta contribuição foi superior a 50%, variando entre 51,27 a 81,33%. Nos cremes de galinha, legumes e cebola (Arisco e Maggi) a contribuição foi menor do que nas sopas citadas acima, porém superior a 40%, representando cerca de 40,83 a 48,36% da concentração total de N. Estes dados mostram o quanto o N de origem não protéica pode influenciar na concentração de N total e conseqüentemente de proteína. Quando o objetivo é determinar quantitativamente a concentração de proteína com vistas à estimativa de Phe, o método de *Kjeldahl* deve ser utilizado com critério, considerando-se a presença de substâncias que possam contribuir para elevar a concentração de N total.

A **Figura 2** mostra a contribuição percentual do nitrogênio protéico e nitrogênio não protéico. É possível observar uma ampla variação na contribuição de ambas origens de N, evidenciando uma grande contribuição do nitrogênio protéico nas sopas de ervilha com bacon, sopa de galinha com fidelini, sopão de carne com macarrão e legumes, sopão de feijão com macarrão e couve e sopão de galinha com macarrão e legumes.

Sabe-se que grande número dos alimentos industrializados e mesmo alguns alimentos de origem vegetal contêm quantidades significativas de substâncias nitrogenadas não protéicas das mais diferentes origens. As substâncias que podem contribuir para o aumento da concentração do N total em alimentos, em geral, são aminoácidos livres, pequenos peptídeos, ácidos nucléicos, corantes, quitina, e sais inorgânicos como NO_3^- , NO_2^- , NH_3 e NH_4^+ (HERNÁNDEZ *et al.*, 1995; LUCAS *et al.*, 1988; SALO-VÄÄNÄNEN E KOIVISTOINEN, 1996; SIMONNE *et al.*, 1997; SOSULSKI E IMAFIDON, 1990; TOKORO *et al.*, 1987; YEOH E TRUONG, 1996).

GUIMARÃES E LANFER MARQUEZ (2002) realizaram estudos com tabletes de caldos de carne e verificaram que 95% do N presente neste tipo de alimento correspondiam a N de origem não protéica. A alta concentração de N não protéico era devida ao realçador de sabor glutamato monossódico, um ingrediente da formulação dos tabletes de caldos de carne.

Entretanto, não há informações precisas no rótulo de alimentos industrializados sobre a adição de substâncias nitrogenadas não protéicas. O conhecimento do teor deste tipo de substâncias possibilitaria subtrair o

conteúdo de N não protéico do conteúdo de N total e evitaria erros acerca da concentração protéica, calculada a partir da análise de N total.

A rotulagem nutricional das sopas desidratadas não está adequada com relação ao conteúdo protéico declarado, pois não representa a quantidade real de proteína presente. A legislação brasileira (Portaria Nº. 30, de 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelece que as proteínas presentes nos alimentos embalados devem ser de qualidade nutricional no mínimo equivalente à composição aminoacídica das proteínas do ovo ou do leite ou da carne (proteínas de referência) e quando a qualidade protéica for inferior à da proteína de referência, as concentrações mínimas da proteína devem ser aumentadas para compensar a baixa qualidade protéica.

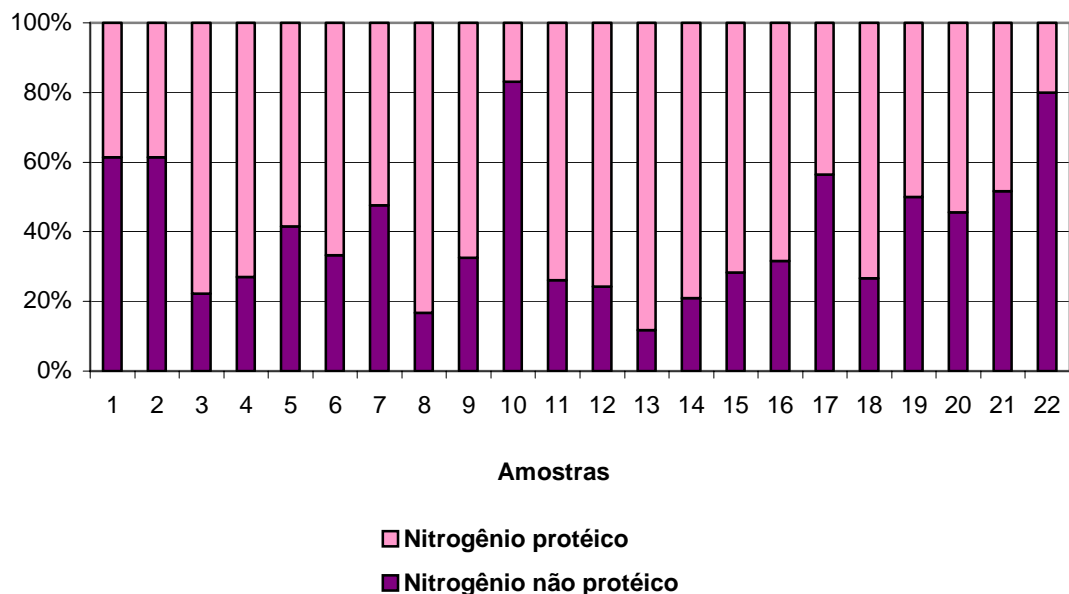


Figura 2. Contribuição percentual de nitrogênio protéico (NP) e nitrogênio não protéico (NNP) em sopas desidratadas instantâneas

Tabela 4. Concentração de nitrogênio total (NT), nitrogênio protéico (NP) e nitrogênio não protéico (NNP) em sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais

Amostras	NT ¹	NP ¹	NNP ¹
	g/100g de amostra		
(1) Creme batata c/ mandioquinha (Knorr)	1,15 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,70 ± 0,02
(2) Creme cebola (Knorr)	1,07 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,65 ± 0,02
(3) Creme ervilha c/ bacon (Knorr)	3,44 ± 0,03	2,61 ± 0,02	0,75 ± 0,02
(4) Creme milho verde (Knorr)	1,75 ± 0,01	1,22 ± 0,01	0,45 ± 0,02
(5) Creme galinha (Maggi)	2,30 ± 0,04	1,32 ± 0,01	0,94 ± 0,04
(6) Sopa carne c/ macarrão conchinha (Knorr)	2,20 ± 0,02	1,40 ± 0,01	0,70 ± 0,04
(7) Creme Legumes (Knorr)	1,46 ± 0,09	0,75 ± 0,04	0,68 ± 0,04
(8) Sopa galinha c/ fidelini (Knorr)	2,29 ± 0,02	1,85 ± 0,03	0,37 ± 0,01
(9) Sopa galinha c/ arroz (Maggi)	1,24 ± 0,04	0,83 ± 0,01	0,40 ± 0,02
(10) Sopa cebola (Knorr)	1,56 ± 0,01	0,26 ± 0,03	1,27 ± 0,17
(11) Creme queijo (Arisco)	2,05 ± 0,02	1,42 ± 0,01	0,50 ± 0,04
(12) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Knorr)	1,94 ± 0,01	1,44 ± 0,01	0,46 ± 0,01
(13) Sopão feijão c/ macarrão e couve (Knorr)	2,94 ± 0,12	2,49 ± 0,01	0,33 ± 0,01
(14) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Knorr)	2,07 ± 0,01	1,59 ± 0,01	0,42 ± 0,02
(15) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Knorr)	1,85 ± 0,03	1,29 ± 0,02	0,51 ± 0,10
(16) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Arisco)	2,07 ± 0,04	1,38 ± 0,03	0,64 ± 0,07
(17) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Arisco)	1,58 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,88 ± 0,02
(18) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Arisco)	1,85 ± 0,01	1,35 ± 0,01	0,49 ± 0,08
(19) Creme de cebola (Arisco)	1,05 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,51 ± 0,02
(20) Creme de cebola (Maggi)	1,44 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,63 ± 0,01
(21) Sopa de cebola (Maggi)	1,53 ± 0,06	0,73 ± 0,01	0,78 ± 0,08
(22) Sopa de cebola (Arisco)	1,12 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,88 ± 0,08

¹ Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Tabela 5. Contribuição de nitrogênio não protéico (%NNP), em porcentagem, na concentração de nitrogênio total de sopas desidratadas instantâneas de diferentes marcas comerciais

Amostras	%NNP ¹
(1) Creme batata c/ mandioquinha (Knorr)	60,93 ± 1,99
(2) Creme cebola (Knorr)	61,00 ± 1,79
(3) Creme ervilha c/ bacon (Knorr)	21,68 ± 0,56
(4) Creme milho verde (Knorr)	25,89 ± 1,09
(5) Creme galinha (Maggi)	40,83 ± 1,64
(6) Sopa carne c/ macarrão conchinha (Knorr)	31,98 ± 1,73
(7) Creme Legumes (Knorr)	46,30 ± 2,59
(8) Sopa galinha c/ fidelini (Knorr)	16,18 ± 0,42
(9) Sopa galinha c/ arroz (Maggi)	32,52 ± 1,52
(10) Sopa cebola (Knorr)	81,33 ± 11,12
(11) Creme queijo (Arisco)	24,25 ± 1,82
(12) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Knorr)	23,55 ± 0,49
(13) Sopão feijão c/ macarrão e couve (Knorr)	11,10 ± 0,33
(14) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Knorr)	20,45 ± 0,93
(15) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Knorr)	27,67 ± 5,51
(16) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Arisco)	31,03 ± 3,34
(17) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Arisco)	55,98 ± 1,44
(18) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Arisco)	26,41 ± 4,16
(19) Creme de cebola (Arisco)	48,36 ± 1,82
(20) Creme de cebola (Maggi)	43,77 ± 0,13
(21) Sopa de cebola (Maggi)	51,27 ± 5,45
(22) Sopa de cebola (Arisco)	78,59 ± 6,89

¹Valores expresso como média ± desvio padrão (n=3).

Com o intuito de investigar as fontes de N não protéico nas amostras de sopas desidratadas, foi determinada a concentração de glutamato monossódico que parecia ser a fonte mais provável de N não protéico. O glutamato monossódico é comercialmente produzido a partir de algas, fermentação ou a partir do ácido glutâmico. Este último, por sua vez, pela hidrólise da proteína do trigo e da beterraba (GOLC-WONDRA, SKOCIR E PROSEK, 1995). A adição deste sal sódico do ácido glutâmico em alimentos contribui para elevar o teor de N total.

O glutamato monossódico é comumente utilizado em alimentos como realçador de sabor juntamente com o inosinato de sódio (IMP) e guanilato de sódio (GMP). Estes nucleotídeos são adicionados aos alimentos em baixas concentrações, tipicamente 0,01%, e devido ao efeito sinérgico destes três realçadores de sabor as concentrações de glutamato necessárias para dar sabor ao alimento podem ser reduzidas (NGUYEN E SPORNS, 1984; DURAN-MERÁS *et al.*, 1993). A contribuição do N proveniente do IMP e GMP é muito pequena e provavelmente não interfere de forma significativa na concentração de N total.

Na **Tabela 6**, podemos observar a concentração de glutamato monossódico das sopas desidratadas, que variou entre 1,01 e 12,16g/100g de amostra. As sopas e cremes de cebola, com exceção do creme de cebola da marca Knorr, juntamente com o creme de galinha apresentaram as maiores concentrações de glutamato monossódico, com variações de 6,59 a 12,16g/100g de amostra.

Foi calculada a contribuição do N proveniente do glutamato monossódico na concentração do N total e os resultados estão apresentados na **Tabela 7**. O N proveniente do glutamato monossódico contribui com 2,53 a 45,15% na quantidade total de N, ressaltando-se que nas sopas à base de cebola e sopa de galinha com arroz a contribuição é maior, da ordem de 25,89 a 45,15%.

A utilização do realçador de sabor glutamato monossódico é permitida pela Legislação Brasileira (Resolução RDC n. 1, de 2 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária), e seu limite máximo permitido descrito na Resolução é “*quantum satis*”, ou seja, a quantidade necessária para dar sabor. O estabelecimento de regulamentos técnicos sobre o uso de Aditivos Alimentares e seus limites máximos é indispensável para minimizar os riscos à saúde humana e evitar o efeito cumulativo e sinérgico decorrente do seu uso. Nos últimos anos houve uma preocupação maior em relação à adição de glutamato monossódico em alimentos, principalmente devido à doença decorrente da sua ingestão, chamada de “Síndrome do Restaurante Chinês”. Esta síndrome é caracterizada por tensão, dores de cabeça, pescoço, peito e ombros, em pessoas que consumiam freqüentemente alimentos contendo glutamato monossódico, com quantidades variando entre 3 a 5g de glutamato monossódico (SCHAUMBERG, BYCK E MASHAMAN, 1969; GOLC-WONDRA, SKOCIR E PROSEK, 1995). Os sintomas apresentados por alguns indivíduos foram atribuídos a uma intolerância ao glutamato monossódico. Embora mais estudos sejam necessários, não se recomenda o uso de aditivos alimentares desta natureza em alimentos infantis consumidos por criança com menos de 3 meses de idade (Walker, 1999).

Tabela 6. Concentração de glutamato monossódico (GMS) nas sopas desidratadas instantâneas

Amostras	GMS ¹
	g/100g de amostra
(1) Creme batata c/ mandioquinha (Knorr)	3,33 ± 0,00
(2) Creme cebola (Knorr)	3,78 ± 0,06
(3) Creme ervilha c/ bacon (Knorr)	4,76 ± 0,07
(4) Creme milho verde (Knorr)	3,04 ± 0,06
(5) Creme galinha (Maggi)	12,16 ± 0,07
(6) Sopa carne c/ macarrão conchinha (Knorr)	4,25 ± 0,07
(7) Creme Legumes (Knorr)	3,74 ± 0,07
(8) Sopa galinha c/ fidelini (Knorr)	2,42 ± 0,00
(9) Sopa galinha c/ arroz (Maggi)	4,45 ± 0,07
(10) Sopa cebola (Knorr)	7,86 ± 0,00
(11) Creme queijo (Arisco)	2,63 ± 0,07
(12) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Knorr)	2,72 ± 0,07
(13) Sopão feijão c/ macarrão e couve (Knorr)	1,01 ± 0,02
(14) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Knorr)	2,78 ± 0,07
(15) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Knorr)	2,93 ± 0,07
(16) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Arisco)	3,96 ± 0,00
(17) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Arisco)	2,83 ± 0,00
(18) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Arisco)	3,45 ± 0,07
(19) Creme de cebola (Arisco)	3,77 ± 0,00
(20) Creme de cebola (Maggi)	6,59 ± 0,06
(21) Sopa de cebola (Maggi)	6,91 ± 0,00
(22) Sopa de cebola (Arisco)	6,90 ± 0,00

¹Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Tabela 7. Contribuição do nitrogênio proveniente do glutamato monossódico (%N-GMS), em porcentagem, na concentração de nitrogênio total

Amostras	%N-GMS ¹
(1) Creme batata c/ mandioquinha (Knorr)	21,23 ± 0,01
(2) Creme cebola (Knorr)	25,89 ± 0,44
(3) Creme ervilha c/ bacon (Knorr)	10,13 ± 0,14
(4) Creme milho verde (Knorr)	12,71 ± 0,27
(5) Creme galinha (Maggi)	38,72 ± 0,23
(6) Sopa carne c/ macarrão conchinha (Knorr)	14,14 ± 0,23
(7) Creme Legumes (Knorr)	18,68 ± 0,30
(8) Sopa galinha c/ fidelini (Knorr)	7,73 ± 0,01
(9) Sopa galinha c/ arroz (Maggi)	26,29 ± 0,41
(10) Sopa cebola (Knorr)	36,90 ± 0,01
(11) Creme queijo (Arisco)	9,40 ± 0,24
(12) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Knorr)	10,26 ± 0,26
(13) Sopão feijão c/ macarrão e couve (Knorr)	2,53 ± 0,06
(14) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Knorr)	9,84 ± 0,24
(15) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Knorr)	11,59 ± 0,27
(16) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Arisco)	14,03 ± 0,01
(17) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Arisco)	13,15 ± 0,01
(18) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Arisco)	13,66 ± 0,27
(19) Creme de cebola (Arisco)	26,32 ± 0,01
(20) Creme de cebola (Maggi)	33,55 ± 0,32
(21) Sopa de cebola (Maggi)	33,09 ± 0,01
(22) Sopa de cebola (Arisco)	45,15 ± 0,01

¹Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3).

A estimativa da concentração de Phe nas sopas desidratadas foi calculada a partir da concentração protéica real estimada. Considerando que uma proteína tem, em média 4% de Phe em sua composição (BREMER, ANNINOS E SCHULZ, 1996), as sopas desidratadas apresentam uma concentração de Phe que varia de 51,16 a 652,24 mg/100g de amostra, e 5 a 199 mg/porção de 200mL de sopa preparada, como mostra a **Tabela 8**.

Na **Tabela 8**, ressalta-se ainda que a quantidade de sopa necessária para preparar uma porção de 200mL varia entre os diferentes tipos de sopas. A Resolução que define os valores de referência para porções de alimentos e bebidas embalados para fins de rotulagem nutricional, estabelece que a quantidade de pó para o preparo da sopa deve ser suficiente para uma porção de 200mL, não estabelecendo uma fração de pó de sopa fixa (Resolução RDC n. 39, de 21 de Março de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o que dificulta ainda mais a estimativa de Phe.

As sopas desidratadas que mereceram destaque, devido à baixa concentração de Phe/porção de 200mL de sopa preparada, foram as sopas e cremes à base de cebola e creme de batata com mandioquinha, com concentrações entre 5,0 e 24,0 mg/porção de 200mL de sopa preparada. Uma vez que a tolerância de ingestão de Phe na PKU clássica costuma situar-se ao redor de 250 a 350mg/dia, as sopas desidratadas destacadas representam uma contribuição muito útil na diversificação do cardápio de pacientes fenilcetonúricos, podendo ainda ser empregadas como matéria prima para o preparo de cremes e molhos.

Porém, quando a estimativa da concentração de Phe é calculada a partir do valor de proteína declarado no rótulo das sopas desidratadas, os valores são significativamente maiores, como mostrado na **Figura 3**, onde está apresentada uma comparação entre a estimativa da concentração de Phe calculada a partir do teor de proteína declarada no rótulo e de proteína real estimada. O cardápio de pacientes fenilcetonúricos é formulado por profissionais da área ou mesmo pelos próprios pais que calculam o teor de Phe dos alimentos a partir do conteúdo protéico declarado no rótulo, no caso de alimentos embalados, ou dados publicados em tabelas de composição de alimentos, no caso de alimentos “in natura”. Na prática, muitos alimentos que poderiam fazer parte do cardápio dos fenilcetonúricos são excluídos ou poucos utilizados por apresentarem, teoricamente, concentrações altas de Phe.

Tabela 8. Concentração de Fenilalanina (Phe), em mg/100 g de amostra de sopa desidratada e por porção de 200mL de sopa preparada

Amostra	mg Phe/100g ¹	porção (g)	mg Phe/200mL
(1) Creme batata c/ mandioquinha (Knorr)	100,40	18	18
(2) Creme cebola (Knorr)	94,44	13	12
(3) Creme ervilha c/ bacon (Knorr)	652,24	15,4	100
(4) Creme milho verde (Knorr)	281,00	19	53
(5) Creme galinha (Maggi)	331,08	12,6	42
(6) Sopa carne c/ macarrão conchinha (Knorr)	350,92	17	60
(7) Creme Legumes (Knorr)	172,04	14,8	25
(8) Sopa galinha c/ fidelini (Knorr)	463,84	14	65
(9) Sopa galinha c/ arroz (Maggi)	208,12	14	29
(10) Sopa cebola (Knorr)	59,16	9	5
(11) Creme queijo (Arisco)	362,56	22	80
(12) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Knorr)	359,64	19	68
(13) Sopão feijão c/ macarrão e couve (Knorr)	622,08	32	199
(14) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Knorr)	396,40	19	75
(15) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Knorr)	322,40	19	61
(16) Sopão carne c/ macarrão e legumes (Arisco)	344,32	33	114
(17) Canjão galinha c/ arroz e legumes (Arisco)	171,00	33	56
(18) Sopão galinha c/ macarrão e legumes (Arisco)	338,84	33	112
(19) Creme de cebola (Arisco)	118,24	17	20
(20) Creme de cebola (Maggi)	173,16	13,6	24
(21) Sopa de cebola (Maggi)	167,12	13,6	23
(22) Sopa de cebola (Arisco)	51,16	15	8

¹Considerando uma concentração de 4% de fenilalanina na proteína

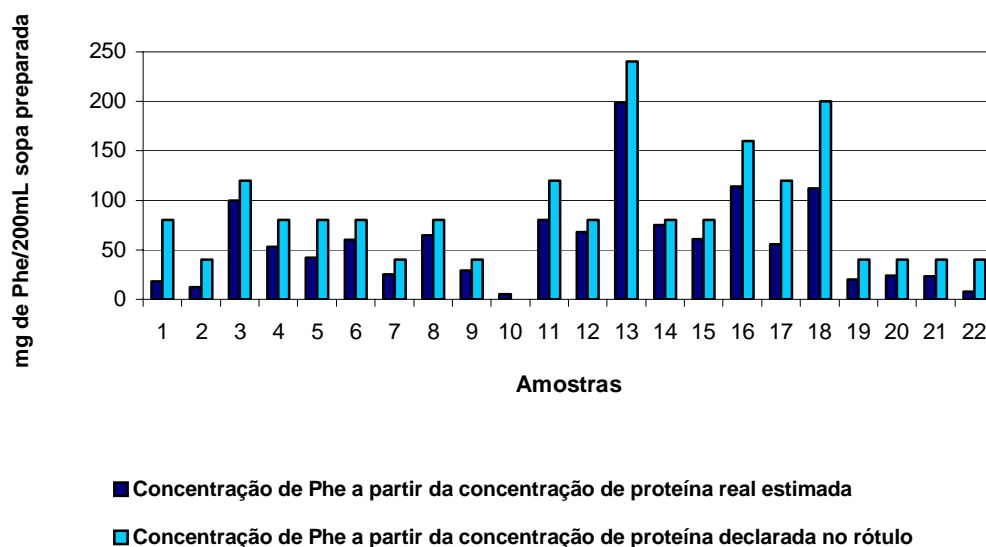


Figura 3. Comparação entre a concentração de fenilalanina (Phe), em mg/porção de 200mL de sopa preparada, calculada a partir do teor protéico real estimado (NPxF_c) e declarado no rótulo de sopas desidratadas instantâneas

Embora a Resolução RDC n. 40, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, seja um avanço em termos de cálculo de teores protéicos reais, utilizando os fatores 5,75 para proteínas de origem vegetal, 6,25 para proteínas da carne ou misturas de proteínas e 6,38 para proteínas lácteas, os teores de proteína calculados dessa maneira ainda estão distantes daqueles necessários quando se pretende calcular os teores de Phe.

Assim, a utilização dos fatores de conversão N:P estabelecidos pela Legislação Brasileira, em alimentos com quantidades elevadas de N de origem não protéica, como as sopas desidratadas e alguns alimentos industrializados, requer a extração prévia das substâncias nitrogenadas não protéicas, para que a análise de N seja feita somente na fração protéica do alimento e o uso de um fator de conversão N:P específico para este tipo de alimento.

6. Conclusões

O estudo da concentração protéica e fração nitrogenada não protéica das 22 amostras de sopas desidratadas instantâneas, permitiu concluir que:

- a concentração de proteína bruta ($NTxF_c$) das sopas desidratadas determinada a partir da análise de N (método de Kjeldahl) não representa o real conteúdo protéico presente. As concentrações de proteína bruta são até 5,2 vezes maiores que as concentrações protéicas reais;
- os teores de proteína bruta são próximos aos declarados no rótulo, indicando que as indústrias alimentícias utilizam os fatores de conversão (F_c) 5,75, 6,25 e 6,38, estabelecidos pela Legislação Brasileira, para converter nitrogênio em proteína;
- a concentração de N não protéico representa 16,18 a 81,33% do N total, sendo que as sopas de cebola, o creme de batata com mandioquinha, o canjão de galinha com arroz e legumes e o creme de cebola da marca Knorr apresentam as maiores concentrações de N não protéico;
- as sopas desidratadas apresentam concentrações de glutamato monossódico variando entre 1,01 e 12,16g/100g de amostra que resultam em valores superestimados de proteína e conseqüentemente de fenilalanina;

- as sopas desidratadas apresentam teores variáveis de Phe, variando entre 5 e 199 mg/porção de 200mL de sopa preparada, sendo que as de menor valor constituem alternativa muito útil para a diversificação do cardápio diário de pacientes fenilcetonúricos, geralmente preparado à base de amido e vegetais;
- a rotulagem nutricional das sopas desidratadas não está adequada, uma vez que a presença de glutamato monossódico e outras fontes de nitrogênio não protéico superestimam o conteúdo protéico.

7. Referências bibliográficas*

ACOSTA, P.B.; ARNOLD, G.; BERSTEIN, L.; CHO, S.; GAFFIELD, B.; KORSON, M.; LESLIE, N.; LEWIS, V.; MARRIAGE, B.; YANNICELLI, S.; STEINER, R.; PARTON, P. Protein status of infants with phenylketonuria undergoing nutrition management. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v.18, n.2, p.102-107, 1999.

ALBANELL, E.; CÁCERES, P.; CAJA, G.; MOLINA, E.; GARGOURI, A. Determination of fat, protein and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.82, n.3, p.753-758, 1999.

ALMENDINGEN, K.; MELTZER, H.M.; PEDERSEN, J.I.; NILSEN, B.N.; ELLEKJAER, M. Near infrared spectroscopy: a potentially useful method for rapid determination of fat and protein content in homogenized diets. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.54, n.1, p.20-23, 2000.

ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE DIÄTETIK.
Nährwerttabelle. Münster: SHS, 1995. p.61. [Catálogo].

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. v.1.

* De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstract Service Source Index (CASSI), 2002.

BARRETO, W.J.; AQUINO, M.; ZAIA, D.A.M. A new method for total protein determination. **Anal. Lett.**, New York, v.23, n.7, p.1279-1290, 1990.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portarias Publicadas. SAS 2002. Portaria n.847, de 6 de novembro de 2002. A secretaria de assistência à saúde estabelece o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmula de aminoácidos isenta de **fenilalanina**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/POR2002/PT-847.htm>.

Acesso em: 11 fev. 2003.

BRASIL. Portaria n.30, de 13 de janeiro de 1998. A Agência de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico referente a alimentos para controle de peso. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 jan. 1998. Seção 1, p.3-4.

BRASIL. Resolução – RDC n.1, de 2 de janeiro de 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico que aprova o uso de aditivos com a função de realçadores de sabor, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 jan. 2001. Seção 1, p.21.

BRASIL. Resolução – RDC n.39, de 21 de março de 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova a Tabela de valores de referência para porções de alimentos e bebidas embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 mar. 2001. Seção 1, p.17.

BRASIL. Resolução – RDC n.40, de 21 de março de 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 dez. 2001. Seção 1, p.22.

BREMER, H.J.; ANNINOS, A.; SCHULZ, B. Amino acid composition of food products used in the treatment of patients with disorders of the amino acid and protein metabolism. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.155, suppl.1, p.S108-S114, 1996.

BURGARD, P.; RUPP, A.; KONECKI, D.S.; TREFZ, F.K.; SCHIMDT, H.; LICHTER-KONECKI, U. Phenylalanine hydroxilase genotypes, predicted residual enzyme activity and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of phenylketonuria. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.155, suppl.1, p.S33-S38, 1996.

CERONE, R.; SCHIAFFINO, M.C.; DI STEFANO, S.; VENESELLI, E. Phenylketonuria: diet for life or not? **Acta Paediatr.**, Oslo, v.88, p.664-666, 1999.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Metabolic defects in amino acid metabolism. In: _____. **Biochemistry**. 2.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1994. p.253-255. (Lippincotts' illustrated reviews).

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

CONKLIN-BRITTAIN, N.L.; DIERENFELD, E.S.; WRANGHAM, R.W.; NORCONK, M.; SILVER, S.C. Chemical protein analysis: a comparison of Kjeldahl crude protein and total ninhydrin protein from wild, tropical vegetation. **J. Chem. Ecol.**, New York, v.25, n.12, 1999.

CONSENSUS STATEMENT. NIH Consensus Development Program.

,Phenylketonuria: screening and management., **NIH Consensus Statement**, v.17, n.3, p.1-27, 2000. (NIH Consensus Development Conference). Disponível em: http://odp.od.nih.gov/consensus/cons/113/113_intro.htm. Acesso em: 11 dez. 2001.

DANELL, E.; EAKER, D. Amino acid and total protein content of the edible mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries). **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.60, n.1, p.333-337, 1992.

DAVIDSON, D.C. Maternal phenylketonuria. **Postgrad. Med. J.**, London, v.65, suppl.2, p.S10-S20, 1989.

DURÁN-MERÁS, I.; PEÑA, A.M.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; SALINAS, F. Multicomponent determination of flavor enhancers in food preparations by partial least squares and principal component regression modeling of spectrophotometric data. **Analyst**, Cambridge, v.118, n.7, p.807-813, 1993.

DUTRA, J.C.; WEIMER, T.A.; GIUGLIANI, R.; NETTO, C.A. Heterozygote detection in two hyperphenylalaninemia types: classic phenylketonuria and dihydrobiopterin biosynthesis deficiency. **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v.9, p.123-131, 1986.

FITZGERALD, B.; MORGAN, J.; KEENE, N.; ROLLINSON, R.; HODGSON, A.; DALRYMPLE-SMITH, J. An investigation into diet treatment for adults with previously untreated phenylketonuria and severe intellectual disability. **JIDR, J. Intellect. Disabil. Res.**, Oxford, v.44, n.1, p.53-59, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Energy and protein requirements**. Geneva: FAO/WHO, 1985 (WHO Technical Report Series, n.724).

FREITAS, O.; IZUMI, C.; LARA, M.G.; GREENE, L.J. New approaches to the treatment of phenylketonuria. **Nutr. Rev.**, New York, v.57, n.3, p.65-70, 1999.

FUJIHARA, S.; KASUGA, A.; AOYAGI, Y. Nitrogen-to-protein conversion factor for common vegetables in Japan. **J. Food Sci.**, Chicago, v.66, n.3, p.412-415, 2001.

FUJIHARA, S.; KATSUGA, A.; AOYAGI, Y.; SUGAHARA, T. Nitrogen-to-protein conversion factors for some common edible mushrooms. **J. Food Sci.**, Chicago, v.60, n.5, p.1045-1047, 1995.

GAINES, T.P. Determination of protein nitrogen in plants. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.60, n.3, p.590-593., 1977.

- GIUGLIANI, R.; COSTA, J.C.; DUTRA-FILHO, C.S.; NIEDERWIESER, A. Tetrahydrobiopterin deficiency in two patients with phenylketonuria who did not respond adequately to the dietary treatment. **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v.6, p.557-564, 1983
- GOLC-WONDRA, A.; SKOCIR, E.; PROSEK, M. Determination of monosodium glutamate in food products. **J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC**, Budakalasz, v.8, n.1, p.117-121, 1995.
- GREVE, L.C.; WHEELER, M.D.; GREEN-BURGESON, D.K.; ZORN, E.M. Breast-feeding in the management of the newborn with phenylketonuria: a practical approach to dietary therapy. **J. Am. Diet Assoc.**, Chicago, v.94, n.1, p.305-309, 1994.
- GUIMARÃES, C.P.; LANFER MARQUEZ, U.M. Composição química de tabletes de caldo de carne: nitrogênio protéico, não-protéico e fenilalanina. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.22, n.3, p.308-313, 2002.
- GUNGOR, N.; AYSEGÜI, T.; TRUGAY, C.; ÖZGÜÇ, M.; ÖZALP, I. Microcephaly in a hyperphenylalaninemic infant leading to the diagnosis of maternal hyperphenylalaninemia. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.155, p.257-258, 1996.

-
- GÜTTLER, F.; GULDBERG, P. The influence of mutations on enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.155, suppl.1, p.S6-S10, 1996.
- HERNÁNDEZ, T.; CENTENO, C.; MARTÍNEZ, C.; HERNÁNDEZ, A. Effect of solvent extraction on the nitrogen compounds in alfafa protein concentrate. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, n.5, p.3065-3069, 1995.
- HUNT, M.M.; BERRY, H.K.; WHITE, P.P. Phenylketonuria, adolescence, and diet. **J. Am. Diet Assoc.**, Chicago, v.85, n.10, p.1328-1334, 1985.
- IMAFIDON, G.I.; SOSULSKI, F.W. Nonprotein nitrogen contents of animal and plants foods. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, n.1, p.114-118, 1990b.
- IMAFIDON, G.I.; SOSULSKI, F.W. Nucleic acid nitrogen of animal and plant foods. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, n.1, p.118-120, 1990a.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p. (Volume 1, Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos).

IZHAKI, I. Influence of nonprotein nitrogen on estimation of protein from total nitrogen in fleshy fruits. **J. Chem. Ecol.**, New York, v.19, n.11, 1993.

JARDIM, L.B.; PALMA-DIAS, R.; SILVA, L.C.S.; ASHTON-PROLLA, P.; GIUGLIANI, R. Maternal hyperphenylalaninemia as a cause of microcephaly and mental retardation. **Acta Paediatr.**, Oslo, v.85, p.943-946, 1996.

JONES, C.G.; HARE, D.; COMPTON, S.J. Measuring plant protein with the Bradford assay. 1. Evaluation and standard method. **J. Chem. Ecol.**, New York, v.15, n.3, p.979-992, 1989.

JONES, D.B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. **U. S., Dep. Agric., Circ.**, Washington, v.183, p.1-21, 1931.

KANAYA, K.-I.; HIROMI, K. Determination of low concentration of protein by the biuret method using the "stopped-flow time difference analysis" technique. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.51, n.7, p.1885-1892, 1987.

KOCH, R.; AZEN, C.; FRIEDMAN, E.G.; FISHLER, K.; BAUMANN FRISCHLING, C.; LIN, T. Care of the adult with phenylketonuria. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.155, suppl.1, p.S162-S164, 1996.

KOCH, R.; WENZ, E. Phenylketonuria. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.7, p.117-135, 1987.

KRISHNAN, P.G.; PARK, W.J.; KEPHART, K.D.; REEVES, D.L.; YARROW, G.L. Measurement of protein and oil content of oat cultivars using near-infrared reflectance spectroscopy. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v.39, n.2, p.105-108, 1994.

KUDO, Y.; BOYD, C.A.R. Placental tyrosine transport and maternal phenylketonuria. **Acta Paediatr.**, Oslo, v.85, p.109-110, 1996.

LANFER MARQUEZ, U.M., PENTEADO, M. De V.C. Variação e nível de detalhamento de alguns nutrientes: teor de fenilalanina. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.31, n.2, p.109-111, 1997.

LAPORTE, M.-F.; PAQUIN, P. Near-infrared analysis of fat, protein, and casein in cow's milk. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, n.7, p.2600-2605, 1999.

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.3, p.447-455, 1957.

-
- LEE, S.J.; JEON, I.J.; HARBERS, L.H. Near-infrared spectroscopy for rapid analysis of curds during cheddar cheese making. **J. Food Sci.**, Chicago, v.62, n.1, p.53-56, 1997.
- LEVEY, D.J.; BISSELL, H.A.; O'KEEFE, S.F. Conversion of nitrogen to protein and amino acid in wild fruit. **J. Chem. Ecol.**, New York, v.26, n.7, p.1749-1763, 2000.
- LOURENÇO, S.O.; BARBARINO, E.; DE-PAULA, J.C.; PEREIRA, L.O.S.; MARQUEZ, U.M.L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factor for 19 tropical seaweeds. **Phycol. Res.**, Carlton, v.50, n.3, p.233-241, 2002.
- LOURENÇO, S.O.; BARBARINO, E.; LANFER MARQUEZ, U.M.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **J. Phycol.**, Malden, v.34, n.5, p.798-811, 1998.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

- LUCAS, B.; GUERRERO, A.; SIGALES, L.; SOTELO, A. True protein content and non protein amino acid present in legumes seeds. **Nutr. Rep. Int.**, Stoneham, v.37, n.3, p.545-553, 1988.
- MARKS, D.L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T. Measurement of total protein in plants samples in the presence of tannins. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.147, p.136-143, 1985.
- McCAMAN, M.W.; ROBINS, E. Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. **J. Lab. Clin. Med.**, Saint Louis, v.59, n.5, p.885-890, 1961.
- MIRA, N.V.M.; LANFER MARQUEZ, U.M. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.1, p.86-95, 2000.
- MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds: a reappraisal of its definition and determination: variation according to species and to seed protein content. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, n.1, p.18-24, 1990.
- NGUYEN, T.T.; SPORNS, P. Liquid chromatographic determination of flavor enhancers and chloride in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.67, n.4, p.747-751, 1984.

- NIKOLELIS, D.P. Kinetic – potenciometric determination of monosodium glutamate in soups and soups bases and of glutamic dehydrogenase. **Analyst**, Cambridge, v.112, p.763-765, 1987.
- NOLL, J.S.; SIMMONDS. D.H.; BUSHUK, W. A modified biuret reagent for determination of protein. **Cereal Chem.**, Saint Paul, v.51, n.5, p.610-616, 1974.
- ORMAN, B.A.; SCHUMANN, R.A. Comparison of near-infrared calibration methods for the prediction of protein, oil, and starch in maize grain. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.39, n.2, p.883-886, 1991.
- PASCUAL, J.E. La fenilcetonuria: problemas del diagnostico y tratamiento. **Rev. Cubana Pediatr.**, Havana, v.61, p.744-752, 1989.
- PETERSON, G.L. Determination of total protein. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.91, p.95-119, 1983.
- ROBINSON, H.W.; HODGEN, C.G. The biuret reaction in the determination of serum protein. 1. A study of the conditions necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.135, p.707-725, 1940.

ROSENBERG, I.M. **Protein analysis and purification**: benchtop techniques.

Boston: Birkhäuser, 1996. p.130-131.

SALO-VÄÄNÄNEN, P.P.; KOIVISTOINEN, P.E. Determination of protein in foods: comparison of net and crude protein (Nx6.25) values. **Food Chem.**, Oxford, v.57, n.1, p.27-31, 1996.

SCHAUMBERG, H.H.; BYCK, R.; MASHMAN, J.H. Monossodium L-glutamate: its pharmacology and role in the Chinese restaurant syndrome. **Science**, Washington, v.163, p.826-828, 1969.

SCHMIDT, B.J.; MARTINS, A.M., FISBERG, R.V., MÜLLER, R., ADELL, A.C.A., SUBERO, E.M. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos. **Pediatr. Dia**, Santiago, v.3, p.257-260, 1987.

SCHOEL, B.; WELZEL, M.; KAUFMANN, S.H.E. Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay. **J. Biochem. Biophys. Methods**, Shannon, v.30, p.199-206, 1995.

SCHUETT, V.E. **Low protein list for PKU**. Seattle: National PKU News, 1995. p.156.

- SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; WOO, S.L.C. The hiperphenylalaninemias.
In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., eds. **The metabolic basis of inherited disease**. 6.ed. New York: McGraw-Hill; 1989. p.495-546.
- SHEARD, N.F. Importance of diet in maternal phenylketonuria. **Nutr. Rev.**, New York, v.58, n.8, p.236-239, 2001.
- SIMONNE, A.H.; SIMONNE, E.H.; EITENMILLER, R.R.; MILLS, H.A.; CRESMAN, C.P. Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and protein determinations in foods? **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.73, n.1, p.39-45, 1997.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENSANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.150, p.76-85, 1985.
- SODEK, L.; VECCHIA, P.T.D.; DELFINI, L.D.M.; CROCOMO, O.J. Rapid determination of protein content in brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*) by the biuret method. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.28, n.11, p.1341-1343, 1976.

-
- SOSULSKI, F.W.; IMAFIDON, G.I. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, n.1, p.351-356, 1990.
- STOSCHECK, C.M. Quantification of protein. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.182, p.50-68, 1990.
- TKACHUK, R. Nitrogen-to-protein conversion factor for cereal and oilseed meals. **Cereal Chem.**, Saint Paul, v.46, p.419-423, 1969.
- TOKORO, N.; SAWADA, M.; SUGANUMA, Y.; MOCHIZUKI, M.; MASUZAWA, K.; AOYAMA, Y.; ASHIDA, K. Nitrogen composition of vegetables common to Japan. **J. Food Compos. Anal.**, Orlando, v.1, p.18-25, 1987.
- TSHINYANGU, K.K.; HENNEBERT, G.L. Protein and chitin nitrogen contents and protein content in *Pleurotus ostreatus* var. *columbinus*. **Food Chem.**, Oxford, v.57, n.2, p.223-227, 1996.
- WALKER, R. The significance of excursions above the ADI – case study: monosodium glutamate. **Regul. Toxicol. and Pharmacol.**, Orlando, v.30, p.S119-S121, 1999.

-
- WEGLAGE, J.; FÜNDERS, B.; ULLRICK, K.; RUP, A.; SCHMIDT, E. Psychosocial aspects in phenylketonuria. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.155, suppl.1, p.S101-104, 1996.
- YEOH, H.-H.; TRUONG, V.-D. Protein contents, amino acid compositions and nitrogen-to-protein conversion factors for Cassava roots. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.70, p.51-54, 1996.
- YEOH, H.-H.; WEE, Y.-C. Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plant species. **Food Chem.**, Oxford, v.49, p.245-250, 1994.
- ZAIA, D.A.M.; VERRI, W.A.; ZAIA, C.T.B.V. determination of total proteins in several tissues of rat: a comparative study among spectrophotometric methods. **Microchem. J.**, Amsterdam, v.64, n.3, p.235-239, 2000.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quim. Nova**, São Paulo, v.21, n.6, p.787-793, 1998.