

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA

DANIELE CRISTINA DA SILVA NAPOLI

**BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DA FENILALANINA APÓS A
DIGESTÃO *in vitro***

CAMPINAS

2025

DANIELE CRISTINA DA SILVA NAPOLI

**BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DA FENILALANINA APÓS A
DIGESTÃO *in vitro***

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.*

Aluno: Daniele Cristina da Silva Napoli

Orientador: Maria Teresa Bertoldo

Pacheco

Co-orientador: Júlio Cesar Rocha

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Daniele Cristina da Silva Napoli e orientada pelo Prof(a). Dr(a). Maria Teresa Bertoldo Pacheco.

CAMPINAS

2025

Agência(s): O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

Nº do proc.: Código de Financiamento 001.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha elaborada pela bibliotecária Vangri de Oliveira Camargo CRB/8 6919-0 - Núcleo de Documentação Científica do Instituto Agronômico.

N216b Napoli, Daniele Cristina da Silva
Bioacessibilidade e biodisponibilidade da fenilalanina após a digestão *in vitro*. / Daniele Cristina da Silva Napoli.
Campinas, 2025. 72fls.

Orientador: Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Co-orientador: Júlio Cesar Rocha
Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia De Alimentos–
ITAL

1. Bioacessibilidade. 2. Biodisponibilidade. 3. Fenilalanina.
4. Processamento de alimentos. 5. Células. 6. Caco-2.
I. . Pacheco, Maria Teresa Bertoldo. II. Rocha, Júlio Cesar
III. Título.

CDD. 664.07

Título em inglês: Bioaccessibility and bioavailability of phenylketonuria after *in vitro* digestion.

Key-words: Bioaccessibility; Bioavailability; Phenylalanine; Food processing;
Caco-2 cells.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Vera Sônia Nunes da Silva,
Fabiana Andrea Barrera Galland, Kaciane Andreola.

Data da Defesa: 21 de março de 2025.

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Daniele Cristina da Silva Napoli aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de março de 2025.

Prof.(a) Dr.(a) Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - (Presidente)

Prof.(a) Dr. Júlio Cézar Rocha
Universidade Nova de Lisboa - (co-orientador)

Dr.(a) Vera Sônia Nunes da Silva
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dr.(a) Fabiana Andrea Barrera Galland
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dr.(a) Kaciane Andreola
Instituto de Tecnologia de Alimentos (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

“Não há beleza excelente que não tenha alguma estranheza na proporção”.

Francis Bacon, “Of Beauty”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir estar aqui e por ter me sustentado em todos os momentos da minha vida, especialmente quando, em nossas conversas, pedi forças para concluir meu projeto. O Senhor me atendeu. Muito obrigada.

A minha família, sou imensamente grata pelo apoio. Em especial, à minha mãe, que sempre incluiu minhas análises em suas orações, pedindo para que tudo ocorresse bem.

À minha orientadora, Maria Teresa, agradeço por todo apoio, incentivo, correções e pela gestão deste projeto. Obrigada por acreditar em mim!

Agradeço à Renata, do CIPOI, pela ajuda na aplicação do questionário, pelo apoio e pela parceria. Sua colaboração foi fundamental.

Sou grata a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho. Em especial, à Thalyne, por toda ajuda com as células; à Kaciane, por suas considerações e entusiasmo em relação ao meu trabalho; e à Fabiana e à Vera, por aceitarem compor minha banca de avaliação e pelas valiosas contribuições.

Agradeço ao ITAL e ao programa de pós-graduação pela estrutura e oportunidade de desenvolver meu projeto, assim como a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua conclusão.

E por fim, mas nunca menos importante, agradeço ao meu marido, Otávio. Você me amparou em todos os momentos e me proporcionou oportunidades que eu jamais imaginei ter. Sem seu apoio e amor, eu não seria quem sou hoje. Sempre estarei ao seu lado, assim como você sempre esteve ao meu.

RESUMO

A fenilcetonúria é um distúrbio autossômico recessivo que afeta o metabolismo da fenilalanina, impedindo a conversão desse aminoácido em tirosina e elevando seus níveis no sangue a concentrações tóxicas. O tratamento para esse distúrbio se inicia logo após o diagnóstico, que ocorre através da triagem neonatal, e consiste em uma dieta restrita em proteínas e suplementação com fórmula de aminoácidos livres. O acúmulo da fenilalanina na corrente sanguínea, em casos não tratados, pode causar deficiência intelectual grave, problemas comportamentais, deficiências cognitivas, entre outras disfunções. Considerando que o consumo de proteínas naturais representa uma melhor nutrição ao organismo do que a ingestão de aminoácidos livres, avaliar a biodisponibilidade da fenilalanina nos alimentos e como o método de preparo pode influenciar essa biodisponibilidade é fundamental para o desenvolvimento de terapias dietéticas otimizadas, permitindo um tratamento individualizado e um pouco menos restritivo. O estudo avaliou a bioacessibilidade e a biodisponibilidade da fenilalanina em diferentes matrizes alimentares, considerando a influência do processamento. O objetivo foi determinar o quanto desse aminoácido está biodisponível para absorção após a digestão. A bioacessibilidade representa a porção do alimento que é digerida e está disponível para a absorção e metabolização. Já a biodisponibilidade representa o alimento digerido que é, de fato, absorvido e metabolizado pelo organismo. Foram selecionadas amostras de arroz branco e arroz integral cozidos, batata cozida e batata pré-frita assada, com base em um questionário aplicado a pacientes com fenilcetonúria, pais ou responsáveis por pacientes e profissionais da saúde que atuam nessa área. As amostras foram submetidas a uma digestão gastrointestinal simulada utilizando o protocolo INFOGEST 2.0 e aplicadas em células Caco-2 para avaliar sua biodisponibilidade. Os resultados mostraram que a bioacessibilidade variou conforme a matriz e o processamento. A batata cozida apresentou a maior bioacessibilidade (48,45%), seguida do arroz integral (37,09%), arroz branco (26,80%) e batata pré-frita assada (22,75%). Já a biodisponibilidade, ou seja, o quanto de fenilalanina foi absorvida através da monocamada celular, apresentou variação significativa com o arroz integral apresentando a menor biodisponibilidade (1,43%), seguido da batata cozida (2,39%), do arroz branco (6,83%) e da batata

pré-frita assada, que apresentou uma diferença significativa das demais amostras (95,5%), sugerindo que o processamento térmico intenso pode favorecer a absorção desse aminoácido. Os testes com células Caco-2 indicaram que a monocamada permaneceu íntegra, garantindo resultados confiáveis. A maior biodisponibilidade da batata pré-frita assada pode estar relacionada a redução da umidade e concentração da proteína durante o processamento. Já o arroz integral, composto por alta quantidade de fibras alimentares (2,12%), apresentou menor biodisponibilidade, possivelmente relacionada a dificuldade na digestão e absorção da fenilalanina devido a presença das fibras. Portanto, foi possível concluir que a bioacessibilidade e biodisponibilidade da fenilalanina não dependem apenas da sua composição total no alimento, mas também da composição da matriz alimentar e do tipo de processamento aplicado ao alimento. Os métodos de preparo podem influenciar na absorção da fenilalanina, o que impactaria nas recomendações da quantidade do alimento que pode ser ingerida.

Palavras-chave:

Bioacessibilidade; Biodisponibilidade; Fenilalanina; Processamento de alimentos; Células Caco-2.

ABSTRACT

Phenylketonuria is an autosomal recessive disorder that affects phenylalanine metabolism, preventing the conversion of this amino acid into tyrosine and increasing its blood levels to toxic concentrations. Treatment for this disorder begins immediately after diagnosis, which is carried out through neonatal screening and consists of a protein-restricted diet supplemented with a free amino acid formula. The accumulation of phenylalanine in the bloodstream, in untreated cases, can cause severe intellectual disability, behavioral problems, cognitive impairments, and other dysfunctions. Given that the consumption of intact dietary proteins offers superior nutritional benefits compared to the intake of free amino acids, assessing the bioavailability of phenylalanine in various food sources—and how different preparation methods may affect it—is essential for the development of optimized dietary therapies. Such insights can support more individualized and potentially less restrictive treatment approaches. This study investigated the bioaccessibility and bioavailability of phenylalanine across different food matrices, with particular attention to the effects of food processing. The primary objective was to determine the extent to which this amino acid becomes bioavailable for absorption following digestion. Bioaccessibility refers to the fraction of a nutrient that is released from the food matrix during digestion and is available for absorption and metabolism. In contrast, bioavailability denotes the portion of the digested nutrient that is actually absorbed and utilized by the body. Food samples—including cooked white rice, cooked brown rice, boiled potatoes, and baked pre-fried potatoes—were selected based on a survey administered to patients with phenylketonuria, their parents or caregivers, and healthcare professionals working in the field. The samples underwent simulated gastrointestinal digestion using the INFOGEST 2.0 protocol and were applied to Caco-2 cells to assess their bioavailability. The results showed that bioaccessibility varied depending on the food matrix and processing method. Cooked potato had the highest bioaccessibility (48.45%), followed by brown rice (37.09%), white rice (26.80%), and baked pre-fried potato (22.75%). In terms of bioavailability—i.e., the amount of phenylalanine absorbed through the cell monolayer—there was significant variation, with brown rice showing the lowest bioavailability (1.43%), followed by cooked potato (2.39%), white rice (6.83%), and

baked pre-fried potato, which showed a significant difference from the other samples (95.5%), suggesting that intense thermal processing may enhance the absorption of this amino acid. The Caco-2 cell tests indicated that the monolayer remained intact, ensuring reliable results. The higher bioavailability of baked pre-fried potato may be related to moisture reduction and protein concentration during processing. On the other hand, brown rice, which contains a high amount of dietary fiber (2.12%), showed lower bioavailability, possibly due to the difficulty in digesting and absorbing phenylalanine in the presence of fiber. Therefore, it was concluded that the bioaccessibility and bioavailability of phenylalanine do not depend solely on its total composition in the food but also on the food matrix composition and the type of processing applied. Preparation methods can influence phenylalanine absorption, potentially impacting dietary recommendations regarding the quantity of food that can be consumed.

Key words:

Bioaccessibility; Bioavailability; Phenylalanine; Food processing; Caco-2 cells.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	3
3.2 METABOLISMO DA FENILALANINA.....	6
3.3 FENILCETONÚRIA	8
3.3.1 Histórico da fenilcetonúria	8
3.3.2 Tratamento e controle da fenilcetonúria	12
3.3.3 Tratamentos farmacológicos	15
3.4 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA	22
3.4.1 Processo digestório humano	22
3.4.2 Digestão simulada in vitro.....	23
3.5 CÉLULAS CACO-2.....	24
3.6 BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 ETAPAS DE EXECUÇÃO.....	29
4.2 MATÉRIA-PRIMA	29
4.2.1 Matrizes estudadas	29
4.3 MÉTODOS	30
4.3.1 Seleção das matrizes alimentares	30
4.3.2 Processamento das matrizes alimentares	31

4.3.3 Composição centesimal.....	32
4.3.4 Perfil de aminoácidos	32
4.3.5 Digestão gastrointestinal in vitro e bioacessibilidade	33
4.3.6 Cultura de células Caco-2	34
4.3.7 Avaliação da viabilidade celular (MTT)	35
4.3.8 Resistência elétrica transepitelial (TEER).....	36
4.3.9 Ensaio da biodisponibilidade	37
4.3.10 Ensaios de permeabilidade do corante Lucifer Yellow	38
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 SELEÇÃO DAS MATRIZES ALIMENTARES: PESQUISA DE ADESÃO E DIFICULDADES AO TRATAMENTO	38
5.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS MATRIZES ALIMENTARES SELECIONADAS E PERFIL DE AMINOÁCIDOS	41
5.3 BIOACESSIBILIDADE DA FENILALANINA.....	48
5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	50
5.5 AVALIAÇÃO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS CACO-2	52
5.6 BIODISPONIBILIDADE DA FENILALANINA	55
6 CONCLUSÕES	58
7 REFERÊNCIAS	59
8 ANEXOS	66
8.1 Questionário aplicado aos pacientes ou responsáveis por pacientes fenilcetonúricos.....	66
8.2 Termo de consentimento livre e esclarecido	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APAE – Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
- BH4 – Tetrahidrobiopterina
- CIPOI – Centro Integrado de Pesquisas Oncohepatológicas na Infância
- EC – Enzima e Cofator
- EIM – Erro Inato do Metabolismo
- FCM – Faculdade Ciências Médicas
- APH - hiperfenilalaninemia
- ICIMD – International Classification of Inherited Metabolic Disorders (Classificação internacional de transtornos metabólicos hereditários)
- NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
- PAH – Fenilalanina hidroxilase (*Phenylalanine Hydroxylase*)
- Phe – Fenilalanina (*Phenylalanine*)
- PKU – Fenilcetonúria (*Phenylketonuria*)
- TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Tyr – Tirosina (*Tyrosine*)
- UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU, sigla do inglês *phenylketonuria*), é um distúrbio autossômico recessivo raro, que afeta o metabolismo da fenilalanina, com prevalência no Brasil estimada entre 1:15.000 a 1:25.000 nascidos vivos, dependendo do Estado. É causado por mutações no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase, enzima responsável pela conversão da fenilalanina em tirosina, levando a um acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos a níveis potencialmente tóxicos para o organismo (Ney, Etzel, 2017, Licher-Konecki, Vockley, 2019, VanSprosen *et al.*, 2021, Brasil, 2021A). A concentração deste aminoácido na corrente sanguínea pode causar danos ao sistema nervoso central, como déficits cognitivos e atraso global no desenvolvimento (Brasil, 2021A, VanSprosen *et al.*, 2021, Hofman *et al.*, 2018).

Atualmente existem algumas alternativas de tratamentos medicamentosos para essa doença, tais como a substituição enzimática e o cloridrato de sapropterina, um análogo sintético ao cofator BH4 (VanSprosen *et al.*, 2021; Lah; McPheron, 2021; Mahan; Gandhi; Anand, 2018; Thomas *et al.*, 2018). No entanto, o tratamento mais simples e eficaz para esta doença consiste em dieta restrita em proteínas associada à suplementação de aminoácidos livres. Amplamente utilizado, esse tratamento apresenta dificuldades em sua adesão, especialmente para pacientes jovens e adultos. Além do fato de ser financeiramente dispendiosa, a dieta é também socialmente limitante, exigindo grande disciplina de quem a executa (Licher-Konecki, Vockley, 2019).

Bioacessibilidade refere-se à fração de um composto que se torna solúvel ao ser liberado da matriz alimentar durante a digestão e está disponível para ser absorvido pelo organismo. Pode ser avaliada através da digestão gastrointestinal simulada. (Santos *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2018; De Lima *et al.*, 2014).

A biodisponibilidade refere-se à fração do alimento que é absorvido e metabolizado pelo organismo após a digestão (Kandemir *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2018). Para ser biodisponível, o composto precisa ser bioacessível. A biodisponibilidade de um composto pode ser avaliada através de ensaios com animais ou células.

Modelos de transporte celular Caco-2 têm sido utilizados como indicadores da permeabilidade intestinal e biodisponibilidade de componentes alimentares em estudos *in vitro* (MacGraw, et al. 2014), possibilitando a avaliação da interação entre o alimento e a barreira intestinal (Kondrashina et al., 2023). Estudos anteriores utilizaram esse modelo para avaliar a biodisponibilidade do ferro (Caetano-Silva et al., 2018; Gaigher et al., 2022), transporte de peptídeos da clara de ovo (Wang et al., 2019) e peptídeos de leite humano (Liang; Kim; Dallas, 2022). Outros estudos utilizaram as células Caco-2 para avaliar a biodisponibilidade de aminoácidos em algas marinhas (Trigo et al., 2021), soja (MacGraw et al., 2014), grão-de-bico, fava e tremoço (Rubio; Seiquer, 2002). Não foram encontrados trabalhos que avaliaram a bioacessibilidade e biodisponibilidade da fenilalanina, gerando uma lacuna na compreensão científica sobre a biodisponibilidade desse aminoácido.

O conhecimento da biodisponibilidade da fenilalanina em diferentes alimentos e como diferentes métodos de preparo influenciam essa biodisponibilidade, é fundamental para desenvolver uma terapia dietética otimizada, permitindo um tratamento individualizado e um pouco menos restritivo. Além disso, conhecer o quanto desse aminoácido é absorvido pelo organismo possibilitaria o esclarecimento dos fatores que afetam essa absorção, o que poderia abrir novas perspectivas para o tratamento da fenilcetonúria, beneficiando a qualidade de vida dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o impacto do processamento e variedade das matrizes alimentares selecionadas na bioacessibilidade e biodisponibilidade da fenilalanina, utilizando modelos de células Caco – 2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar questionário aos pacientes fenilcetonúricos para selecionar duas matrizes alimentares dentro dos alimentos permitidos para o consumo.
- Preparar as matrizes selecionadas de acordo com o modo de consumo usual.
- Analisar a composição centesimal e o perfil de aminoácidos das matrizes.
- Realizar a digestão simulada nas amostras para verificar a bioacessibilidade da fenilalanina.
- Avaliar a biodisponibilidade da fenilalanina por meio da permeabilidade celular utilizando cultura de células caco-2.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os organismos vivos realizam uma série de processos bioquímicos complexos responsáveis por coordenar e manter as atividades celulares vitais. Alguns destes envolvem reações de síntese e degradação de nutrientes, sendo o resultado desses processos denominado de metabolismo. Cada processo ocorre em vias metabólicas, organizadas em reações sequenciais, onde o produto de uma etapa se torna o reagente da próxima. O funcionamento adequado dessa cascata de reações depende da ação de enzimas e substratos específicos para cada reação (Agana et al., 2018).

Neste caso, quando ocorre ausência ou deficiência no funcionamento de uma enzima requisitada em qualquer uma das vias metabólicas, geram-se

distúrbios que são denominados Erros Inatos do Metabolismo (EIM) (Agana et al., 2018). Os EIM são doenças genéticas herdadas dos pais, resultantes da ausência ou ação deficiente de enzimas e/ou seus cofatores, proteínas estruturais ou moléculas transportadoras, o que altera significativamente o número de compostos que estão relacionados com essa via. Na maioria dos distúrbios EIM, o mecanismo associado às doenças está relacionado a um defeito enzimático. Esse defeito impede a conversão adequada dos substratos em seus produtos diretos, resultando no acúmulo de metabólitos alternativos ou do próprio substrato, o que pode causar efeitos potencialmente tóxicos para o organismo (Ismail, Showalter, Fiehn, 2019). A Figura 1 representa o mecanismo básico para a maioria dos EIM e mostra que na deficiência da enzima, atuando na rota metabólica, haverá um acúmulo de substrato e formação de metabólitos alternativos gerando um déficit na formação do produto final.

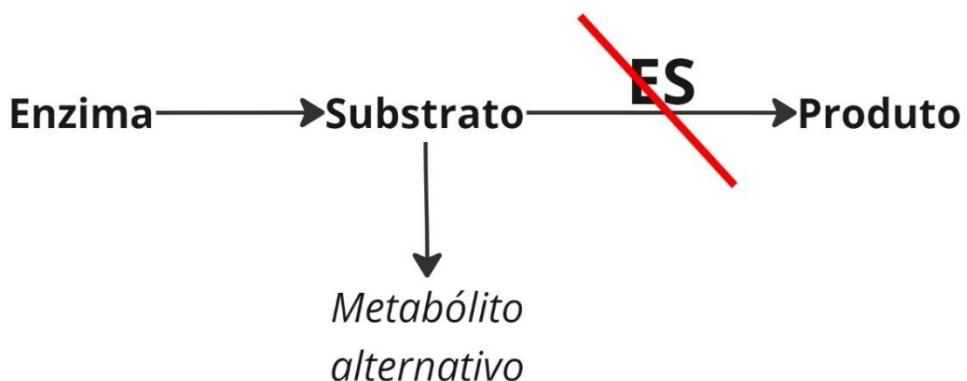


Figura 1 - Mecanismo básico de doenças oriundas de erros inatos do metabolismo devido a defeito enzimático. ES= complexo enzima substrato. Adaptado de Ismail, Showalter, Fiehn, 2019.

Em geral, os EIM são doenças autossômicas recessivas, o que significa que, para a doença se manifestar, o indivíduo precisa herdar um gene defeituoso de ambos os pais. Se o indivíduo herdar o gene defeituoso de apenas um dos pais, ele será portador da doença, mas essa não irá se manifestar. O filho de pais portadores, poderá ainda não ser afetado ou ser afetado, caso em que há a manifestação da doença (Pinto, Faria, Botta, 2021), conforme ilustrado na Figura 2. Cabe ressaltar, que cópias defeituosas podem ocorrer por mutação aleatória, sendo um fator de risco a taxa de casamentos consanguíneos na família (Ismail, Showalter, Fiehn, 2019).

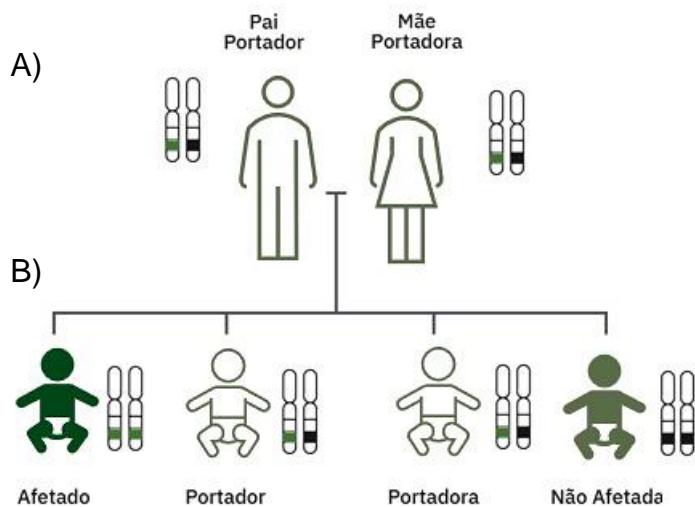


Figura 2 - Representação da probabilidade de transmissões autossômicas recessivas. A) Pai e mãe são portadores. B) Filhos portadores, não afetados ou afetados.

Não há consenso internacional sobre a incidência dos EIM no mundo, resultando numa grande discrepância sobre essa taxa para as diferentes doenças. Isso se deve a fatores regionais como a diversidade genética de cada região e as taxas de consanguinidade estabelecidas, bem como o tamanho do grupo étnico, além da variação nos métodos de análise e tempo de duração de estudos desenvolvidos nos diferentes países (Ismail, Showalter, Fiehn, 2019). Contudo, estima-se que 2 % a 3 % da população mundial seja afetada por algum tipo desses distúrbios, sendo consideradas doenças raras de modo individual, mas frequentes de modo global (Wasim et al., 2018).

Com relação as doenças atualmente identificadas, Ferreira et al. (2021) organizaram uma classificação de distúrbios metabólicos hereditários denominada *International Classification of Inherited Metabolic Disorders* (ICIMD) que inclui mais de 1.450 distúrbios, classificados em: 1) metabolismo intermediário, divido em energia (com 323 patologias), nutrientes (com 226 patologias) e outros (13 patologias); 2) metabolismo de lipídios e transporte (177 patologias); metabolismo de compostos heterocíclicos (172 patologias); 3) metabolismo de moléculas complexas e organelas (327 patologias); 4) metabolismo mineral e cofator (108 patologias) e 5) metabolismo de sinalização celular (118 patologias). Essa classificação leva em consideração a sua patologia, a localização do defeito celular e o tipo de molécula biológica envolvida.

Analizando as patologias descritas na ICIMD, observa-se que, dentro do grande grupo dos distúrbios do metabolismo de nutrientes, estão as aminoacidopatias, caracterizadas por doenças causadas por alterações no metabolismo dos aminoácidos. Em geral, essas patologias resultam de enzimas defeituosas ou inexistentes (Wasim et al., 2018).

Um dos primeiros EIM descobertos, e o mais prevalente, é a fenilcetonúria (Sacharrow, Rajabi, Levy, 2021). Trata-se de um distúrbio no metabolismo do aminoácido fenilalanina, ocasionado por mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH, EC 1.14.16.1), ou por alterações em seu cofator, a tetrahidrobiopterina (BH4) (Lichter-Konecki, Vockley, 2019). A fenilalanina hidroxilase é uma enzima presente no fígado, que converte a fenilalanina em tirosina (Ney, Etzel, 2017; Lichter-Konecki, Vockley, 2019; VanSprosen et al., 2021). A deficiência dessa enzima ou de seu cofator aumenta os níveis de fenilalanina no sangue e, se não for controlado, ocasiona disfunções cerebrais, resultando em distúrbios neurológicos, como deficiência intelectual grave, epilepsia, além de problemas comportamentais e cognitivos (VanSprosen et al., 2021; Hofman et al., 2018).

3.2 METABOLISMO DA FENILALANINA

As proteínas são biopolímeros constituídos por aminoácidos unidos por ligações peptídicas, que são ligações covalentes formadas por reações de condensação (Prasad et al., 2023). Existem 20 aminoácidos que podem compor as proteínas em diferentes quantidades e ordens, formando longas cadeias proteicas (Damodaran, 2010). De acordo com a síntese orgânica em humanos, os aminoácidos são classificados em essenciais e não essenciais. Os essenciais não são sintetizados pelo organismo e precisam ser obtidos através da alimentação, sendo eles: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Já os aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados pelo organismo, principalmente a partir do metabolismo dos aminoácidos essenciais, e incluem a alanina, a asparagina, o aspartato, o glutamato, a serina, a arginina, a cisteína, a glutamina, a glicina, a prolina e a tirosina. Destes, os seis últimos são considerados parcialmente essenciais durante a fase de crescimento ou em certas condições patológicas (Nelson, Cox, 2014).

Estruturalmente, o aminoácido é composto por um grupo amino e um grupo carboxila ligados a um carbono α quiral e diferem entre si por sua cadeia lateral (grupo R), que influencia tanto a estrutura como o peso e a carga elétrica de cada aminoácido, determinando sua solubilidade e afinidade em água (hidrofobicidade ou hidrofilicidade). A outra ligação que confere a quiralidade do carbono α é um hidrogênio, exceto no caso da glicina, cujo grupo R é composto por um segundo átomo de hidrogênio. A fenilalanina, a tirosina e o triptofano, são aminoácidos que possuem um grupo R aromático, apresentando características apolares. Dentre eles, a fenilalanina é o mais apolar, e todos participam de interações hidrofóbicas (Nelson, Cox, 2014; Damodaran, 2010). É importante ressaltar que a tirosina é um aminoácido precursor de neurotransmissores catecolaminas como a dopamina, norepinefrina e epinefrina (Kölker, 2018; MacDonald et al., 2011) e sua principal forma de obtenção é pelo metabolismo da fenilalanina. Assim, qualquer defeito genético nessa via metabólica, pode desencadear sérios prejuízos neurológicos ligados a modulações das emoções (Kylies, Brunne, Rune, 2022; Vansprosen et al., 2021; Licher-Konecki, Vockley, 2019).

A enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), também denominada fenilalanina-4-monoxigenase, é uma enzima que catalisa, de forma simultânea, a hidroxilação de um átomo de oxigênio do oxigênio molecular (O_2) e a redução de outro átomo de oxigênio em água. A ação dessa enzima consiste em metabolizar a fenilalanina em tirosina, contudo sua atividade é dependente do cofator tetrahidrobiopterina (BH4), que realiza a transferência de elétrons do NADH para o oxigênio, oxidando-se para di-hidrobiopterina que será regenerada a tetrahidrobiopterina pela enzima di-hidrobiopterina redutase (Figura 3). Em pessoas com PKU, além do acúmulo de fenilalanina no sangue, a deficiência no funcionamento da enzima, ou defeito na síntese ou reutilização de seu cofator, irá ativar uma rota secundária. Por esta rota, a fenilalanina passa por transaminação com o piruvato, produzindo fenilpiruvato que é excretado na urina em sua forma descarboxilada (fenilacetato) ou reduzida (fenil-lactato) (Nelson, Cox, 2014). Esse metabólito e seus produtos são os principais responsáveis pelo odor de mofo na urina característico de pacientes fenilcetonúricos. Um esquema do metabolismo da fenilalanina e de sua rota secundária é apresentado na Figura 3.

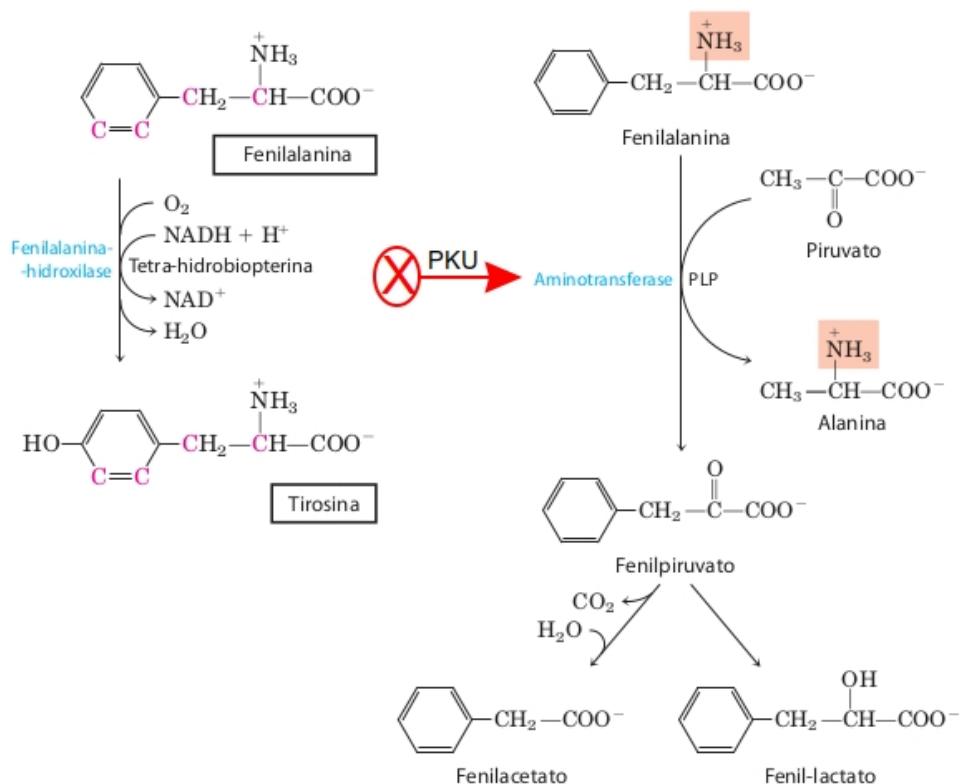


Figura 3 – Metabolismo da fenilalanina a esquerda e rota secundária com produção de metabólitos alternativos em pacientes com fenilcetonúria a direita. Fonte: adaptado de Nelson, Cox, 2014.

3.3 FENILCETONÚRIA

3.3.1 Histórico da fenilcetonúria

Em 1934 o médico e bioquímico norueguês Asbjörn Fölling investigou amostras de urina de dois irmãos que apresentavam atraso global no desenvolvimento e cuja urina apresentava odor de mofo. O objetivo era verificar se havia uma correlação entre a condição mental das crianças e o odor característico da urina. Para isso, Fölling adicionou cloreto férrico a 10%, normalmente utilizado para estudar cetonas, às amostras de urina acidificadas e observou que, imediatamente após a adição do reagente, as amostras apresentaram uma coloração verde-escura, que desaparecia em poucos minutos. Após realizar uma extração orgânica e isolar a substância presente nas amostras de urina, Fölling descobriu se tratar do ácido fenilpirúvico. Concluiu ainda, que o ácido fenil-acético, um subproduto do ácido fenilpirúvico, era o responsável pelo odor de mofo. Para

verificar a possível relação entre o ácido fenilpirúvico e o atraso mental das crianças, Fölling analisou amostras de urina de 430 crianças com a mesma condição mental. Desse total, 8 crianças apresentavam a mesma substância na urina, incluindo mais dois pares de irmãos, sugerindo uma mutação genética autossômica recessiva hereditária (Centerwall, Centerwall, 2000; Williams, Mamotte, Burnett, 2008; Sacharrow, Rajabi, Levy, 2021).

Essa condição foi nomeada por Fölling de *Imbecillitas phenylpyruvica* em decorrência do distúrbio mental grave que acarretava e do ácido fenilpirúvico encontrado na urina. Em 1937, o geneticista inglês Lionel Penrose utilizou o termo *phenylketonuria* (fenilcetonúria) devido a presença de uma cetona na urina (ácido fenilpirúvico), que passou a ser conhecida, anos mais tarde, por sua abreviação PKU (Centerwall, Centerwall, 2000; Bortoluzzi, 2019; Sacharrow, Rajabi, Levy, 2021).

A hipótese de causa dessa condição foi levantada na década de 1940 por George Jervis, que teorizou como sendo um erro na metabolização da fenilalanina em tirosina, o que foi comprovado em 1953. Nesse mesmo período, Horst Bickel desenvolveu o primeiro tratamento dietético para a fenilcetonúria a partir da remoção da fenilalanina (Phe) de um hidrolisado de caseína. Bickel instruiu a mãe de uma criança fenilcetonúrica a alimentar a criança somente com esse hidrolisado, e observou uma melhora significativa no desenvolvimento global da criança, bem como nos níveis séricos de fenilalanina e desaparecimento do odor de mofo da urina. Ao adicionar a fenilalanina ao hidrolisado e administrá-lo à criança, os sintomas da fenilcetonúria voltaram a se manifestar. Durante a década de 1950, já havia a comercialização de fórmulas proteicas sem a fenilalanina, tornando-se a primeira possibilidade de tratamento da doença (Sacharrow, Rajabi, Levy, 2021). O tratamento dietético segue até os dias de hoje como o principal tratamento para o controle dos níveis de fenilalanina no sangue (Vockley et al., 2014).

Apesar do desenvolvimento de tratamento para pacientes com PKU, baseado em uma dieta restrita em proteínas naturais, a doença só podia ser diagnosticada por meio de uma reação entre o ácido fenilpirúvico presente na urina e o cloreto férrico. Embora esse teste fosse eficaz, só era possível detectar a condição após alguns meses de vida, aumentando assim o risco de danos cerebrais irreversíveis (Bortoluzzi, 2019).

Ainda na década de 1950, o médico e microbiologista norte-americano Robert Guthrie desenvolveu um ensaio de inibição bacteriana que possibilitava a determinação semiquantitativa dos níveis de fenilalanina no sangue. O princípio do ensaio baseia-se na inibição competitiva do crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* em gel ágar, causada pela competição entre o composto inibidor B-2-tienilalanina e fenilalanina presente no sangue que é coletado em papel filtro e eluido no gel. Quando há um excesso de fenilalanina, esta neutraliza o inibidor, permitindo o crescimento bacteriano ao redor das tiras de papel filtro colocadas no ágar, o que indica os níveis do aminoácido no sangue. Guthrie também observou que o teste podia ser realizado com amostras de sangue seco impregnadas no papel filtro (Sacharrow, Rajabi, Levy, 2021).

Para validar o teste em larga escala, Guthrie testou aproximadamente 3.000 indivíduos com deficiência mental que residiam em uma instituição para pessoas com deficiências. Dentre esses, 23 foram diagnosticados com fenilcetonúria, sendo que quatro não haviam sido detectados pelo teste de análise de urina. Devido à sensibilidade e eficácia do novo teste, ele passou a ser usado em recém-nascidos antes da alta hospitalar. Em dois anos, Guthrie realizou a triagem de 400.000 bebês de 29 estados norte-americanos, identificando 39 casos de fenilcetonúria, o que estabeleceu uma incidência de 1 caso para 10.000 nascimentos nos Estados Unidos. Assim, iniciou-se um movimento para tornar a triagem neonatal obrigatória em todo o território norte-americano, sendo aos poucos ampliado para outros países e com possibilidade de detecção de outras doenças (Bortoluzzi, 2019).

Com o advento da tecnologia, a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) ampliou o número de distúrbios que podem ser detectados através de amostras de sangue seco coletados em papel filtro. A metodologia se mostrou ágil e sensível ao utilizar uma pequena quantidade de amostra para a detecção simultânea de mais de 30 condições, passando a ser utilizado nos programas de triagem neonatal (Bortoluzzi, 2019).

No Brasil, a triagem neonatal para fenilcetonúria teve início em 1976 na Associação de Pais e Amigos dos Expcionais (APAE) de São Paulo e passou a ter algumas iniciativas isoladas por parte dos Estados e Municípios. Somente em 2001 é que foi implementado pelo Ministério da Saúde o Programa Nacional de

Triagem Neonatal (PNTN) a partir do Regulamento nº 822 de 06 de junho de 2001 com uma cobertura total de nascidos vivos. Na fase I de implantação só eram detectados fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito. Na fase II de implantação do programa, passaram a ser detectados também as hemoglobinopatias. Na fase III a fibrose cística foi acrescentada ao programa de rastreamento e na fase IV foram incorporadas a hiperplasia adrenal congênita e a deficiência de biotinidase (Bortoluzzi, 2019).

Em 26 de maio de 2021 foi sancionada a Lei nº 14.154 (ainda não regulamentada), alterando a Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990 (Estatuto da Criança e do Adolescente), para aperfeiçoar o PNTN, incluindo um rol mínimo de doenças rastreadas pelo teste do pezinho, a serem implantadas de forma escalonada em cinco etapas. A primeira etapa inclui as doenças já rastreadas pelo teste do pezinho, sendo elas: fenilcetonúria e outras hiperfenilalaninemias, hipotireoidismo congênito, doença falciforme e outras hemoglobinopatias, fibrose cística, hiperplasia adrenal congênita, deficiência de biotinidase e toxoplasmose congênita. A segunda etapa inclui as galactosemias, aminoacidopatias, distúrbios do ciclo da ureia e distúrbios da betaoxidação dos ácidos graxos. A terceira etapa inclui doenças lisossômicas. As imunodeficiências primárias são adicionadas na quarta etapa e na quinta e última etapa é incluída a atrofia muscular espinhal (Brasil, 2021 C).

Sendo o primeiro EIM a ser diagnosticado pela triagem neonatal, a fenilcetonúria pode ser classificada de acordo com a concentração de fenilalanina detectada no sangue, na condição não tratada. A faixa normal de concentração de fenilalanina no sangue é de 50-110 $\mu\text{mol/L}$ (micromol de fenilalanina por litro de sangue). Quando os níveis de fenilalanina são superiores a 1200 $\mu\text{mol/L}$ a condição é classificada como fenilcetonúria clássica. Para níveis entre 900-1200 $\mu\text{mol/L}$ é denominada fenilcetonúria moderada. Entre 600-900 $\mu\text{mol/L}$ é classificada como fenilcetonúria leve, e entre 120 e 600 $\mu\text{mol/L}$ como hiperfenilalaninemia não fenilcetonúria. No entanto, é difícil medir esses níveis com precisão, principalmente por ser em estado não tratado. A fenilcetonúria clássica, quando não tratada, está diretamente associada a graves problemas cognitivos e neurológicos. Por outro lado, nas hiperfenilalaninemias com níveis de fenilalanina inferiores a 360 $\mu\text{mol/L}$

em estado não tratado, não há risco de manifestação de sintomas (Sacharrow, Rajabi, Levy, 2021; Blau, VanSprosen, Levy, 2010).

Ainda não está clara a causa precisa das disfunções cerebrais em pacientes com fenilcetonúria, mas estudos sugerem que possa estar ligado a competitividade da fenilalanina para se ligar a transportadores de aminoácidos neutros pela barreira hematoencefálica, prejudicando o transporte desses aminoácidos e impedindo ou dificultando a síntese de proteínas no cérebro (Kylies, Brunne, Rune, 2022; Vansprosen et al., 2021; Hofman et al., 2018). Além disso, em pessoas sem fenilcetonúria, a fenilalanina hidroxilase faz a quebra da fenilalanina em tirosina (Tyr), aminoácido precursor de neurotransmissores. Logo, altos níveis de Phe, representam também uma quantidade baixa de Tyr e dos neurotransmissores dependentes (Kylies, Brunne, Rune, 2022; Vansprosen et al., 2021). Essa baixa quantidade poderia estar ligada a transtornos de ansiedade em pacientes com fenilcetonúria, principalmente adolescentes e jovens adultos que interrompem o tratamento (Lichter-Konecki, Vockley, 2019).

3.3.2 Tratamento e controle da fenilcetonúria

Após o diagnóstico da doença ter sido realizado em triagem neonatal pelo teste do pezinho, em que uma amostra de sangue proveniente do calcâncar do bebê é coletada e aplicada em um papel filtro (VanSprosen et al., 2021), o neonato já inicia o tratamento para controle da doença. A principal forma de tratamento, desde sua descoberta até os dias de hoje, ainda é a terapia dietética e a nutrição (MacDonald et al., 2011).

A recomendação dietética primordial consiste em restringir o consumo de alimentos contendo teores elevados de proteínas. Para esses indivíduos as proteínas naturais íntegras, tais como carnes, leguminosas e lácteas, são substituídas por alimentos de baixo teor proteico e suplementação com fórmulas medicinais compostas por uma mistura de aminoácidos livres ausente de fenilalanina (Lichter-Konecki, Vockley, 2019; Hofman et al., 2018; Ney, Etzel, 2017).

Alimentos com baixo teor de proteína como batata, alguns vegetais e a maioria dos cereais podem ser consumidos, desde que seja em porções limitadas (Blau, VanSprosen, Levy, 2010). Os produtos alimentares com baixo teor de proteína compostos por carboidratos e gorduras, são os responsáveis pelo

fornecimento da energia necessária. Isso permite que, até certo ponto, essa dieta se aproxime dos hábitos alimentares comuns. O sucesso do tratamento, com alimentos de teor proteico reduzido, se deve principalmente ao fato da fenilalanina ser um aminoácido essencial e, portanto, não ser sintetizado no organismo humano (VanSprosen et al., 2021).

O êxito do tratamento depende de informações sobre a quantidade de fenilalanina presente nos alimentos. Com o objetivo de tornar essa informação acessível e confiável, a ANVISA desenvolveu um painel para consulta do conteúdo de fenilalanina em alimentos *in natura* e industrializados, obtidos a partir de metodologias adequadas, passando a ser uma referência na elaboração das dietas desses pacientes (Brasil, 2020).

As indústrias de alimentos são obrigadas a apresentar junto a ANVISA a quantidade de fenilalanina presente em alimentos com teor proteico entre 0,1 e 5%, em conformidade com as disposições da Resolução – RDC Nº 617, de 9 de março de 2022, que estabelece a obrigatoriedade da realização de análises laboratoriais e a disponibilização dos dados, através de sistema eletrônico, referente aos teores de fenilalanina, proteínas e umidade em alimentos industrializados na forma como são comercializados (Brasil, 2022).

A ANVISA revisa os dados recebidos e adiciona as informações ao painel, que contém dados do conteúdo de fenilalanina de 74 alimentos *in natura* e mais de 2.000 produtos industrializados. O painel conta ainda, com opções de busca por produto, marca, categoria e quantidade específica de fenilalanina no produto (BRASIL, 2020) facilitando o acesso à essa informação.

Embora o tratamento dietético tenha se mostrado eficaz na prevenção dos sintomas mais graves da doença, esse não está isento de efeitos colaterais. A restrição da dieta necessária para essa condição pode causar deficiências nutricionais, que são amenizadas com o consumo de fórmulas de aminoácidos livres sem fenilalanina suplementadas com esses nutrientes (MacDonald et al., 2011).

Além disso, uma dieta pobre em proteínas naturais também tem seus efeitos adversos na saúde dos indivíduos, tais como restrição de crescimento, alopecia, letargia e erupções eczematosas, sendo esses sintomas sinais de alerta, devendo haver constante monitoramento nutricional e adaptação do tratamento

dietético (VanSprosen et al., 2021). Esses sintomas podem estar relacionados a falta das vitaminas D e B12 e de oligoelementos como zinco e selênio, que são encontrados em carnes vermelhas, peixes e cereais, alimentos que são proibidos ou têm alta restrição na dieta. Embora para a vitamina D e B12 a suplementação através da fórmula de aminoácidos livres seja eficiente, ainda há relatos de deficiência para minerais como zinco e selênio, não sendo suficientemente adquiridos através da suplementação (MacDonald et al., 2011).

Outra dificuldade na adesão ao tratamento dietético está na inclusão da suplementação com a mistura de aminoácidos. O sabor desagradável da fórmula dificulta o consumo (MacDonald et at., 2020) e a absorção dos aminoácidos livres não é tão eficiente quanto a das proteínas naturais. Além disso, na proteína intacta, ocorre menores perdas de nitrogênio quando comparado aos aminoácidos livres (MacDonald et at., 2011).

Inicialmente, os substitutos proteicos eram compostos por hidrolisados proteicos que não eram completamente isentos de fenilalanina em sua formulação, exigindo uma redução ainda maior no consumo de proteínas naturais. Atualmente, existem misturas totalmente isentas desse aminoácido, permitindo que o consumo de fenilalanina seja proveniente somente da ingestão de proteínas naturais. No entanto, apesar das melhorias constantes na formulação, de textura e sabor, este último ainda é insatisfatório, apresentando amargor e um gosto residual (VanSprosen et al., 2021; MacDonald et al., 2020).

Alguns substitutos como o glicomacropéptídeo (GMP), proveniente do soro de leite e desprovido de fenilalanina, apresenta melhor sabor e sensação de saciedade. Entretanto, falta em sua composição outros aminoácidos essenciais como triptofano, leucina, metionina, histidina e a tirosina, que nesse caso pode ser incluída como um aminoácido essencial, visto que sua sintetização se deve através da via metabólica da fenilalanina. A inclusão desses aminoácidos ao GMP para torná-lo nutricionalmente mais completo afeta negativamente o sabor do produto. Outro ponto negativo é o fato de que, proteínas residuais contendo fenilalanina, não são facilmente separáveis do GMP quando isoladas do soro de leite, podendo apresentar resquícios de fenilalanina na formulação (VanSprosen et al., 2021).

Já com relação a absorção, os aminoácidos livres não são absorvidos da mesma maneira que aminoácidos inseridos em proteínas naturais. Para aumentar

a taxa de entrega e absorção desses componentes, alguns revestimentos podem ser incorporados ao produto (VanSprosen et al., 2021). No estudo realizado por McDonald et al. (2020), foi avaliado a aceitabilidade de um substituto proteico de liberação prolongada com revestimento de etilcelulose e arginato. Dentre os 13 participantes, apenas sete conseguiram consumir a dose prescrita por um período de sete dias, sendo relatado menos sintomas gastrointestinais em comparação a dieta usual. Além disso, o gosto amargo do substituto proteico foi mascarado, podendo ser consumido junto com a comida ou bebida, se mostrando promissor para estudos a longo prazo.

Além da deficiência nutricional e do gosto desagradável da suplementação, incluem-se como fatores adversos ao tratamento dietético problemas sociais e econômicos, principalmente para pacientes fenilcetonúricos adolescentes e jovens adultos. Por vezes, pacientes tratados desde o nascimento não apresentam problemas graves relacionados a doença ao longo da vida. No entanto, ao chegarem à adolescência e início da vida adulta, muitos descontinuam o tratamento por períodos, o que provoca o aumento da fenilalanina no sangue, desencadeando os problemas descritos anteriormente (Lichter-Konecki, Vockley, 2019).

3.3.3 Tratamentos farmacológicos

Atualmente existem no mercado duas opções de tratamentos farmacológicos para a fenilcetonúria que atuam diminuindo a concentração de fenilalanina no sangue, sendo o medicamento cloridrato de sapropterina e a reposição enzimática por uma forma recombinante PEGuilada da enzima fenilalanina amônia liase.

3.3.3.1 Cloridrato de sapropterina (BH4)

O medicamento dicloridrato de sapropterina, análogo sintético ao BH4, tem sido utilizado no tratamento da fenilcetonúria ajudando a controlar os níveis de fenilalanina no sangue. Resultados do primeiro uso de BH4 foram relatados por Kure et al. (1999), onde observaram diminuição nos níveis de fenilalanina no sangue de pacientes com fenilcetonúria após a administração oral do cofator. Com sua utilização, alguns pacientes conseguem renunciar à dieta e outros apresentam

um aumento na tolerância a ingestão de fenilalanina. Entretanto, apenas um grupo pequeno de pacientes apresenta responsividade a esse tratamento (VanSprosen et al., 2021; Brasil, 2018), pois para ser eficiente, o tratamento requer alguma atividade residual da enzima fenilalanina hidroxilase (Mahan, Gandhi, Anand, 2018).

Para determinar a hiperfenilalaninemia (HPA) responsiva a BH4, deve-se realizar um teste de carga com BH4, sendo que o paciente deve apresentar níveis iniciais de fenilalanina no plasma superiores a 400 μ mol/L. De acordo com Blau e Erlandsen (2024) a dosagem de BH4 é administrada considerando o peso do paciente (20mg/kg de peso corporal) e os níveis de fenilalanina e tirosina devem ser monitorados no plasma ou no sangue no período de 4, 8 e 24 h após a administração da dose. O teste é considerado positivo ao apresentar as concentrações plasmáticas de fenilalanina reduzidas a níveis inferiores a 30% dentro de 8 h ou apresentar redução de 50% dentro de 24 h, em comparação com as concentrações iniciais.

No Brasil, o teste de responsividade ao BH4 é realizado a partir de diferentes protocolos com variabilidades de dose (10 ou 20 mg/kg/dia, em dose única ou distribuída ao longo dia) e de período de avaliação podendo durar horas, dias ou meses. Para ser considerado responsivo, deve-se obter redução de fenilalanina maior ou igual a 30% em relação ao nível basal, após um período de 24 h da administração do medicamento (Brasil, 2018).

Para implementação do BH4 no portfólio de terapias disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) elaborou um plano orçamentário no ano de 2018. Esse estudo está inserido dentro do Relatório de Recomendação de Medicamento nº 402 e compara os custos com as fórmulas metabólicas e os possíveis custos com o dicloridrato de sapropterina (Brasil, 2018), essa comparação pode ser observada na Tabela 1. Os valores estão relacionados com a quantidade de fórmula ou medicamento indicada para cada faixa etária e peso médio do paciente. A posologia do dicloridrato de sapropterina indicada na bula é de 10 mg/kg/dia (10 miligramas de medicamento por quilo do paciente por dia), e o menor preço de compra do medicamento no Brasil em 2018 foi apurado em R\$ 65,47 a dose de 100 mg. O medicamento é contraindicado para menores de 4 anos.

Tabela 1 – Comparação dos custos da fórmula de aminoácidos com o medicamento dicloridrato de sapropterina (BH4) por paciente por ano.

Idade (anos)	Peso médio (kg)	Custo por paciente/ano	
		Fórmula de aminoácidos isenta de fenilalanina (R\$)	Dicloridrato de sapropterina (R\$)
<1	8,4	5.672,10	
1	11,2	6.302,33	
2	13,7	7.709,10	
3	15,7	6.007,47	
4	17,8	6.811,02	47.793,10
5	19,75	7.557,17	47.793,10
6	22,2	8.494,65	47.793,10
7	25	9.566,04	71.689,65
8	27,7	10.599,17	71.689,65
9	31,65	8.416,64	71.689,65
10	33,35	8.868,72	71.689,65
11	38,15	7.459,69	95.586,20
12	43,1	8.427,59	95.586,20
13	47,65	9.317,28	119.782,75
14	51,115	10.001,65	119.782,75
15	54,8	6.857,83	119.782,75
16	56,7	7.095,60	143.379,30
17	58,6	7.333,37	143.379,30
18	60,35	7.552,37	143.379,30
19	61,05	7.639,97	143.379,30
20-24	63,6	7.959,09	143.379,30
25-29	66,6	8.334,51	167.275,85
30-34	68,1	8.522,23	167.275,85
35-44	69,2	8.659,89	167.275,85
45-54	69,85	8.741,23	167.275,85
55-64	69,2	8.659,89	167.275,85
65-74	66,85	8.365,80	167.275,85
>75	63	7.884,00	143.379,30

Fonte: Brasil, 2018.

O custo excessivamente elevado do medicamento, associado com a carência de dados sobre eventos adversos a longo prazo e a incerteza sobre seus benefícios, levaram à decisão de não incorporar o medicamento ao SUS para pacientes com fenilcetonúria acima de cinco anos. Entretanto, foi aprovada a disponibilização para mulheres gestantes ou em fase de pré-concepção responsivas ao tratamento e que apresentam alguma atividade residual da fenilalanina hidroxilase. O uso desse medicamento visa facilitar o controle da doença na gestação, mantendo os níveis de fenilalanina plasmática entre 2 e 6 mg/dL. Elevados níveis de fenilalanina em mulheres grávidas, denominada PKU materna, apresentam riscos significativos de malformações congênitas como a microcefalia, mal formações cardíacas, estrabismo e alterações vertebrais no bebê (Brasil, 2018). Em 2021 o medicamento passou por nova avaliação pela CONITEC e consulta pública. Novamente, o plenário da comissão concluiu que não havia novas evidências científicas e que o tratamento com esse medicamento continua sendo ineficaz do ponto de vista do SUS (Brasil B, 2021). Contudo, esse medicamento possui liberação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comercialização, sendo vendido sob prescrição médica, onde 30 comprimidos de 100 mg apresentam em 2024, valores entre R\$ 5.777,81 e 6.193,42, a depender da região e do Estado¹.

3.3.3.2 Reposição da enzima fenilalanina amônia liase

Outro tratamento farmacológico disponibilizado recentemente aos pacientes com fenilcetonúria é a substituição enzimática. O medicamento pegvaliase, aprovado em 2018 pela *Food and Drug Administration* (FDA)², é indicado para reduzir os níveis de fenilalanina no sangue de pacientes adultos com a doença não controlada com o tratamento dietético ($\geq 600 \mu\text{mol/L}$; 10 mg/dL) (Mahan, Gandhi, Anand, 2018; Lah; McPheron, 2021). Esse medicamento é um conjugado covalente da enzima fenilalanina amônia liase de *Anabaena variabilis*

¹ Cotações disponíveis no site Farmaindex, uma plataforma gratuita de utilidade pública para pesquisa e comparativo de preços de medicamentos. Disponível em: <https://farmaindex.com/kuvan/50344>, acesso em 12/10/2024.

² Órgão do departamento de saúde dos Estados Unidos que regulamenta e fiscaliza a qualidade de produtos, visando a garantia da saúde pública.

com NHS-metoxipolietilenoglicol (NHS-PEG), que converte a fenilalanina em amônia e ácido trans-cinâmico, um subproduto não tóxico, que são metabolizados pelo fígado (Mahan; Gandhi; Anand, 2018; Thomas et al., 2018; Lah; McPheron, 2021).

O medicamento é ministrado via subcutânea em dosagens que variam de 20 a 60 mg por dia e o paciente deve receber treinamento para reconhecer e tratar choque anafilático, pois este é o principal efeito colateral do medicamento. O paciente deve ser instruído a levar epinefrina injetável consigo ao longo do tratamento, podendo a anafilaxia ocorrer em qualquer período, mas principalmente observada no início do tratamento e quando há o aumento da dose do medicamento. A dose inicial é de 2,5 mg de pegvaliase por semana, durante quatro semanas, sendo aumentada gradualmente em dose e frequência até atingir o efeito necessário, reconhecido pelo monitoramento dos níveis de fenilalanina (Lah; McPheron, 2021).

No Brasil, em 2024, os valores da dose de 10 mg de pegvaliase variam entre R\$ 3.463,86 e 3.713,01 a depender da região e Estado³. O medicamento foi aprovado recentemente no Brasil pela ANVISA (2024)⁴, e ainda não está disponível no SUS. Atualmente, o medicamento só está disponível para compra através de importação.

Considerando o valor e a dificuldade de adquirir esses tratamentos farmacológicos, os quais não são distribuídos pelo SUS, o tratamento tradicional por restrição dietética continua sendo o prevalente. O presente estudo teve como objetivo expandir o conhecimento sobre a biodisponibilidade da fenilalanina presente em alimentos naturais, após sua digestão. A possibilidade desse aminoácido não ser totalmente disponibilizado para absorção poderia mudar a perspectiva quanto a quantidade de consumo de alimentos.

Cabe ressaltar que o consumo de proteínas naturais representa uma melhor nutrição ao organismo humano do que a ingestão de aminoácidos livres, e que nem todo aminoácido digerido é biodisponível para a absorção (VanSprosen et al., 2021;

³ Cotações disponíveis no site Farmaindex, uma plataforma gratuita de utilidade pública para pesquisa e comparativo de preços de medicamentos. Disponível em: <https://farmaindex.com/palynziq/58654>, acesso em 12/10/2024.

⁴ Notícia disponível em: <https://veja.abril.com.br/saude/tratamento-inovador-para-fenilcetonuria-e-aprovado-pela-anvisa>, acesso em 12/10/2024.

MacDonald et at., 2011). Assim, torna-se importante estudos que visem analisar o perfil dos alimentos que passam por processamentos, como a cocção e fritura, visando analisar o comportamento proteico desses alimentos e quanto do aminoácido fenilalanina passa a ser biodisponível após a digestão gastrointestinal dos mesmos. Ao nosso conhecimento, essa abordagem pode contribuir para a compreensão do comportamento biodinâmico da fenilalanina dentro da matriz alimentar, de alimentos específicos, visto não ter sido encontrado estudos similares na literatura.

A Tabela 2, resume as vantagens e desvantagens de cada tratamento disponibilizado para a fenilcetonúria atualmente.

Tabela 2 – Tratamentos atuais para fenilcetonúria e a vantagens e desvantagens de cada um deles.

Tipo de tratamento	Informações relevantes	Vantagens	Desvantagens	Comparação entre tratamentos
Terapia dietética e nutricional	Consiste na restrição de alimentos ricos em fenilalanina (Phe) e na suplementação com fórmula de aminoácidos (AA) livres, sem Phe. Pode incluir o Glicomaclopeptídeo (GMP) como alternativa a fórmula de AA livres, sem Phe.	Controle eficaz da fenilalanina no sangue. Possibilita uma vida normal se bem seguida.	Restritiva, exigindo substitutos proteicos e alimentos de baixo teor proteico. Pode causar deficiências nutricionais (ex.: vitaminas D e B12, zinco e selênio). Baixa adesão na adolescência/adultos. Fórmula de aminoácidos livres pouco palatáveis.	Forma tradicional e mais acessível. Controle eficaz, mas de difícil manutenção. Requer acompanhamento nutricional constante.
Cloridrato de Sapropterina (BH4)	Análogo sintético da tetrahidrobiopterina (BH4). Requer que o paciente tenha alguma atividade residual da fenilalanina hidroxilase.	Pode permitir maior ingestão de Phe. Alguns pacientes podem renunciar a dieta. Medicamento de fácil administração (via oral).	Somente uma parcela dos pacientes responde a esse tratamento. Alto custo e não disponibilizado pelo SUS. Necessário teste de responsividade.	Alternativa para flexibilizar o tratamento dietético em pacientes responsivos. Mais caro do que a dieta convencional.
Reposição enzimática (Pegvaliase)	Atua convertendo a Phe em subprodutos não tóxicos. Administração subcutânea, com aumento gradual da dose.	Reduz os níveis de Phe no sangue. Pode permitir dieta menos restritiva.	Efeito colateral (risco de anafilaxia). Necessidade de acompanhamento médico rigoroso. Alto custo e com necessidade de importação para o Brasil, não sendo disponibilizado pelo SUS.	Alternativa para pacientes com PKU grave não controlada pela dieta. Custo elevado e efeitos adversos limitam seu uso.

3.4 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA

3.4.1 Processo digestivo humano

O processo digestivo tem início na boca com a mastigação, onde ocorre a quebra física do alimento, e liberação da enzima amilase salivar, responsável pela quebra do amido e outros carboidratos. Na sequência, o bolo oral é transferido para o estômago, por deglutição. No estômago, as secreções gástricas contendo ácido clorídrico, muco e enzimas digestivas, como a pepsina e lipase, se misturam ao bolo alimentar, formando um meio de pH ácido entre 1,5 e 2,5 (da Silva, 2016). A Figura 4 apresenta uma representação do trato gastrointestinal humano.

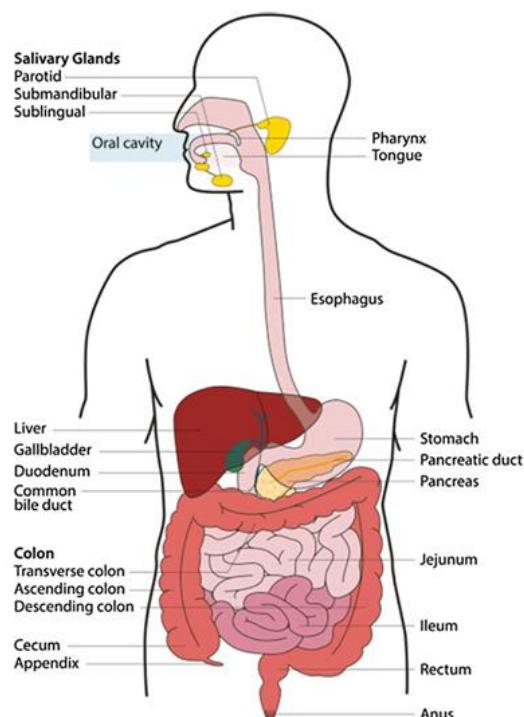


Figura 4 – Trato gastrointestinal. Fonte: Verhoeckx et al, 2015.

O produto da digestão estomacal, denominado de quimo gástrico passa para o intestino delgado por movimento peristáltico, onde terá contato com o suco pancreático/duodenal, composto por um complexo enzimático contendo proteases (tripsina, quimiotripsina, peptidases A e B) que atuam sobre peptídeos e proteínas que ainda não tenham sido clivadas. Nessa etapa ocorre uma mudança no pH do meio com a liberação de bicarbonato de cálcio, responsável por elevar o pH a nível básico (da Silva, 2016). A parte final da digestão ocorre no jejuno e duodeno,

quando a maior parte dos nutrientes serão absorvidos. O quimo que não foi absorvido é encaminhado ao intestino grosso, onde ocorre a fermentação por bactérias da microbiota, que decompõem os componentes mais complexos que não podem ser digeridos por enzimas humanas e, por fim, se transforma no bolo fecal que é posteriormente excretado (Verhoeckx et al., 2015).

3.4.2 Digestão simulada *in vitro*

Há várias técnicas na literatura para modelos *in vitro* que simulam a digestão gastrointestinal e, dentre esses modelos, o protocolo padronizado de digestão estática *in vitro*, proposto pela rede INFOGEST, é um modelo de digestão estática amplamente utilizado que permite avaliar a bioacessibilidade de compostos (Gonçalves et al., 2024). No método INFOGEST 2.0, o alimento é submetido às três fases do processo digestivo: oral, gástrica e intestinal. Em cada fase, as condições experimentais, como pH, tempo de digestão e atividade enzimática, são mantidas constantes (Brodkorb et al., 2019).

As vantagens dessa metodologia estão em sua simplicidade, reproduzibilidade, robustez, custos relativamente baixos e possibilidade de avaliação do alimento em cada fase da digestão. No entanto, como um método estático, o protocolo apresenta algumas desvantagens que impede a avaliação cinética da digestão, já que não é possível simular as dinâmicas complexas do processo digestivo. Durante a fase gástrica o pH é mantido constante, a adição do fluido gástrico é realizada de uma só vez e não há o esvaziamento gástrico. Já na fase intestinal, essa é considerada como uma única fase, sem as separações duodenal, jejunal e ileal, que possuem condições como pH, diluições, conteúdo mineral e atividades enzimáticas, diferentes entre si. Entretanto, mesmo com essas desvantagens o modelo padronizado apresenta boa correlação com os pontos finais de cada fase da digestão *in vivo*. Além disso, com um método padronizado torna-se possível realizar a comparação de resultados de estudos (Brodkorb et al., 2019).

3.5 CÉLULAS CACO-2

Cerca de 90% da absorção de nutrientes do trato gastrointestinal ocorre na região do intestino delgado, que possui de 2 a 6 m de comprimento e é dividido entre duodeno, que compreende 5% do comprimento total; jejuno, com cerca de 50% do comprimento total; e íleo, que compreende os 45% restantes. Toda a superfície do intestino delgado é recoberta por vilosidades e microvilosidades que aumentam a área de superfície e, em consequência, a área de absorção, em até 30 e 600 vezes, respectivamente (da Silva, 2016).

O intestino delgado tem como principal função a absorção de nutrientes, sendo permeável a micro e macromoléculas importantes para a nutrição humana, mas também deve ser uma barreira eficaz que impeça a passagem de macromoléculas e microrganismos com potencial nocivo, tais como toxinas e patógenos (Snoeck et al., 2005). O epitélio intestinal tem sua renovação a cada 3-4 dias, sendo composto principalmente por enterócitos (cerca de 80%), que são células epiteliais hiperpolarizadas, unidas por juncções estreitas. A superfície apical dos enterócitos é recoberta por microvilosidades que possuem grandes glicoproteínas carregadas negativamente em suas pontas, formando um glicocálice contínuo e filamento com borda em escova, que protege o epitélio da entrada de抗ígenos e patógenos (Snoeck et al., 2005). Na Figura 5 consta uma representação esquemática do intestino humano. Os recortes mostram as vilosidades e os enterócitos, bem como as membranas apical e basal que compõem o epitélio intestinal.

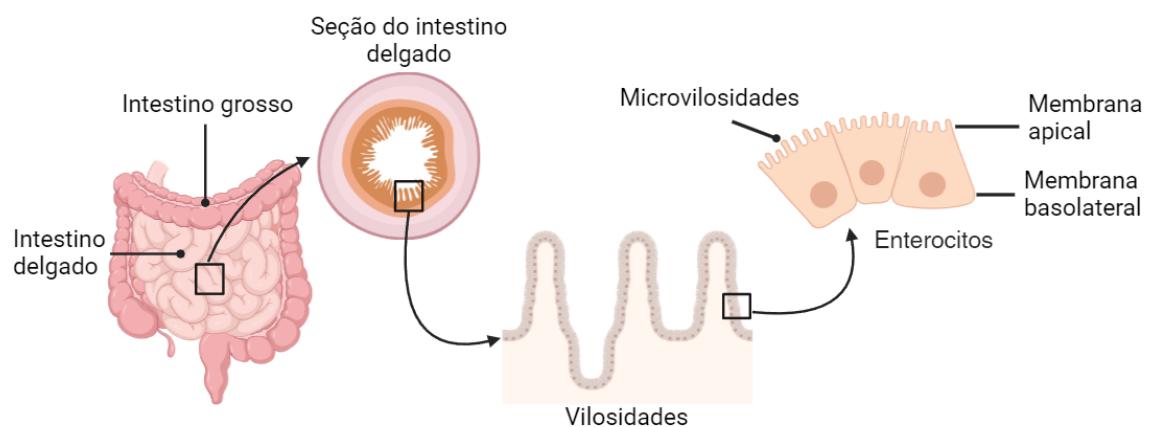


Figura 5 – Representação do intestino. Created with BioRender.com

A linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 é muito utilizada em ensaios de transporte e absorção intestinal *in vitro* (Gonçalves et al., 2024; Tan et al., 2023), devido a sua capacidade de diferenciação em uma linhagem de células epiteliais intestinais humanas. Ao serem cultivadas em inserto com membrana permeável, a superfície celular voltada para o meio superior (apical) irá simular o lúmen intestinal, enquanto a superfície celular voltada para baixo e ligada a membrana permeável, simulará a membrana basolateral (Taboada-López et al., 2021; Iftikhar et al., 2020). As células irão apresentar características de enterócitos, apresentando junções estreitas, bordas em escova, efluxo e transportadores de captação nos compartimentos apical e basal (Iftikhar et al., 2020; Amigo; Hernández-Ledesma, 2020). Na Figura 6 é mostrada uma representação esquemática de um inserto com as separações apical e basal e a monocamada celular.

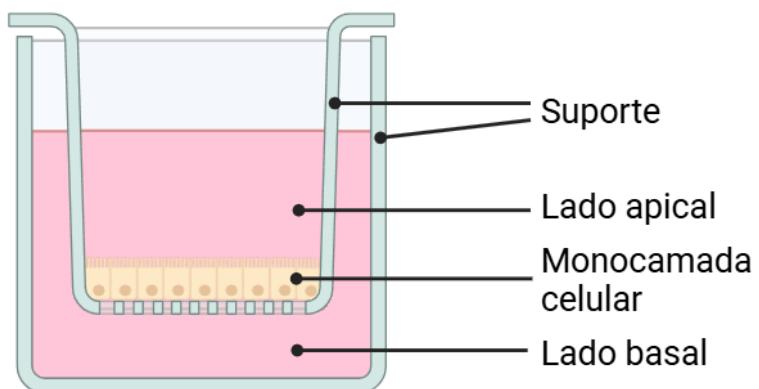


Figura 6 – Representação de um inserto com uma monocamada celular. Created with BioRender.com.

Para controlar a integridade da monocamada celular de Caco-2 e assegurar a validade do modelo, deve ser realizada a medição da resistência elétrica transepitelial (TEER). Esse ensaio consiste num método não invasivo que trata a impedância entre os tecidos basolaterais e do lúmen. O valor de TEER aceitável para monocamadas de Caco-2 está entre 200 e 1000 Ω por cm^2 (Iftikhar et al., 2020).

3.6 BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE

O termo bioacessibilidade representa a porção de um composto liberado da matriz alimentar durante a digestão, que está solúvel e potencialmente

disponível para absorção e metabolização (Santos et al., 2019; Pereira et al., 2018; De Lima et al., 2014). É frequentemente avaliada através da simulação da digestão gastrointestinal utilizando protocolos de digestão *in vitro*, e monitorada a partir de ensaios de permeabilidade em células Caco-2 (Santos et al., 2019).

A bioacessibilidade de um composto depende da eficiência da digestão física, química e enzimática do trato digestivo e pode ser influenciada por fatores inerentes a matriz alimentar, tais como a composição dessa matriz e a interação do composto de interesse com os demais constituintes dela. Adicionalmente, é influenciada por fatores associados ao hospedeiro, como as características físico-químicas dos fluídos gastrointestinais, a presença ou ausência de enzimas digestivas e o estado fisiológico do hospedeiro (Santos et al., 2019). Outros fatores, tais como o tipo de processamento dos alimentos, como por exemplo a cocção e a secagem, podem influenciar a bioacessibilidade (Li et al., 2023).

As principais metodologias utilizadas para determinar a acessibilidade de nutrientes podem ser destacadas como *in vitro* e *in vivo* (Cardoso et al., 2014). As metodologias *in vitro* referem-se a experimentos realizados fora do organismo vivo, em ambiente controlado de laboratório. Já as metodologias *in vivo*, referem-se a experimentos realizados dentro de organismos vivos como modelos animais e humanos.

Todos os nutrientes de uma matriz alimentar estão aptos a serem absorvidos pelo organismo, no entanto, após o processo de digestão, nem todos os nutrientes são estáveis e serão convertidos em formas absorvíveis (Santos et al., 2019). A fração de um alimento digerido que foi efetivamente absorvido pelo intestino e fica à disposição para ser utilizada nos processos metabólicos ou armazenada em compostos de reserva é denominada fração biodisponível (Silva Abreu, 2017).

Diferente da bioacessibilidade, a biodisponibilidade refere-se, à fração de um composto que é absorvido e metabolizado pelo organismo após a digestão, sendo utilizada nas funções fisiológicas (Kandemir et al., 2022; Pereira et al., 2018). Portanto, antes de ser biodisponível, o composto precisa ser bioacessível. A biodisponibilidade de um composto é influenciada pela digestão gastrointestinal, quando ocorre a liberação dos componentes da matriz alimentar, seguido da absorção pelas células intestinais, metabolização e distribuição para os tecidos, onde sua atividade biológica será exercida, podendo mudar devido a combinação

com macronutrientes dos alimentos *in natura*, processados ou pouco processados (como fibras, polissacarídeos e proteínas) (Santos et al., 2019).

Em geral, para análises da biodisponibilidade *in vivo*, utilizando animais ou humanos, faz-se a mensuração da porção de nutrientes digeridos, absorvidos, metabolizados e que alcançam a circulação sistêmica, avaliando-se a presença de metabólitos derivados dos compostos de interesse no sangue ou urina. Essa avaliação apresenta certa complexidade, pois fatores como o estado fisiológico, a variabilidade individual e a presença de outros componentes da refeição, podem influenciar na avaliação da concentração plasmática em ensaios *in vivo* (Santos et al., 2019).

Modelos animais implicam em restrições éticas, pois envolvem abordagens cirúrgicas e o sacrifício das cobaias, além do alto custo e longa duração (Amigo, Hernández-Ledesma, 2020). De encontro a isso, análises *in vitro* foram desenvolvidas e otimizadas a fim de superar essas limitações. Ensaios de permeabilidade em modelos de monocamadas de células caco-2, uma linhagem celular derivada de adenocarcinoma de cólon humano, tornaram-se bem aceitos e são comumente utilizados para avaliar a biodisponibilidade de compostos alimentares (Iftikhar et al., 2020; Amigo, Hernández-Ledesma, 2020).

Caetano-Silva et al. (2018) compararam a bioacessibilidade e a biodisponibilidade do ferro na forma livre como sais ($FeCl_2$ e $FeSO_4$) e complexos de ferro com peptídeos de soro de leite obtidas por ultrafiltração. Os autores avaliaram a bioacessibilidade do ferro por digestão gastrointestinal *in vitro* e a biodisponibilidade como síntese da ferritina em modelo de células Caco-2. Todos os complexos apresentaram alta bioacessibilidade (>85%), mas apenas aqueles formados por peptídeos de baixo peso molecular (<5 kDa) e $FeCl_2$ aumentaram a captação de ferro em 70% em relação ao $FeSO_4$. A síntese de ferritina em células Caco-2 indicou maior absorção de ferro dos complexos de peptídeos em comparação com o ferro livre, sendo promissores na substituição de sais de ferro utilizados na fortificação de alimentos.

Ensaios de permeabilidade também podem ser utilizados para avaliar a absorção de poluentes. Taboada-López et al., (2021), investigaram a presença de nanopartículas de dióxido de titânio e nanopartículas de prata em frutos do mar. As amostras foram digeridas conforme protocolos de digestão simulada e a fração

bioacessível obtida após a digestão foi submetida ao ensaio de absorção através do transporte por monocamadas de células Caco-2 em inserto com membrana permeável. Os resultados indicaram que nanopartículas de dióxido de titânio apresentaram uma alta porcentagem de bioacessibilidade (2,1% a 89%) e alto percentual em termos de transporte, ou biodisponibilidade (17% a 82%). As nanopartículas de prata presentes nos frutos do mar apresentaram de 13% a 17% de bioacessibilidade e uma variação de 2,1% a 22% de biodisponibilidade. Esse resultado indica que a absorção de prata é muito baixa, mas que o titânio pode atravessar a barreira intestinal.

Trigo et al., (2021), avaliou a influência do processamento por mudança de pH na digestibilidade *in vitro*, acessibilidade e biodisponibilidade em células Caco-2 de proteínas de alga marinha *U. fenestrata*. A mudança de pH concentrou a proteína 3,5 vezes, melhorando também o grau de hidrólise da proteína. A acessibilidade de aminoácidos melhorou de 56,9% para 72,7%, o que aumentou a quantidade da maioria dos aminoácidos transportados através das monocamadas de células Caco-2, indicando que o processamento melhorou a digestibilidade da proteína de alga marinha.

Os ensaios de bioacessibilidade e biodisponibilidade *in vitro* têm se mostrado úteis para simular a absorção de compostos, auxiliando no entendimento dos riscos associados à presença de nanopartículas na cadeia alimentar (Taboada-López et al., 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para seleção das matrizes de estudo foi elaborado e aplicado um questionário, realizado em parceria com o Centro Integrado de Pesquisas Oncohepatológicas na Infância (CIPOI) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As demais análises foram realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) no Centro de Ciência e Qualidade dos Alimentos (CCQA) nos laboratórios de Bioquímica de Alimentos e de Biotecnologia e Cultura Celular.

4.1 ETAPAS DE EXECUÇÃO

O estudo foi dividido em três etapas. A primeira etapa constituiu na seleção e aquisição das matrizes, seguido do seu processamento e caracterização por meio de análises de composição centesimal e perfil de aminoácidos. Na segunda etapa foi realizada a digestão simulada utilizando o protocolo INFOGEST para obtenção da fração bioacessível. E por fim, na terceira etapa foi avaliada a biodisponibilidade dos digeridos através de ensaios com células Caco-2 cultivadas em inserts semipermeáveis, nos quais as células se proliferam e se diferenciam em células epiteliais humanas. Cada uma das etapas realizadas pode ser visualizada na Figura 7.

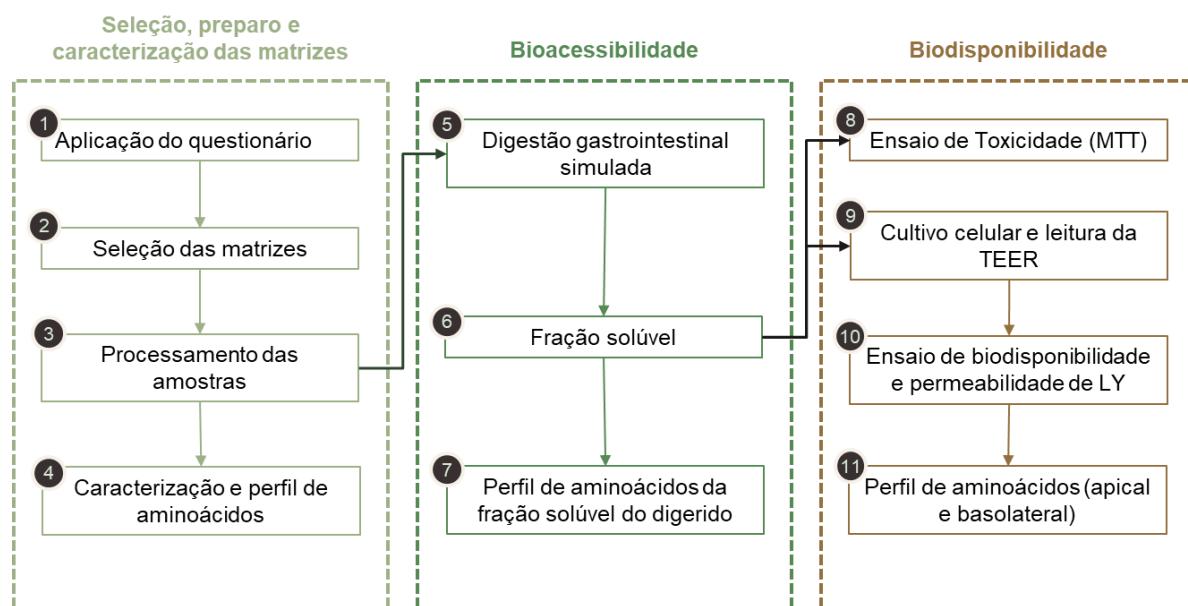


Figura 7 – Fluxograma com as etapas realizadas no presente estudo.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

4.2.1 Matrizes estudadas

As matrizes alimentares estudadas foram a batata cultivar Asterix, a batata palito pré-frita congelada, o arroz branco e o arroz integral. Esses alimentos foram adquiridos em supermercados da cidade de Campinas – SP em novembro de 2023.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Seleção das matrizes alimentares

As matrizes estudadas foram selecionadas a partir de um estudo com pacientes PKU e profissionais de saúde ligados a dieta desses pacientes através de um questionário composto por questões discursivas e objetivas, conforme anexo 8.1. Foram convidados a participar do estudo pacientes acima de 18 anos que seguiam uma dieta restrita e especial para tratamento de fenilcetonúria; pais ou responsáveis pela dieta de pacientes portadores de fenilcetonúria menores de 18 anos (menores de idade não foram incluídos no estudo); e profissionais nutricionistas que atendam esses pacientes. A condução desse estudo ocorreu em parceria com o Centro Integrado de Pesquisas Oncohepatológicas na Infância (CIPOI) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Plataforma Brasil, conforme CAAE nº 67002822.3.3001.5404, e todos os participantes concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que se encontra no anexo 8.2.

O questionário foi disponibilizado por meio da ferramenta de formulários do Google® e a solicitação de participação, bem como o link para o questionário, foram enviados via e-mail e aplicativo de mensagem institucionais, meios já utilizados para comunicação do CIPOI com os pacientes. A primeira parte do formulário destinou-se a apresentação do TCLE, que continha as informações da pesquisa, os objetivos do estudo, a descrição dos riscos da participação, a importância do estudo e a garantia de confidencialidade, bem como da não obrigatoriedade de participação, incluindo todos os aspectos éticos da pesquisa. A segunda parte incluiu perguntas discursivas e objetivas sobre a dieta dos pacientes, e só teve acesso a segunda etapa, as pessoas que leram e aceitaram o termo de consentimento.

O primeiro contato ocorreu no dia 10 de agosto de 2023, e foram realizados mais três contatos subsequentes nos dias 17 e 31 de agosto, e 11 de setembro. O questionário foi encerrado no dia 15 de setembro de 2023 com um total de 66 respostas, das quais 63 participantes aceitaram o TCLE e apenas três participantes não concordaram com o TCLE, sendo descontinuada as suas participações.

Foram sugeridos 16 alimentos, dos quais se destacaram o arroz (23 sugestões) e a batata (19 sugestões), sendo esses os alimentos selecionados para dar prosseguimento ao presente trabalho, conforme será discutido no item 5.1.

4.3.2 Processamento das matrizes alimentares

As matrizes alimentares foram preparadas de acordo com a sua forma usual de consumo, conforme apresentado no fluxograma da Figura 8.

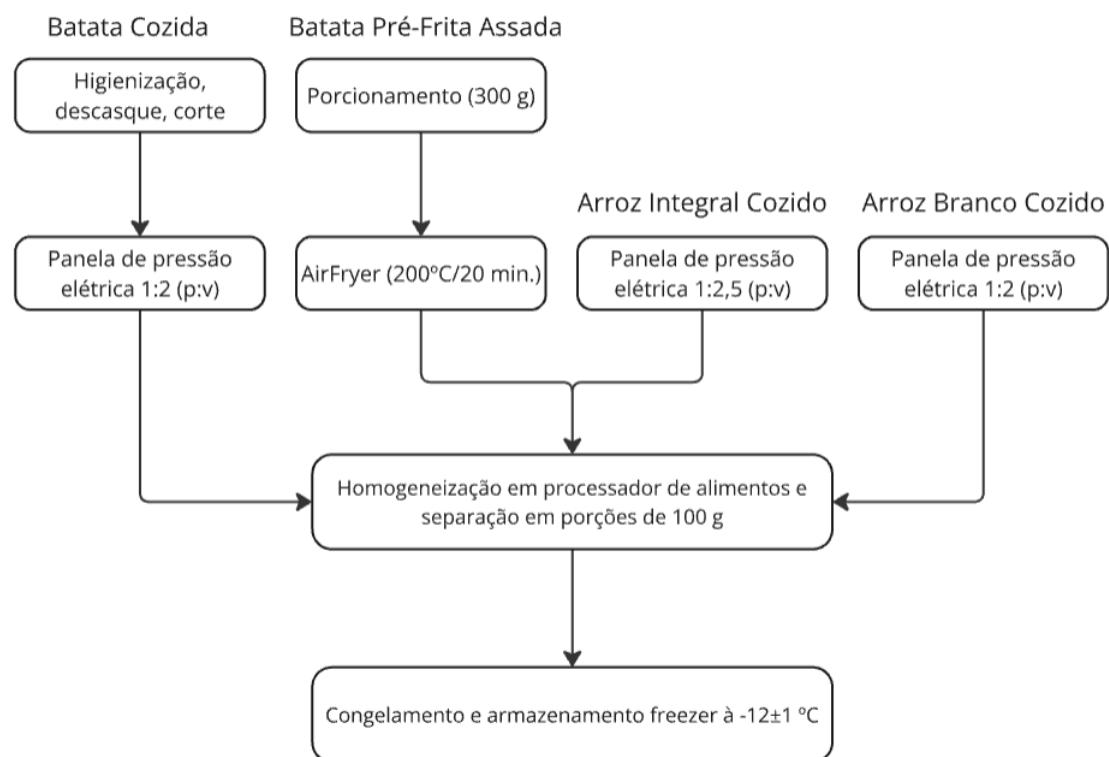


Figura 8 - Fluxograma com os métodos de preparo das matrizes: batata cozida, batata pré-frita assada, arroz integral e arroz branco.

As batatas Asterix foram higienizadas com água e sabão neutro. Em seguida, foram descascadas e cortadas em cubos com o auxílio de uma faca. Após, foram cozidas em panela de pressão elétrica (Agratto, Ventisol Ind. e Com. S.A., Santa Catarina, Brasil) por 10 minutos em água destilada na proporção de 1:2 (p/v), simulando o preparo usual desse alimento. A água do cozimento foi descartada.

As batatas pré-fritas congeladas foram preparadas de acordo com a indicação do fabricante presente na embalagem original do produto (300 g de

produto, a 200°C por 20 minutos) em forno por convecção AirFryer (PraticFryer, Cadence, JCS Brasil Eletrodomésticos Ltda., Santa Catarina, Brasil).

O arroz branco e arroz integral foram cozidos em água destilada de acordo com as indicações do fabricante descritas na embalagem do produto (1:2, p/v, por 15 minutos para o arroz branco e 1:2,5, p/v, por 20 minutos para o arroz integral) em panela de pressão elétrica (Agratto, Ventisol Ind. e Com. S.A., Santa Catarina, Brasil).

Após o processamento e resfriamento a temperatura ambiente, todas as amostras foram trituradas em processador de alimentos (Philips Walita, Philips Domestic Appliances Holding B.V., Holanda), fracionadas e armazenadas em sacos de polietileno sob congelamento em freezer à -12 ± 1 °C até o momento das análises.

4.3.3 Composição centesimal

A composição centesimal das amostras processadas foi realizada de acordo com métodos recomendados pela AOAC (Latimer, 2012), sendo: umidade (n. 925,45b) por secagem em estufa a 105 °C por 12 h, cinzas (n. 923,03) por incineração em mufla a 550 °C por 12 h e proteína pelo método Kjeldahl (n. 960,52) com fator de correção de 5,75 para as amostras de batata e 5,95 para as amostras de arroz. As amostras também foram avaliadas quanto a composição de fibras solúveis e insolúveis pelo método enzimático-gravimétrico (n. 991.43) (Latimer, 2012) e lipídeos por hidrólise ácida e extrator de Butt (Zenebron, Pascuet e Tigela, 2008). Os carboidratos foram calculados por diferença.

4.3.4 Perfil de aminoácidos

Para a análise de aminoácidos totais as amostras processadas foram submetidas a uma hidrólise ácida (HCl 6M; 110 °C; 22 horas) e, posteriormente, foram filtradas em filtro PTFE 45 µm. Após a hidrólise, as amostras passaram por uma derivatização pré-coluna, seguida de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com coluna em fase reversa (LUNA C18, 100 A 5 µm, 4.6 mm x 250 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) e detector UV a 254 nm (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os

aminoácidos foram quantificados por comparação utilizando uma curva padrão construída com padrões da Thermo Scientific (Rockford, Illinois, EUA) e o DL-2-aminobutyric acid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) foi utilizado como padrão interno.

4.3.5 Digestão gastrointestinal *in vitro* e bioacessibilidade

A análise de digestão gastrointestinal *in vitro* foi realizada de acordo com o protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019), cujo modelo contempla as três fases da digestão humana: oral, gástrica e intestinal. A etapa preliminar foi destinada aos ensaios de verificação das atividades enzimáticas, a preparação dos fluídos utilizados nas três fases da digestão e a realização de ajustes nos equipamentos a serem utilizados, garantindo o perfeito funcionamento durante a análise. As atividades enzimáticas foram testadas de acordo com o material suplementar incluído no protocolo.

A segunda etapa da análise incluiu os ensaios da digestão simulada, onde o mesmo protocolo foi utilizado para todas as amostras. Para a fase oral, as amostras foram misturadas com o fluído salivar simulado (SSF) na proporção 1:1 (p/v), foram adicionados também CaCl_2 0,3 M e 0,5 mL de α -amilase salivar humana (75 U/mL). A mistura foi incubada em banho termostático a 37 °C por 2 minutos sob agitação. Para a fase gástrica as amostras foram misturadas, na proporção de 1:1 (v/v) com fluído gástrico simulado (GSF) e CaCl_2 0,3 M. Na sequência, o pH foi ajustado para 3,0 utilizando HCl 6 M e a enzima pepsina (2000 U/mL) foi adicionada. A mistura foi para um banho termostático a 37 °C sob agitação por 120 minutos.

Para a fase intestinal, o quimo gástrico foi misturado com o fluído intestinal simulado (ISF) na proporção de 1:1 (v/v) e com CaCl_2 0,3 M. O pH foi ajustado para 7 com NaOH 6 M. Na sequência foi adicionada a enzima Pancreatina (100 U/mL) e incubada em banho termostático a 37 °C sob agitação por 120 minutos. Para interromper a reação, o digerido foi aquecido a 85 °C por 10 minutos, seguido de um resfriamento em banho gelado. O material digerido foi centrifugado (Hermle Z 366 K Benchmark, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemanha) por 20 minutos a 7000 g e 4 °C. Um esquema da digestão pode ser visto na Figura 9.

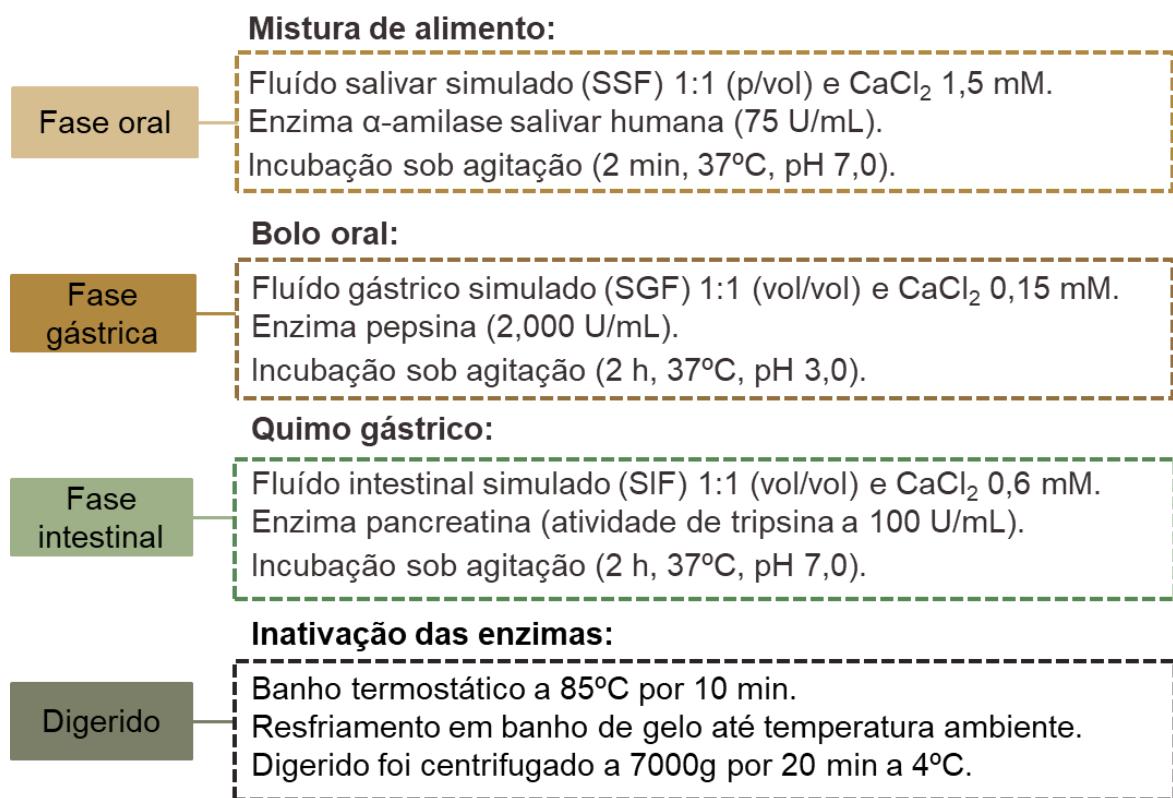


Figura 9 – Esquema da digestão simulada.

As frações solúveis e insolúveis foram separadas, e a fração solúvel foi filtrada em membrana PTFE 0,45 μm e congelada. A amostra de batata pré-frita assada foi desengordurada antes da digestão para eliminar o óleo da fritura e manter o padrão de digestão em todas as amostras. Uma amostra controle foi incluída, contendo todos os fluidos e enzimas do protocolo, mas com maltodextrina substituindo a amostra, conforme indicado no protocolo INFOGEST. A acessibilidade foi determinada pela Equação 1.

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \frac{\text{Phe na fração solúvel}}{\text{Phe antes da digestão} + \text{Phe dos compostos digestivos}} \times 100 \quad (1)$$

Os compostos digestivos se referem aos fluidos salivar, gástrico e intestinal, as enzimas digestivas e ao cloreto de cálcio, adicionados durante as etapas da digestão.

4.3.6 Cultura de células Caco-2

Células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) foram adquiridas do Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, BR) e cultivadas em garrafa de

75 cm² (Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA), utilizando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Waltham, MA, USA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR), 23,8 mM de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA), 1% de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA), L-glutamina (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR), 1% de aminoácidos não essenciais (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) e 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA). As células foram incubadas em estufa (SANYO MCO – 18AC CO₂ Incubator, SANYO Electric Co., Ltd., Japão) com atmosfera modificada com 5% de CO₂ e controle de umidade a 37°C e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

As células foram cultivadas até atingirem a confluência de 80%, então foram destacadas utilizando 0,25% (v/v) de tripsina-EDTA. Para a análise de viabilidade celular, as células foram semeadas em microplaca preta de 96 poços com densidade de 2 x 10⁴ células/poço. Para o ensaio de biodisponibilidade, as células foram semeadas em placas de 6 poços com insertos semipermeáveis (ThinCertTM, Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA) com densidade de 1x10⁵ células por poço.

4.3.7 Avaliação da viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pela função mitocondrial de células viáveis ao reduzir o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em compostos cristalinos de coloração azul ou roxa denominado Formazan. As células foram cultivadas em placa de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de cada amostra (1:2; 1:50; 1:100; 1:500 e 1:1000) e 30 minutos antes do término da análise, o MTT 0,05 mg/mL) foi adicionado aos poços do tratamento. Após esse período, o meio foi aspirado e completamente substituído por dimetilsufóxido (DMSO) e a placa foi agitada para a dissolução dos cristais. A absorbância foi lida em leitor de microplaca (GloMax® Explorer, Promega, WI, USA) simultaneamente nos comprimentos de onda 560 nm e 650 nm. A redução do MTT foi calculada (abs 560 nm – abs 650 nm) e expressa como a porcentagem do controle.

4.3.8 Resistência elétrica transepitelial (TEER)

A medida da TEER foi realizada com a finalidade de avaliar a viabilidade e integridade da monocamada de células. Utilizando um voltímetro Millicel ERS-2 (EMD Millipore Corporation, MA, USA), equipado com eletrodos (MERSSTX01 Electrode, EMD Millipore Corporation, MA, USA), foi medida a resistência de uma corrente elétrica entre os eletrodos. As medições foram obtidas ao inserir o eletrodo com a haste mais alongada na câmara basolateral e a haste menos alongada na câmara apical, em um ângulo de 90º, tomando cuidado para não entrar em contato com a monocamada de células. Em cada poço as medidas foram realizadas em triplicata, após a estabilização do equipamento, em dias alternados. As medidas, assim como toda a manipulação das células ocorreram em capela de biossegurança para manter a esterilidade. A Figura 10 apresenta uma ilustração de como é realizada a leitura da TEER.

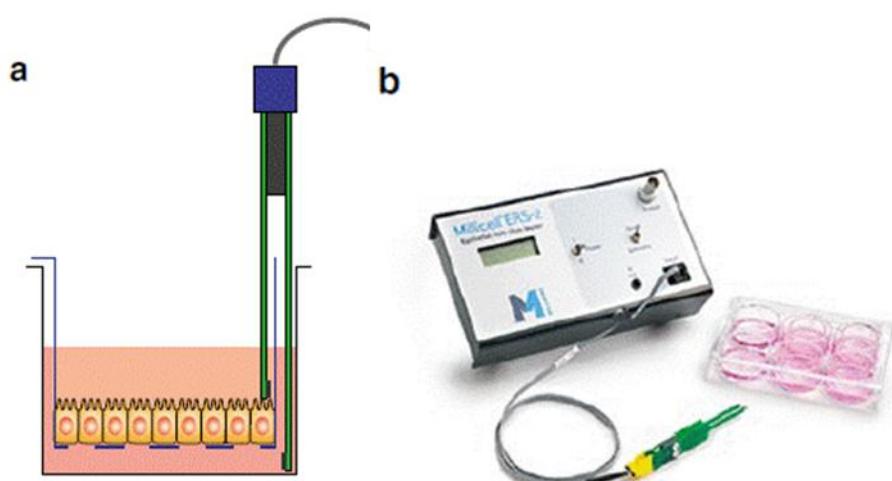


Figura 10 - Medida da resistência elétrica transepitelial em monocamada de Caco-2. a) Ilustração da leitura da TEER; b) Voltímetro e eletrodo. Fonte: https://ebrary.net/24329/health/the_impact_of_food_bioactives_on_health.

Um inserto sem células, contendo somente o meio de cultura, foi incluído no estudo para avaliar a contribuição da membrana na resistência. As medidas também foram realizadas em triplicata e o meio foi trocado a cada dois dias. O valor

obtido foi subtraído das medições de TEER dos insertos com monocamadas. Os valores de TEER foram mensurados através da Equação 2.

$$TEER (\Omega \times cm^2) = (R_{monocamada} - R_{branco}) \times A \quad (2)$$

Em que $R_{monocamada}$ é a resistência da monocamada celular aderida a membrana semipermeável do inserto, R_{branco} é a resistência da membrana semipermeável sem as células e A é a área da superfície da membrana ($4,2 \text{ cm}^2$).

4.3.9 Ensaio da biodisponibilidade

Para a análise de biodisponibilidade foram utilizadas células Caco-2 intestinais humana de acordo a metodologia descrita em Liang, Kim e Dallas (2022) com modificações. Células Caco-2 (passagem 42) foram semeadas em insertos de membrana semipermeáveis de $0,4 \mu\text{m}$ em placas com 6 poços na densidade de 1×10^5 e cultivadas em meio de cultura por 23 dias, até a confluência e diferenciação. Antes do experimento, as células foram lavadas duas vezes aspirando o meio e substituindo por HBSS. Após, o HBSS foi novamente substituído e os insertos foram incubadas por 15 minutos em estufa (SANYO MCO – 18AC CO₂ Incubator, SANYO Electric Co., Ltd., Japão) com atmosfera modificada com 5% de CO₂ e controle de umidade a 37°C.

Ao início da análise, a amostra, diluída 1:100 em HBSS foi adicionada no lado apical e o HBSS do lado basal foi trocado, em seguida, a placa foi incubada por 2 h. Após esse período, as soluções apical e basal foram coletadas e armazenadas a $-12 \pm 1^\circ\text{C}$ até a análise posterior. A biodisponibilidade foi determinada por meio da Equação 3.

$$Biodisponibilidade (\%) = \frac{PHE_{lado basal \text{ após incubação celular}}}{PHE_{lado apical \text{ antes da incubação celular}}} \times 100 \quad (3)$$

4.3.10 Ensaios de permeabilidade do corante Lucifer Yellow

Para a avaliar a permeabilidade do corante Lucifer Yellow (LY) após o ensaio de biodisponibilidade foi utilizada a metodologia descrita por Hwang, Lee, Kim (2020). Após a análise de biodisponibilidade, as células foram lavadas três vezes com HBSS. O HBSS foi aspirado e substituído por 1,5 mL de Lucifer Yellow 100 µg/mL no compartimento apical de cada um dos poços de estudo e 2,5 mL de HBSS foi adicionado no compartimento basolateral. A placa foi incubada em estufa (SANYO MCO – 18AC CO₂ Incubator, SANYO Electric Co., Ltd., Japão) com atmosfera modificada com 5% de CO₂ por 1 h a 37 °C com papel alumínio para proteção contra a luz. Alíquotas de 150 µL foram coletadas dos compartimentos apical e basolateral e foram adicionadas em microplaca preta de 96 poços. A fluorescência foi lida usando um leitor de microplacas nos comprimentos de onda de excitação de 485 nm e emissão de 535 nm. A porcentagem da passagem do LY através da monocamada foi calculada pela Equação 4.

$$\text{Permeabilidade (\%)} = \frac{(\text{Amostra} - \text{Branco})}{(\text{Lucifer Yellow} - \text{Branco})} \times 100 \quad (4)$$

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e duplicata e os resultados apresentados são as médias dos resultados de cada análise, com os respectivos desvios padrão. As diferenças entre as médias dos resultados foram avaliadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), aplicando-se o Teste de Tukey, nível de confiança de 95%, com o auxílio do software Statistica® 14.1.0 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DAS MATRIZES ALIMENTARES: PESQUISA DE ADESÃO E DIFICULDADES AO TRATAMENTO

As matrizes alimentares analisadas foram selecionadas por meio de um questionário semiaberto, aplicado a três grupos: 1) pacientes com fenilcetonúria

maiores de 18 anos, 2) responsáveis por pacientes com fenilcetonúria menores de 18 anos e 3) profissionais de saúde que acompanham esses pacientes. Ao todo, foram obtidas 66 respostas. Contudo, três foram excluídas, pois os participantes não aceitaram prosseguir com a pesquisa após lerem o termo de consentimento livre e esclarecido, necessário para a continuidade do estudo.

Das 63 participações válidas, 61,9% (39 respostas) foram de pais ou responsáveis por pacientes com fenilcetonúria, 30,2% (19 respostas) de pacientes com fenilcetonúria e 7,9% (5 respostas) de profissionais de saúde que acompanham esses pacientes, o que pode ser observado na Figura 11.

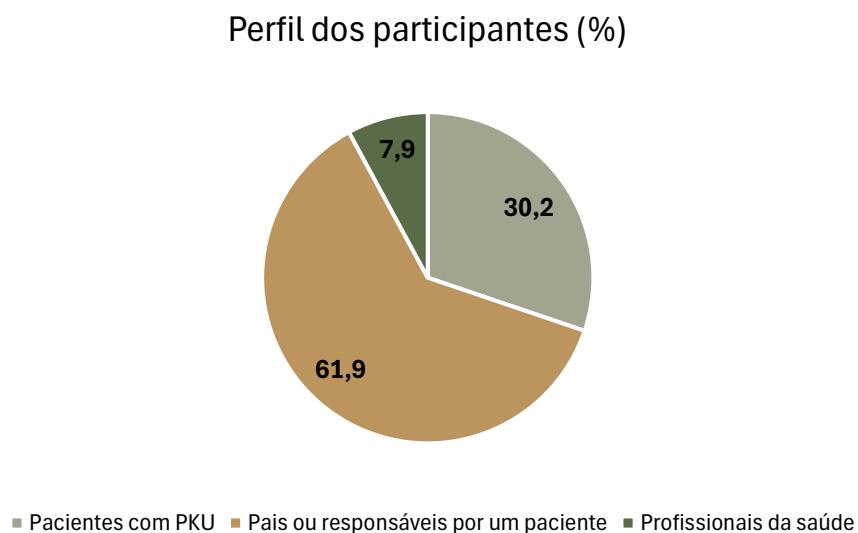


Figura 11 – Gráfico com o perfil dos participantes da pesquisa.

Visando conhecer os anseios e possíveis dificuldades para se manter a dieta, o questionário foi composto com algumas questões sobre os hábitos de pacientes que seguem a dieta restrita em proteínas naturais, com suplementação de aminoácidos livres como tratamento para a doença.

Quando questionados sobre a existência de alguma dificuldade em manter a dieta restrita, o estudo demonstrou que os principais fatores responsáveis pela dificuldade na adesão ao tratamento da doença incluem a dificuldade de encontrar alimentos hipoproteicos fora de casa (restaurantes, escolas etc.), o alto custo no valor desses alimentos e a vontade de consumir alimentos proteicos não permitidos na dieta. Também, foram elencados o gosto ruim da fórmula de aminoácidos livres

e as poucas opções de grupos de alimentos que podem ser consumidos, como pode ser observado na Figura 12. Esses resultados mostram que existe um gargalo no que se refere a dieta relacionada ao tratamento, uma vez que os alimentos permitidos são em quantidades restritas.



Figura 12 - Desafios apontados pelos participantes da adesão ao tratamento da fenilcetonúria.

A Figura 13 apresenta os principais alimentos mencionados pelos pacientes, citados ao menos uma vez. Quando questionados sobre os alimentos liberados na dieta, dos quais esses pacientes gostariam de se alimentar em maior quantidade, o arroz e a batata, incluindo a batata frita, foram os mais apontados. Outros alimentos como pão, macarrão, banana e mandioca, também foram citados em quantidades razoáveis.

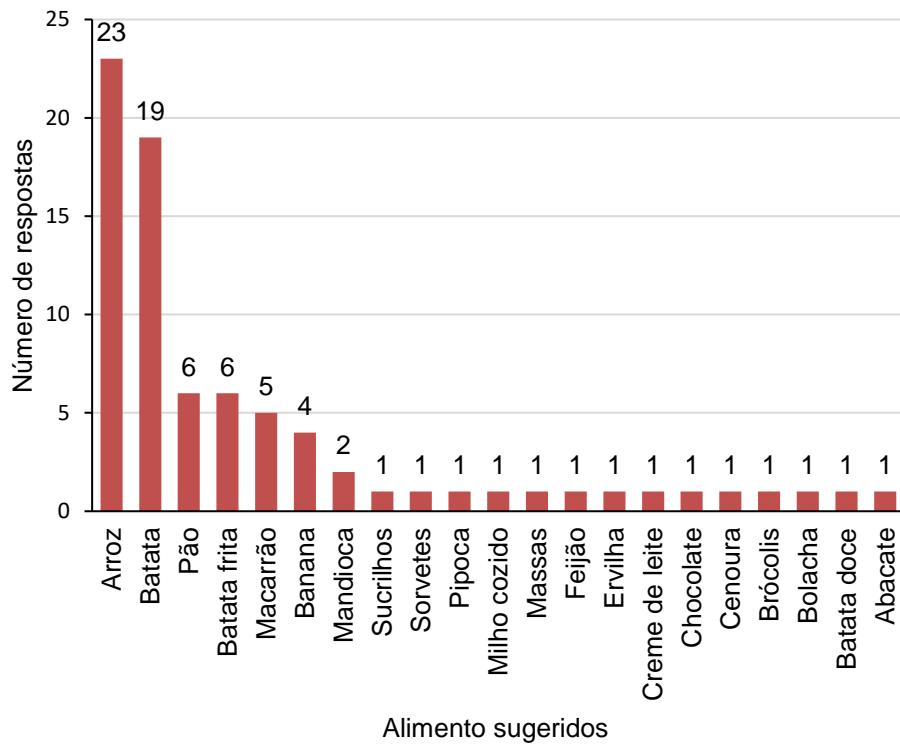


Figura 13 – Alimentos em ordem decrescente de citação no questionário.

Esses resultados sugerem a importância da realização de estudos sobre a biodisponibilidade do aminoácido fenilalanina, para trazer informações que auxiliem na regulação alimentar. Esse conhecimento, poderia ajudar e entender as faixas de liberação e absorção desse aminoácido em função dos outros componentes da matriz alimentar. Sabe-se que alguns componentes, como as fibras alimentares, podem interferir na digestão das proteínas (Zhu, 2020; Amarowicz, Korczakowska, Smoczyńska 1988), o que permitiria um possível aumento no consumo de alimentos que são, até então, apenas parcialmente liberados. Pela Figura 10, é possível verificar que a batata e o arroz consistiram na preferência de maior quantidade de consumo pelos entrevistados. Sendo assim, essas matrizes foram selecionadas para dar prosseguimento aos estudos de biodisponibilidade.

5.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS MATRIZES ALIMENTARES SELECIONADAS E PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Com a finalidade de ampliar o escopo do estudo as matrizes de arroz consistiram em arroz cozido branco e integral e a batata nos formatos cozida e pré-frita assada, conforme o consumo. A composição centesimal do arroz branco

cozido, arroz integral cozido, batata cozida e batata pré-frita assada consta na Tabela 3. Os valores médios foram expressos em g/100 g de amostra em base úmida para permitir comparação com os dados da literatura.

Tabela 3 – Composição centesimal das amostras de arroz cozido e batatas processadas, expressos em g/100g de amostra em base úmida.

Componentes (%)	Arroz branco	Arroz integral	Batata cozida	Batata pré-frita assada
Umidade	67,32 ± 0,02	72,72 ± 0,27	81,98 ± 0,08	48,21 ± 0,47
Lipídeos	0,32 ± 0,01	0,96 ± 0,11	0,07 ± 0,01	8,43 ± 0,15
Cinzas	0,16 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,64 ± 0,02	1,85 ± 0,04
Proteínas	3,19 ± 0,03	2,46 ± 0,09	2,00 ± 0,05	4,66 ± 0,06
Carboidratos totais*	29,01	23,48	15,31	36,85
Fibras	1,79 ± 0,04	2,12 ± 0,01	1,83 ± 0,05	7,10 ± 0,20

Os valores são as médias ± desvios padrão. *Calculado por diferença: 100 – (g/100 g umidade + g/100g lipídeos + g/100g cinzas + g/100g proteínas).

A principal fonte de energia de alimentos à base de amido como o arroz e a batata são os carboidratos. O arroz branco cozido apresentou 29,01 g/100 g de carboidrato, enquanto o arroz integral cozido apresentou 23,48 g/100 g. Já a batata pré-frita assada apresentou 36,85 g/100 g de carboidratos em sua composição, e a batata cozida 15,31 g/100 g.

O arroz é um cereal composto basicamente por carboidratos na forma de amido, e pequenas quantidades de proteínas, lipídeos, fibras, vitaminas e minerais. Sua composição varia de acordo com o ambiente, o manejo, a variedade, o processamento e o armazenamento, produzindo grãos com qualidade nutricional variada (Walter, Marchezan, Avila, 2008).

A diferença entre o teor de carboidratos do arroz branco para o arroz integral pode ocorrer devido aos processos aos quais o arroz é submetido antes de chegar ao consumidor, como polimento e retirada da casca. Como os nutrientes do arroz não são uniformemente distribuídos nas diferentes frações dos grãos, maiores concentrações de proteínas, lipídeos, fibras, minerais e vitaminas, estão localizadas nas frações mais externas do grão, enquanto os carboidratos ficam retidos em seu interior (Walter, Marchezan, Avila, 2008). Devido a essa característica de distribuição nutricional, processos como o polimento do arroz,

implica na redução do teor de nutrientes ao remover as camadas mais externas, enquanto não se altera as quantidades de amido (Storck, Silva, Comarella, 2005; Walter, Marchezan, Avila, 2008).

Os valores de carboidratos encontrados na Tabela 2 (29,01 g/100g para o arroz branco e 23,48 g/100g para o arroz integral) corroboram com os valores típicos para esse alimento, que variam entre 28 e 29 g/100g para o arroz branco e 23 e 26 g/100g para o arroz integral (TACO, 2024; TBCA, 2024; USDA, 2024).

A batata é um tubérculo de origem andina muito cultivado e consumido em todo mundo devido sua versatilidade e composição nutricional. É constituída predominantemente por carboidratos, principalmente na forma de amido. Os teores dos macro e micronutrientes da batata variam de acordo com a cultivar, o solo, o clima, entre outros fatores que influenciam em sua composição (Raigond et al., 2020; Robertson et al., 2018).

Com relação as concentrações de carboidratos nas amostras estudadas, foi encontrado maior teor na batata pré-frita assada 36,85 g/100g em comparação com a batata cozida 15,31 g/100g. Essa constatação pode ser explicada pelo tipo de processamento empregado, pois o processo de fritura, promove a concentração dos carboidratos ao reduzir o teor de umidade, enquanto durante o cozimento a matriz absorve água, diluindo os demais compostos. Esses valores corroboram com os valores típicos para esse alimento, que variam entre 32 e 36 g/100g de carboidratos para a batata frita e 11 e 20 g/100g para a batata cozida (TACO, 2024⁵; TBCA, 2024⁶; USDA, 2024⁷).

A batata pré-frita assada apresentou o maior teor de fibras (7,10g/100g), provavelmente ocasionado pelo processo de fritura, que ao reduzir o teor de água promove o aumento da matéria seca do produto. Valor semelhante pode ser encontrado na tabela TACO (8,10 g/100g). No entanto, há uma divergência nos valores disponibilizados nas tabelas TBCA e USDA (3,16 e 3,20 respectivamente), que pode estar ligado a variedade da batata utilizada nas análises. Os teores de

⁵ Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Disponível em: <https://www.tabelatacoonline.com.br/>. Acesso em: novembro de 2024.

⁶ Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA. Disponível em: https://www.tbca.net.br/base-dados/composicao_alimentos.php. Acesso em novembro de 2024.

⁷ United State Department of Agriculture – USDA. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/>. Acesso em: novembro de 2024.

fibras das amostras de arroz, são semelhantes aos encontrados na literatura. As tabelas de composição nutricional descrevem valores para o arroz integral e branco de 2,14 e 1,28 (TBCA), 2,7 e 1,6 (TACO), respectivamente.

Com relação a proteína, a batata pré-frita assada apresentou o maior teor entre as amostras (4,66 g/100g), provavelmente devido ao processamento em que a amostra pré-frita congelada foi assada em forno por convecção que altera a composição proporcional dos nutrientes. Entre as amostras de arroz, o arroz branco apresenta um aumento discreto com relação ao arroz integral (3,19 e 2,46 g/100g respectivamente), isso se deve, provavelmente, a redução das fibras e gorduras presentes nas camadas mais externas dos grãos, o que aumenta a proporção relativa de proteína no grão polido.

A Tabela 4 apresenta uma comparação entre os valores da composição centesimal das amostras analisadas, com os valores encontrados na literatura nas tabelas de composição nutricional TBCA, TACO e USDA. Na última coluna da tabela, é possível observar o valor absoluto da diferença entre os valores experimentais e a média dos valores de referência. Nesta coluna, quanto mais próximo de zero, mais semelhante serão os valores comparados. Nota-se que alguns componentes, em determinadas amostras, apresentaram uma acentuada diferença em relação aos dados da literatura, como por exemplo os lipídeos e carboidratos da amostra de batata pré-frita assada, com uma diferença de 2,64 e 2,75, respectivamente. Uma constatação realizada é que essas diferenças apresentam um erro externo associado, onde os dados da literatura destoam muito entre si, e consequentemente dos dados experimentais. Outro fator de impacto está relacionado com a existência de distintos fatores que influenciam na composição centesimal de um alimento, tais como o período em que foi plantado, o tipo de solo, a variedade do alimento, o armazenamento pós-colheita, o preparo da amostra, entre outros. Vale ressaltar que os valores encontrados experimentalmente, mesmo com alguma diferença entre um ou outro dado obtidos na literatura, ainda se encontra dentro de uma faixa dos valores que foram encontrados nessas tabelas.

Tabela 4 – Composição centesimal das amostras do estudo comparadas aos valores encontrados na literatura em base úmida.

	Composição (g/100g)	Dados experimentais	TBCA	TACO	USDA	Diferença*
Batata pré-frita assada	Umidade	48,21 ± 0,47	49,00	44,10	52,90	0,46
	Lipídeos	8,43 ± 0,15	11,90	13,10	8,20	2,64
	Cinzas	1,85 ± 0,04	2,34	2,20	1,43	0,14
	Proteínas	4,66 ± 0,06	4,04	5,00	3,44	0,50
	Carboidratos	36,85	32,70	35,60	34,00	2,75
	Fibras	7,1 ± 0,20	3,16	8,10	3,20	2,28
Batata cozida	Umidade	81,98 ± 0,08	85,50	86,4	77,5	1,15
	Lipídeos	0,07 ± 0,01	0,05	Tr	0,1	0,01
	Cinzas	0,64 ± 0,02	0,92	0,5	0,72	0,07
	Proteínas	2,00 ± 0,05	1,33	1,2	1,71	0,59
	Carboidratos	15,31	12,20	11,9	20	0,61
	Fibras	1,83 ± 0,05	1,47	1,3	1,8	0,31
Arroz branco cozido	Umidade	67,32 ± 0,02	66,40	69,1	67,87	0,47
	Lipídeos	0,32 ± 0,01	1,60	0,2	0,37	0,40
	Cinzas	0,16 ± 0,00	0,33	0,1	ND	0,06
	Proteínas	3,19 ± 0,03	2,41	2,5	2,54	0,71
	Carboidratos	29,01	29,30	28,1	28,98	0,22
	Fibras	1,79 ± 0,04	1,28	1,6	0	0,83
Arroz integral cozido	Umidade	72,72 ± 0,27	71,7	70,1	70,03	2,11
	Lipídeos	0,96 ± 0,11	2,03	1	1,12	0,42
	Cinzas	0,38 ± 0,00	0,83	0,5	ND	0,29
	Proteínas	2,46 ± 0,09	2,46	2,6	2,45	0,04
	Carboidratos	23,48	23	25,8	25,89	1,42
	Fibras	2,12 ± 0,01	2,14	2,7	1,0	0,17

Os valores dos dados experimentais são médias ± desvios padrão, resultado em triplicata (n=3). Tr = traços; ND= Não disponível. *A última coluna representa o valor absoluto da diferença entre os dados experimentais deste trabalho e a média dos valores da literatura utilizados para fins de comparação. Carboidratos foram calculados por diferença: 100 – (g/100 g umidade + g/100g lipídeos + g/100g cinzas + g/100g proteínas).

Na Tabela 5 podemos observar o teor de aminoácidos das amostras processadas. Os principais aminoácidos presentes nas amostras de arroz branco e arroz integral foram o ácido glutâmico, a arginina, o ácido aspártico e a leucina. Desses aminoácidos, somente a leucina é indispensável, pois é obtida apenas

através da alimentação. A lisina aparece como o aminoácido limitante. Embora os perfis das amostras sejam semelhantes, é possível notar que no arroz integral a concentração dos aminoácidos é menor, o que é compatível ao que foi encontrado na composição centesimal. Como constatado, a amostra de arroz integral apresenta um menor teor de proteína do que a amostra de arroz branco, devido ao maior teor de fibras. Há uma grande variabilidade no teor de fenilalanina entre as amostras de arroz branco e arroz integral (168,24 mg/100 g e 120,98 mg/100 g, respectivamente, que será discutido com mais detalhes na seção 5.3).

Com relação ao perfil de aminoácidos das amostras de batata provenientes de diferentes métodos de processamento, é possível identificar que os principais aminoácidos presentes nas amostras são o ácido glutâmico, ácido aspártico, a arginina, a leucina e a lisina. Para essas amostras, a metionina se apresentou como o aminoácido limitante.

Como ocorre entre as amostras de arroz, também é possível observar algumas diferenças com relação a concentração de aminoácidos nas amostras de batata. Embora apresentem perfis parecidos, a amostra de batata pré-frita assada apresenta uma concentração de aminoácidos pelo menos duas vezes maior do que a concentração de aminoácidos das amostras de batata cozida. Isso se justifica ao avaliar a porcentagem de proteína das amostras, que aumenta proporcionalmente para a batata pré-frita assada (4,66 % para a batata pré-frita assada e 2,00 % para a batata cozida).

Tabela 5 – Perfil de aminoácidos das amostras processadas.

Amino ácido (AA)	AMOSTRAS (mg/ 100 g)			
	Arroz branco cozido	Arroz integral cozido	Batata cozida	Batata pré - frita assada
Essenciais				
His	57,76±0,54	46,29±0,52	30,50±2,32	70,13±7,10
Ile	113,82±0,43	84,57±0,11	62,71±0,04	155,56±0,18
Leu	231,61±0,16	172,35±0,11	111,82±0,14	278,41±0,08
Lys	101,18±1,20	80,35±0,20	100,45±1,16	239,05±5,72
Met	20,47±0,37	26,79±0,97	5,75±0,59	42,43±0,79
Phe	168,24±1,21	120,98±0,17	84,20±0,01	222,55±0,93
Thr	101,27±1,46	70,62±4,04	78,45±1,10	188,08±1,27
Trp	ND	ND	ND	ND
Val	156,55±0,24	118,77±0,30	92,35±0,54	212,86±0,28
Não essenciais				
Ala	156,30±0,08	123,85±0,04	66,71±0,25	159,68±0,98
Arg	271,09±0,29	200,36±2,03	154,45±0,04	342,85±4,26
Asp	258,17±1,97	189,57±0,46	334,47±0,82	824,69±0,55
Cys	51,65±0,43	41,16±1,24	26,96±1,10	72,14±13,43
Glu	507,93±1,36	367,13±0,55	370,53±0,71	845,33±4,07
Gly	125,81±0,62	100,32±0,83	60,64±0,15	148,15±3,13
Pro	126,99±0,64	96,34±0,67	59,46±0,26	149,41±4,69
Ser	142,76±0,86	105,14±0,37	72,27±0,09	170,00±4,20
Tyr	95,91±0,14	78,69±0,13	63,17±0,22	154,24±2,85
Distribuição				
Hidrofóbico*	973,96	743,63	482.98	1220.88
Hidrofílico	1196,12	883,69	990.40	2322.05
Neutro	517,39	395,92	301.48	732.60

Os valores dos dados experimentais são médias ± desvios padrão, resultado em duplicita (n=2). Hidrofílicos: Ala, Val, Met, Phe, Leu, Ile, Pro, Trp; Hidrofóbicos: Arg, Asp, His, Lys, Glu; Neutros: Ser, Gly, Thr, Tyr, Cys; Asp= Ácido Aspártico, Ala= Alanina, Arg= Arginina, Glu= Ácido Glutâmico, Gly= Glicina, His= Histidina, Cys= Cistina, Ile= Isoleucina, Leu= Leucina, Lys= Lisina, Met= Metionina, Phe= Fenilalanina, Pro= Prolina, Ser= Serina, Thr= Treonina, Trp= Triptofano, Tir= Tirosina; Val= Valina.

ND – não determinado.

* Faltam os valores de triptofano.

Em alimentos cujo teor proteico seja inferior a 3%, a fenilalanina representa menos de 0,1% do alimento, dificultando sua quantificação analítica (Lanfer-

Marquez et al., 1997). Há uma correlação entre o teor de proteína de diferentes categorias de alimentos e a proporção de fenilalanina, sendo possível estimar o valor desse aminoácido com precisão adequada, a partir do teor proteico, utilizando um fator de conversão de nitrogênio adequado para cada tipo de proteína (Guimarães, Lanfer-Marquez, 2002). O teor de fenilalanina presente nos diferentes tipos de matrizes alimentares varia de 4% a 6% das proteínas, dependendo da sua origem (MacDonald et al., 2011). Para alimentos vegetais, estima-se que a fenilalanina representa cerca de 3% a 5% da proteína do alimento (Guimarães, Lanfer-Marquez, 2002; Lanfer-Marquez et al., 1997), coerente com o que foi observado para as amostras processadas (arroz branco cozido 5%, arroz integral cozido 5%, batata cozida 4% e batata pré-frita assada 5%).

5.3 BIOACESSIBILIDADE DA FENILALANINA

Neste estudo a fenilalanina apresentou variações entre os diferentes alimentos e formas de preparo. Na Tabela 6 podemos observar a comparação entre o teor de proteína e fenilalanina nas amostras processadas e digeridas de arroz e batata, bem como a porcentagem de bioacessibilidade de cada amostra. Como esperado as amostras com maior conteúdo de proteína, mostram teores de fenilalanina mais elevados. De acordo com a Tabela 6, o arroz branco apresenta 168,24 mg de fenilalanina por 100g de amostra antes da digestão e 20,35 mg/100g de amostra após a digestão. Já o arroz integral apresenta 120,98 mg/100g antes da digestão e 23,61 mg/100g após a digestão. A batata cozida apresenta 84,20 mg/100g antes da digestão e 23,37 mg/100g após a digestão e a batata pré-frita assada apresenta 222,55 mg/100g antes da digestão e 24,53 mg/100g após a digestão. Esses resultados mostram que o teor de fenilalanina varia conforme o tipo de alimento e o método de preparo e que reduz significativamente após a digestão desses alimentos.

Tabela 6 – Comparação do teor de proteína e fenilalanina das amostras processadas e digeridas e porcentagem de bioacessibilidade *in vitro*.

Amostra	Amostra processada		Amostra digerida		Bioacessibilidade (%)
	Proteína (g/100g)	Phe* (mg/100 g amostra)	Proteína (g/100g)	Phe* (mg/100 g)	
Arroz branco	3,19±0,03	168,24^a ±1,21	0,90±0,00	20,35^a ±0,19	26,80±0,07
Arroz integral	2,46±0,09	120,98^b ±0,17	0,96±0,05	23,61^a ±4,66	37,09±2,97
Batata cozida	2,00±0,05	84,20^B ±0,01	0,88±0,00	23,37^A ±1,65	48,45±1,39
Batata pré – frita assada	4,66±0,06	222,55^A ±0,93	1,09±0,00	24,53^A ±0,85	22,75±0,25

*Concentração de fenilalanina em mg/100g subtraído o valor do branco da digestão. Comparação estatística entre matrizes, letras minúsculas para a matriz arroz e letras maiúsculas para a matriz batata. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

O processamento dos alimentos pode afetar a digestibilidade da proteína, influenciando sua biodisponibilidade, uma vez que altera a taxa de digestão e absorção de proteínas. Isso pode afetar a cinética de digestão e absorção dos aminoácidos que compõe a proteína (Loveday, 2023).

A diferença entre o teor de fenilalanina na batata pré-frita assada (222,55 mg/100g) em comparação à batata cozida (84,20 mg/100g) pode ser explicada pela perda de umidade durante o processamento térmico em forno por convecção e entrada de água na matriz durante o cozimento (umidade da batata cozida foi de 81,98%). O processamento térmico em altas temperaturas geralmente concentra nutrientes, como proteínas e aminoácidos, pelo fato de a água evaporar, deixando uma quantidade proporcionalmente maior de compostos sólidos.

O efeito do processo sobre a matriz também pode ser observado para as amostras de arroz em que o arroz branco apresentou um maior teor de fenilalanina (168,24 mg/100g) em comparação ao arroz integral (120,98 mg/100g) nas amostras processadas. No entanto, após a digestão, os teores de fenilalanina apresentados nas amostras de arroz, não representaram diferença estatística significativa (arroz branco 20,35 mg/100g e arroz integral 23,61 mg/100g) . Essa redução no teor de

fenilalanina nas amostras digeridas ocorreu, provavelmente, pela composição da matriz alimentar. O arroz é uma matriz que apresenta fibras alimentares em sua composição (1,79 g/100g para o arroz branco e 2,12 g/100g para o arroz integral), e a presença das fibras alimentares podem interferir na digestibilidade dos aminoácidos. As fibras alimentares podem interagir com enzimas digestivas (pepsina, tripsina e quimiotripsina), suprimindo a hidrólise enzimática de macronutrientes as proteínas (Zhu, 2020; Amarowicz, Korczakowska, Smoczyńska 1988), dificultando sua digestão e consequentemente a absorção dos aminoácidos.

A diferença nos valores de fenilalanina antes e após a digestão está diretamente relacionada com o teor de proteína que foi digerida ou hidrolisada durante o processo digestivo. Embora numa primeira avaliação tenha sido constatado diferença reduzida entre as amostras digeridas, referente ao conteúdo de fenilalanina, não ocorre diferença significativa quando comparamos as amostras de arroz entre si e as amostras de batata entre si. Os valores foram de 20,35 mg/100 g para o arroz branco, 23,61 mg/100 g para o arroz integral, 23,95 mg/100 g para a batata cozida e 24,83 mg/100 g para a batata pré-frita assada. Contudo, os valores de bioacessibilidade desse aminoácido indicam diferenças tanto entre as matrizes alimentares quanto entre as formas de processamento, sendo 26,80% para o arroz branco, 37,09% para o arroz integral, 48,45% para a batata cozida e 22,75% para a batata pré-frita assada.

Esses resultados sugerem que o processamento térmico em temperaturas elevadas influência na bioacessibilidade dos aminoácidos. Loveday (2023), afirma que o processamento térmico pode causar reações químicas nos aminoácidos que podem influenciar em sua absorção.

5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A viabilidade das células foi mensurada através do ensaio de MTT para avaliar se as amostras de arroz branco cozido, arroz integral cozido, batata cozida e batata pré-frita assada eram citotóxicas para células Caco-2 e, assim, determinar as diluições seguras para aplicação no ensaio de biodisponibilidade (1:2, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000). Este ensaio fornece informações sobre o estado metabólico das células, uma vez que somente células viáveis, ou seja, que possuam metabolismo ativo, são capazes de converter o MTT (composto de coloração

amarelo), em formazan (composto de coloração roxa), sendo a cor um marcador importante para essa determinação (Riss et al., 2004; Amigo, Hernández-Ledesma, 2020).

Conforme pode ser observado na Figura 14, nenhuma das concentrações testadas apresentou citotoxicidade para as matrizes escolhidas. Contudo, a amostra controle (branco) da digestão nas concentrações mais altas como 1:2 e 1:50 diminuiu a viabilidade celular para 80% e 85%. Uma viabilidade inferior a 50% indica atividade mitocondrial reduzida (Elendran et al., 2019) e, portanto, são considerados citotóxicos. Nenhuma das diluições utilizadas apresentaram viabilidade celular inferior a 80%, indicando que os compostos testados não são citotóxicos e são seguros para aplicação celular.

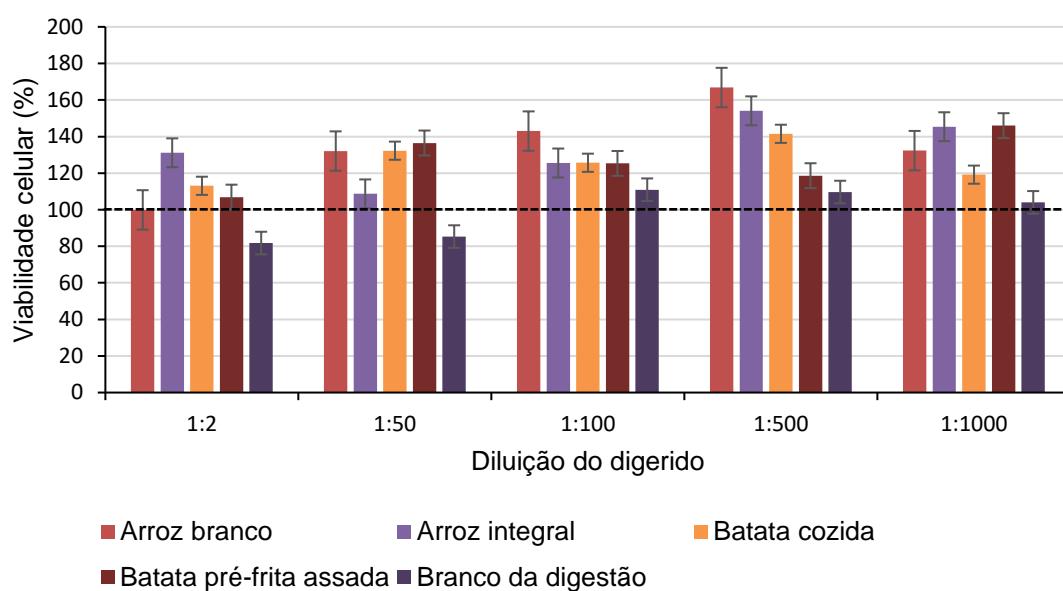


Figura 14 – Efeito das diferentes diluições das amostras na viabilidade celular em Caco-2. Os dados são expressos em média \pm DP (n=4).

A concentração 1:100 foi a maior concentração utilizada em que não houve morte celular tanto para as amostras digeridas das matrizes como para o branco da digestão que é composto basicamente por enzimas digestivas (controle). Portanto, essa diluição foi a selecionada por ser considerada segura para os ensaios de biodisponibilidade.

5.5 AVALIAÇÃO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS CACO-2

A medição da resistência elétrica transepitelial (TEER) é um método não invasivo de verificar, quantitativamente, a integridade da monocamada celular (Srinivasan et al., 2015). Medições da TEER foram empregadas para avaliar a integridade da monocamada de células Caco-2 formada acima da membrana semipermeável de cada um dos insertos. Valores acima de $300 \Omega \times \text{cm}^2$ indicam a formação de uma monocamada celular confluente que apresenta características morfológicas e funcionais de célula intestinais (Elendran et al., 2019; Tan et al., 2023).

A Figura 12 representa o gráfico de leitura da TEER que foi realizada durante 22 dias. Cada linha representa o crescimento celular em um poço. É importante ressaltar, que nessa etapa, todos os insertos continham apenas células e o meio de cultura. No entanto já estavam programados para quais amostras receberiam posteriormente. No 23º dia as amostras foram distribuídas na placa de cultivo celular, sendo: no poço 1 o digerido de arroz branco, no poço 2 o digerido de batata cozida, no poço 3 o digerido de arroz integral; e, por fim, o digerido de batata pré-frita assada foi adicionado ao inserto do poço 4.

Através Figura 15, verifica-se que a partir do 17º dia de cultivo, todos os poços apresentaram $\text{TEER} > 300 \Omega \times \text{cm}^2$, permanecendo dentro do intervalo de 399 e $634 \Omega \times \text{cm}^2$ no 22º dia de cultivo, indicando confluência celular aceitável para a continuidade do estudo. Também, é possível identificar as fases de crescimento celular. No primeiro dia, momento da inoculação das células, não é a realizada a medida da TEER.

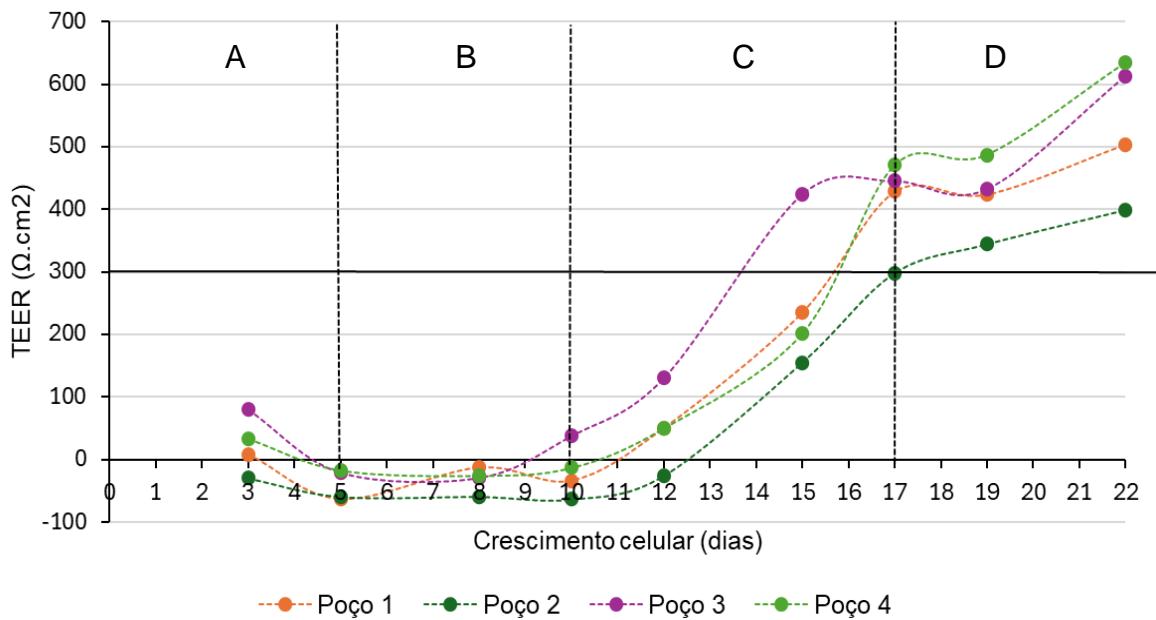


Figura 15 – Valores de TEER da monocamada de células Caco-2 mensurados ao longo do tempo de crescimento celular e diferenciação. A) adesão das células e início do crescimento, B) formação da monocamada celular, C) aumento da densidade de células e início da diferenciação e D) monocamada densa e diferenciação completa.

Entre o 3º e o 5º dia (segmento A), observa-se a adesão das células na membrana semipermeável do inserto e o início do crescimento celular. A partir do 5º dia de cultivo, até o 10º dia (segmento B), a medida da TEER demonstra uma estabilidade, indicando o estágio de crescimento celular e formação da monocamada. Entre o 10º e o 17º dia (segmento C), pode-se observar um aumento expressivo da medida da TEER, o que indica o crescimento exponencial das células e o início de sua diferenciação. A partir do 17º dia (segmento D) é possível observar algum aumento da TEER, mas este ainda apresenta alguma estabilidade, indicando um modelo de monocamada denso e diferenciado.

Estas observações são similares com o que foi encontrado por Zhang et al. (2022), cujo modelo celular demonstrou a adesão das células ao 3º dia de cultivo, formação de uma monocamada celular completa a partir do 7º dia, aumento na densidade das células e início da diferenciação a partir do 13º dia, e a formação de uma monocamada densa e diferenciada a partir do 17º dia de cultivo.

Outro método para verificar a integridade da monocamada é a aplicação do Lucifer Yellow (LY) em cada um dos poços após a análise de biodisponibilidade. O

Lucifer Yellow é um corante fluorescente hidrofílico de baixa permeabilidade e facilmente detectável, que pode atravessar a monocamada celular através do espaço paracelular e junções estreitas, sendo muito utilizado para avaliar a absorção passiva (Ferrareto et al., 2018). Além da avaliação da integridade da monocamada celular e da permeabilidade paracelular, o LY pode ser utilizado para determinar se a concentração da amostra testada pode afetar a integridade da monocamada (Pratt et al., 2012).

Uma permeabilidade aceitável de transferência do LY do lado apical para o basolateral é de 3% (Pratt et al., 2012). Porcentagens de permeabilidade maiores que 3% podem indicar alterações nas junções estreitas e a presença de lesões ou falhas na monocamada celular. O cálculo da permeabilidade envolve a quantificação da fluorescência do Lucifer Yellow no compartimento basolateral em comparação à quantidade inicial adicionada ao compartimento apical.

Na Figura 16 consta o gráfico da porcentagem de permeabilidade do corante adicionado a cada um dos poços contendo o mesmo conjunto de células em que se analisou a biodisponibilidade. As amostras de arroz integral, batata cozida e batata pré-frita assada apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle. Já, a amostra arroz branco apresentou permeabilidade estatisticamente igual ao controle e a amostra de arroz integral.

Esses resultados indicam que as amostras de arroz integral, batata cozida e batata pré-frita assada apresentaram alguma influência sobre a permeabilidade do Lucifer Yellow quando relacionada com o controle (monocamada íntegra em que não foi adicionada amostras), diferente da amostra de arroz branco, que foi estatisticamente igual ao controle. É importante destacar que todas as amostras apresentaram valores de permeabilidade inferiores a 1 %, satisfazendo o limite indicado pelo método (3 %). Os valores encontrados demonstram que as monocamadas estavam intactas antes da avaliação da biodisponibilidade das amostras, e que após o teste de biodisponibilidade, a monocamada celular permaneceu íntegra em todos os insertos.

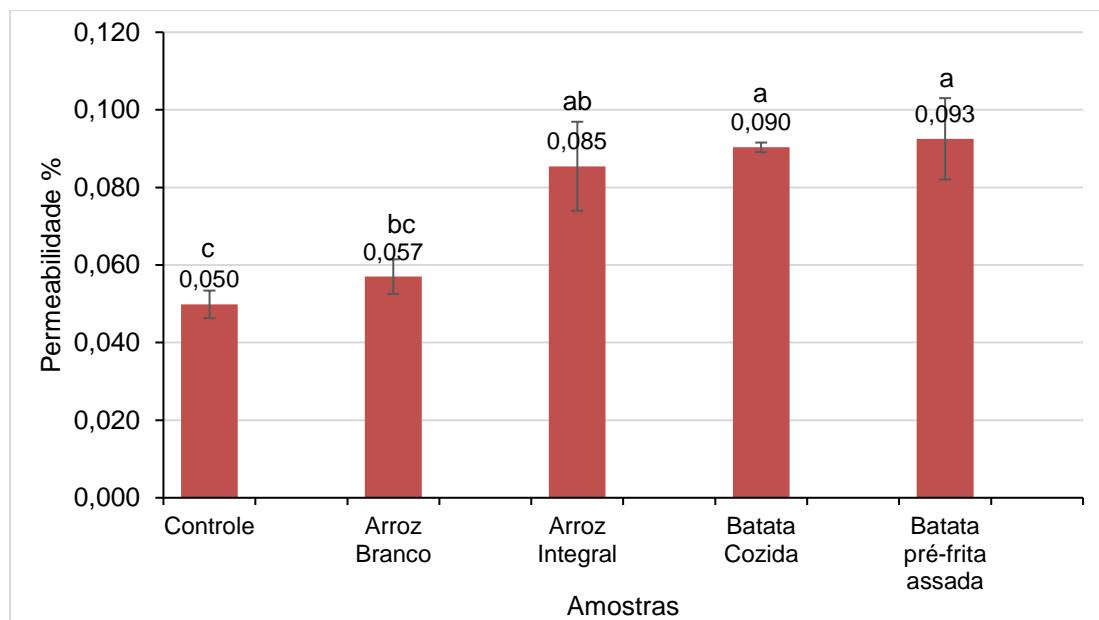


Figura 16 – Permeabilidade do corante Lucifer Yellow (%) para cada uma das amostras, comparadas com a permeabilidade do controle. Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre as amostras ($p<0,05$).

5.6 BIODISPONIBILIDADE DA FENILALANINA

A Tabela 7 apresenta o teor de fenilalanina apical e basal após 2 h de incubação em células Caco-2. A fenilalanina apical reflete a quantidade deste aminoácido que estaria acessível para absorção no lúmen intestinal, enquanto a fenilalanina basal mede o que efetivamente atravessaria o epitélio intestinal, alcançando o sistema circulatório. É possível observar uma redução considerável na concentração da fenilalanina apical para a basal nas amostras cozidas (arroz branco, arroz integral e batata). Essa redução impacta diretamente na biodisponibilidade da fenilalanina nessas amostras, indicando uma baixa eficiência de absorção. Ao contrário da amostra de batata pré-frita assada, cuja diferença de concentração da fenilalanina apical para a basal não se mostrou expressiva, levando a uma alta taxa de biodisponibilidade (95,50%).

A alta concentração de fenilalanina na batata pré-frita assada pode indicar duas situações. 1) o processamento térmico da batata pré-frita assada reduziu o teor de água da amostra aproximadamente pela metade (1,70) quando comparado a batata cozida, aumentando seu teor de proteína 2,33 vezes, consequentemente aumentando o teor de fenilalanina na amostra. E 2) O processamento térmico, principalmente as altas temperaturas ao qual o alimento foi submetido, pode ter

promovido reações químicas, como a reação de Maillard (que ocorre através da interação entre aminoácidos e açúcares), possibilitando o surgimento de compostos que apresentem características similares a fenilalanina, ou que reaja com os componentes da derivatização durante a análise de aminoácidos, sendo eluídos no mesmo tempo de retenção da fenilalanina. Além disso, a reação de Maillard em alimentos processados em altas temperaturas pode modificar as cadeias laterais de aminoácidos, o que afetaria sua biodisponibilidade (Loveday, 2023). Em ambos os casos, é possível dizer que o processamento ao qual um alimento é submetido pode influenciar a forma como a fenilalanina é absorvida.

Ao nosso conhecimento, nosso estudo é pioneiro em mostrar que a baixa biodisponibilidade da fenilalanina nas amostras de arroz e batata cozida pode ser explicada pela composição da matriz, processamento, processos de transporte celular, metabolização e retenção que ocorrem durante a absorção nas células.

A matriz alimentar vai influenciar a liberação da fenilalanina durante a digestão, então uma matriz que possui maior quantidade de fibras pode dificultar a digestão e absorção completa desse aminoácido, como por exemplo o arroz integral que apresenta 2,12 g/100 g de fibras e bioacessibilidade de 1,43% em relação ao arroz branco, que apresenta menor quantidade de fibras, de 1,79 g/100 g e notavelmente maior biodisponibilidade da fenilalanina (6,83%).

O processamento mais brando ao qual as matrizes foram submetidas também pode ter influenciado na baixa biodisponibilidade da fenilalanina. Em uma panela de pressão a temperatura de cozimento fica entre 115 e 120 °C e foi utilizado tempos de 15 a 20 minutos. Já o processo de pré-fritura e assamento (200°C por 20 minutos) aplicado à batata pode ter causado maior desnaturação da proteína, disponibilizando os sítios para hidrólise das proteínas e consequentemente liberando maior teor de fenilalanina biodisponível.

Tabela 7 – Biodisponibilidade das matrizes alimentares e teor de fenilalanina apical e basolateral.

Amostra	Fenilalanina apical* (mg/100 g)	Fenilalanina basal** (mg/100 g)	Biodisponibilidade (%)
Arroz branco	20,88 ± 0,13	1,94 ± 0,74	6,83 ± 0,15
Arroz integral	18,83 ± 0,04	0,27 ± 0,07	1,43 ± 0,38
Batata cozida	15,52 ± 0,47	0,37 ± 0,06	2,39 ± 0,44
Batata pré-frita assada	111,41 ± 1,99	106,38 ± 0,40	95,50 ± 2,07

*A fração apical representa o teor de fenilalanina do digerido que não atravessou a monocamada celular, aqui representando a barreira intestinal.

**A fração basal representa o teor de fenilalanina do digerido que atravessou a monocamada celular, aqui representando a barreira intestinal, tornando-se biodisponível.

A comparação entre os teores de fenilalanina inicial, bioacessível e biodisponível nas diferentes amostras pode ser visualizada na Figura 17. É possível observar uma redução acentuada da fenilalanina inicial para a fração bioacessível nas amostras de arroz branco (de 168,24 mg/100 g para 20,35 mg/100 g), arroz integral (de 120,98 mg/100 g para 23,61 mg/100 g) e batata cozida (de 84,20 mg/100 g para 23,37 mg/100 g). Essa redução foi ainda maior para a fração biodisponível, com valores abaixo de 1,94 mg/100 g, indicando uma baixa biodisponibilidade nessas amostras. Entretanto, a batata pré-frita assada apresentou um teor de fenilalanina elevado (222,55 mg/100 g), e manteve um nível significativo na fração biodisponível (106,38 mg/100 g), indicando alta biodisponibilidade.

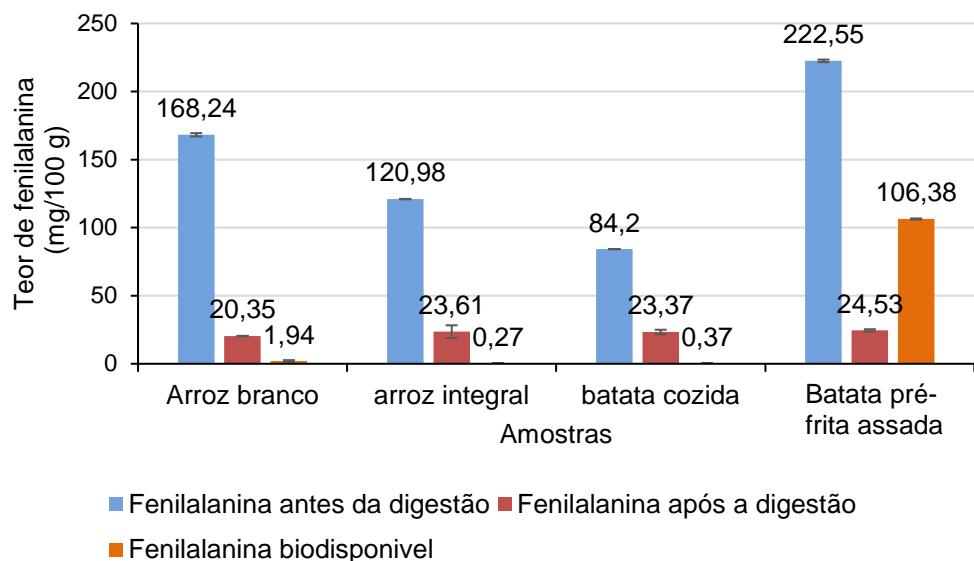


Figura 17 – Comparação entre o teor de fenilalanina antes da digestão, após a digestão (fração bioacessível) e fração biodisponível (porção que atravessou a monocamada celular).

6 CONCLUSÕES

O questionário aplicado nesse estudo ressaltou os desafios enfrentados por esses pacientes na adesão ao tratamento. Dificuldades relacionadas a disponibilidade e custo de alimentos hipoproteicos, bem como as restrições impostas pelas limitadas opções alimentares, e o sabor desagradável da fórmula, foram evidenciados. Essas limitações refletem diretamente no cotidiano dos pacientes e seus familiares, sendo muito importante estudos que busquem por alternativas que flexibilizem ou personalizem as dietas.

Com relação ao questionário, o mesmo poderia sofrer modificações com relação as perguntas, para torná-las mais claras, objetivas e coerentes com o estudo. Um exemplo foi o fato de a batata ter sido muito citada no questionário, e alguns a citaram como batata frita, especificamente. Uma pergunta mais específica que detalhe a forma de preparo do alimento seria mais aproveitada.

Dentre os alimentos parcialmente liberados, o arroz e batata foram os alimentos mais citados pelos participantes da pesquisa, indicando que gostariam de aumentar o consumo desses alimentos, reforçando a importância do estudo.

Os resultados mostraram que tanto os componentes da matriz alimentar como o tipo de processamento do alimento afetam a bioacessibilidade e

biodisponibilidade da fenilalanina. Embora as matrizes avaliadas tenham apresentado conteúdo de fenilalanina diferentes entre si, após a digestão os teores desse aminoácido foram próximos. Essa semelhança, entretanto, não afetou a bioacessibilidade das amostras. A batata cozida e o arroz branco apresentaram os maiores valores de bioacessibilidade, enquanto a batata pré-frita assada teve a menor bioacessibilidade entre as amostras analisadas.

A batata pré-frita assada apresentou a menor bioacessibilidade da fenilalanina, embora tenha sido a amostra em que a fenilalanina esteve mais biodisponível, provavelmente devido ao processo de pré-fritura e posterior assamento em altas temperaturas que retirou água da amostra e concentrou a proteína ou devido ao surgimento de compostos provenientes de reações que ocorrem em altas temperaturas. Dentre as amostras de arroz, o integral apresentou a menor biodisponibilidade provavelmente devido sua composição rica em fibra alimentar, que interfere na digestão proteica e consequentemente na bioacessibilidade e biodisponibilidade da fenilalanina. Isso revela o quanto o processamento do alimento pode impactar na bioacessibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos.

7 REFERÊNCIAS

- AGANA, M. et al. Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 24, 2018.
- AMAROWICZ, R.; KORCZAKOWSKA, B.; SMOCZYŃSKA, K.. Effect of fiber from buckwheat on the In vitro enzymatic digestion of protein. **Food/Nahrung**, v. 32, n. 10, p. 1005-1006, 1988.
- AMIGO, L., HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4479, 2020.
- BLAU, N. ERLANDSEN, H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Molecular genetics and metabolism**, v. 82, n. 2, p. 101-111, 2004.
- BLAU, N.; VAN SPRONSEN, F. J.; LEVY, H. L. Phenylketonuria. **The Lancet**, v. 376, n. 9750, p. 1417-1427, 2010.

BORTOLUZZI, V. T. Efeitos da suplementação com creatina e piruvato sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em cérebro de animais submetidos à fenilcetonúria. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Porto Alegre – RS. 223 f. 2019.

BRASIL, Ministério da saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Relatório de recomendação: sapropterina para o tratamento da fenilcetonúria nº 402. Brasília: Ministério da saúde, p. 90, 2018. Disponível em: www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2018/relatorio_sapropterina_fenilcetonuria_final_402_2018.pdf acesso em outubro de 2024.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Fenilalanina em Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde. 2020 Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/fenilalanina> acesso em maio de 2025.

BRASIL, Ministérios da Saúde. Programa Nacional de Triagem Neonatal. Fenilcetonúria (PKU). Brasília: Ministério da Saúde, 2021A. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/sangue/pntn/fenilcetonuria-pku>. Acessado em dezembro de 2024.

BRASIL, Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Relatório para sociedade: informações sobre recomendações de incorporação de medicamentos e outras tecnologias no SUS. Dicloridrato de sapropterina para o tratamento de pacientes com fenilcetonúria. Brasília: Ministério da Saúde, p. 21, 2021B. Disponível em: www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2021/Sociedade/20210713_resoc253_sapropterina_fenilcetonuria_final.pdf. Acesso em: outubro 2024.

BRASIL. Lei nº 14.154, de 26 de maio de 2021C. Altera a Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990 (Estatuto da Criança e do Adolescente) para aperfeiçoar do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2021. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2021/lei/l14154.htm. Acesso em; dezembro 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC Nº 617, de 9 de março de 2022. Brasília: Ministério da Saúde. ANVISA. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-617-de-9-de-marco-de-2022-386114839>. Acesso em maio de 2025.

BRODKORB, A., EGGER, L., ALMINGER, M. et al. INFOGEST static in vitro simulationof gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

CAETANO-SILVA, M. E., CILLA, A., BERTOLDO-PACHECO, M. T., NETTO, F. M.; ALEGRIA, A. Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey

peptide-iron complexes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, n. SI, p. 95-100, 2018.

CARDOSO, C., et al., Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 5-23, 2014.

CENTERWALL, S. A., CENTERWALL, W. R. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. **Pediatrics**, v. 105, n. 1, p. 89-103, 2000.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. *In: Damodaran, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R. Química de alimentos de Fennema. Tradução Adriano Brandelli ... [et al.]. – 4. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.*

DA SILVA, E. do N. Nutrientes e elementos tóxicos em alface (*Lactuca sativa*): estudos de bioacessibilidade, biodisponibilidade, biofortificação e especiação. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. Campinas, 2016.

DE LIMA, A. C. S. et al. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 161, p. 142-147, 2014.

ELENDRAN, S. et al. Permeability of the ellagitannin geraniin and its metabolites in a human colon adenocarcinoma Caco-2 cell culture model. **Food & function**, v. 10, n. 2, p. 602-615, 2019.

FERRARETTO, A. et al. Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium. **Bioscience reports**, v. 38, n. 2, p. BSR20171497, 2018.

FERREIRA, C. R., et al. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). **Journal of inherited metabolic disease**, v. 44, n. 1, p. 164-177, 2021.

GAIGHER, Bruna et al. Formulations with microencapsulated Fe-peptides improve in vitro bioaccessibility and bioavailability. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 687-697, 2022.

GONÇALVES, A. et al. In vitro bioaccessibility and intestinal transport of retinoic acid in ethyl cellulose-based microparticles and impact of meal co-ingestion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 258, p. 128991, 2024.

GUIMARÃES, C. P.; LANFER MARQUEZ, U. M. Chemical composition of bouillon cubes protein nitrogen, non protein nitrogen and phenylalanine. **Food Science and Technology**, v. 22, p. 308-313, 2002.

HOFMAN, D. L. et al. A systematic review of cognitive functioning in early treated adults with phenylketonuria. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2018.

HWANG, S., LEE, J., KIM, D. Assessment of intestinal permeability of EGCG by piperine using Caco-2 cell monolayer system. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 35-41, 2020.

IFTIKHAR, M. et al. Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFEs) in Caco-2 cells monolayer: A review. **Food research international**, v. 136, p. 109240, 2020.

ISMAIL, I. T., SHOWALTER, M. R., FIEHN, O. Inborn errors of metabolism in the era of untargeted metabolomics and lipidomics. **Metabolites**, v. 9, n. 10, p. 242, 2019.

KANDEMIR, K. et al. Recent advances on the improvement of quercetin bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 192-200, 2022.

KÖLKER, S. Metabolism of amino acid neurotransmitters: the synaptic disorder underlying inherited metabolic diseases. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 41, p. 1055-1063, 2018.

KONDRASHINA, A. et al. Coupling in vitro food digestion with in vitro epithelial absorption: recommendations for biocompatibility. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 26, p. 9618-9636, 2023.

KURE, Shigeo et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **The Journal of pediatrics**, v. 135, n. 3, p. 375-378, 1999.

KYLISS, J., BRUNNE, B., RUNE, G.M. A culture model for the assessment of phenylalanine neurotoxicity in phenylketonuria. **In vitro models**, v. 1, n. 1, p. 103-114, 2022.

LAH, M.; MCPHERON, M. Palynziq clinic: one year and 43 patients later. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 133, n. 3, p. 250-256, 2021.

LANFER MARQUEZ, Ú. M. et al. Estudo da composição química de flocos de cereais com ênfase nos teores de fenilalanina. **Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 314-319, 1997.

LATIMER, G. W. JR. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 19. 2012.

LI, W. et al. In vitro and in vivo bioaccessibility, antioxidant activity, and color of red radish anthocyanins as influenced by different drying methods. **Food Chemistry: X**, v. 18, p. 100633, 2023.

LIANG, N., KIM, B., DALLAS, D. C. Bioavailability of peptides derived from the in vitro digestion of human milk assessed by caco-2 cell monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 7077-7084, 2022.

LICHTER-KONECKI, U., VOCKLEY, J. Phenylketonuria: current treatments and future developments. **Drugs**, v. 79, n. 5, p. 495-500, 2019.

LOVEDAY, S. M. Protein digestion and absorption: The influence of food processing. **Nutrition research reviews**, v. 36, n. 2, p. 544-559, 2023.

MACDONALD, A. et al. Nutrition in phenylketonuria. **Molecular genetics and metabolism**, v. 104, p. S10-S18, 2011.

MACDONALD, A. et al. An observational study evaluating the introduction of a prolonged-release protein substitute to the dietary management of children with phenylketonuria. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2686, 2020.

MACGRAW, N. J. et al. Partially hydrolyzed soy protein shows enhanced transport of amino acids compared to nonhydrolyzed protein across an intestinal epithelial cell monolayer. **Journal of food science**, v. 79, n. 9, p. H1832-H1840, 2014.

MAHAN, K. C., GANDHI, M. A., E ANAND, S. Pegvaliase: a novel treatment option for adults with phenylketonuria. **Current Medical Research and Opinion**, v. 35, n. 4, p. 647–651, 2018.

MINEKUS, Mans et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico] – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: **Artmed**, 2014.

NEY, D. M; ETZEL, M. R. Designing medical foods for inherited metabolic disorders: why intact protein is superior to amino acids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 39–45, 2017.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of food science**, v. 72, n. 2, p. R21-R32, 2007.

PEREIRA, D. D. S. et al. Bioacessibilidade de compostos bioativos e potencial antioxidante de polpa de juçara em pó (Euterpe Edulis). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 26., Belém, Pará, 2018. O Uso consciente da biodiversidade: perspectivas para o avanço da ciência e tecnologia de alimentos. Anais... Belém: SBCTA, 2018.

PINTO, J. A. O. ; FARIA, A. F. R. ; BOTTA, V. Álgebra linear aplicada a doenças autossômicas recessivas. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 8, n. 1, 2021.

PRATT, J. et al. Use of zinc finger nuclease technology to knock out efflux transporters in C2BBe1 cells. **Current Protocols in Toxicology**, v. 52, n. 1, 2012.

PRASAD, Bhavabuti et al. Proteins: Structure, properties, and importance. In: **Handbook of Biomolecules**. Elsevier, 2023. p. 77-117.

RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J., MINOR, L. Cell viability assays. IN: MARKOSSIAN, S., GROSSMAN, A., BRIMACOMBE, K., et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. **Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, Bethesda (MD). 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>, acesso em novembro de 2024.

RUBIO, L. A.; SEIQUER, I. el. Transport of amino acids from in vitro digested legume proteins or casein in Caco-2 cell cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5202-5206, 2002.

SACHAROW, S.; RAJABI, F.; LEVY, H. Phenylketonuria. In: Clinical DNA Variant Interpretation. **Academic Press**, p. 291-304, 2021.

SANTOS, D. I. et al. Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In: Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds. **Woodhead Publishing**, p. 23-54, 2019.

SILVA ABREU, M. E. C. Complexos ferro-peptídeos de soro de leite : obtenção, caracterização e avaliação do efeito pró-oxidante do ferro e de sua biodisponibilidade por modelo de cultura de células Caco-2 / Maria Elisa Caetano Silva Abreu. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

SNOECK V., GODDEERIS B., COX E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. **Microbes Infect** 7(7-8):997-1004. 2005.

SRINIVASAN, B. et al. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. **Journal of laboratory automation**, v. 20, n. 2, p. 107-126, 2015.

STORCK, C. R., SILVA, L. P., COMARELLA, C. G. Influência do processamento na composição nutricional de grãos de arroz. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 3, p. 259-264, 2009.

TABOADA-LÓPEZ, María Vanesa et al. Caco-2 in vitro model of human gastrointestinal tract for studying the absorption of titanium dioxide and silver nanoparticles from seafood. **Talanta**, v. 233, p. 122494, 2021.

TAN, J. et al. Bioavailability and Antioxidant Activity of Rambutan (*Nephelium lappaceum*) Peel Polyphenols during in Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion, Caco-2 Monolayer Cell Model Application, and Colonic Fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 42, p. 15829-15841, 2023.

THOMAS, J. et al. Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: results of a long-term phase 3 clinical trial program (PRISM). **Molecular genetics and metabolism**, v. 124, n. 1, p. 27-38, 2018.

TRIGO, J. P. et al. In vitro digestibility and Caco-2 cell bioavailability of sea lettuce (*Ulva fenestrata*) proteins extracted using pH-shift processing. **Food Chemistry**, v. 356, p. 129683, 2021.

VAN SPROSEN, FJ, BLAU, N., HARDING, C. et al., Phenylketonuria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 36, 2021.

VERHOECKX, K.; et al. (Eds.); The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health: In Vitro and Ex Vivo Models. **Springer International Publishing**, p. 103-111, 2015.

WALTER, M., MARCHEZAN, E., AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.1184-1192, jul, 2008.

WANG, L. et al. Hydrolysis and transport of egg white-derived peptides in Caco-2 cell monolayers and everted rat sacs. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 17, p. 4839-4848, 2019.

WASIM, M. et al. Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. **Biochemical Genetics**, v. 56, p. 7–21, 2018.

WILLIAMS, R. A., MAMOTTE, C. D., BURNETT, J. R., Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 29, n. 1, p. 31, 2008.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4^a Ed. 1^a Ed. Digital. **São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz**, p. 1020, 2008.

ZHANG, T. et al. Effect of different cadmium levels in *Boletus griseus* on bioaccessibility, bioavailability, and intestinal flora by establishing a complete bionic digestion system in vitro. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 8, p. 3677-3689, 2022.

ZHU, Fan. Dietary fiber polysaccharides of amaranth, buckwheat and quinoa grains: A review of chemical structure, biological functions and food uses. **Carbohydrate Polymers**, v. 248, p. 116819, 2020.

8 ANEXOS

8.1 Questionário aplicado aos pacientes ou responsáveis por pacientes fenilcetonúricos.

1) Você é:

- a) Paciente com fenilcetonúria
- b) Responsável ou cuidador de um paciente com fenilcetonúria
- c) Profissional responsável por pacientes com fenilcetonúria

2) (Para pacientes com fenilcetonúria) Qual a sua idade?

2) (Para responsável ou cuidador) Você é:

- a) Pai/Mãe de um paciente com fenilcetonúria
- b) Responsável legal por um paciente com fenilcetonúria
- c) Cuidador de um paciente com fenilcetonúria

2) (Para profissionais da saúde) Qual a sua área de atuação?

3) O paciente consome fórmula de aminoácidos livres para complemento da dieta?

4) O paciente sente alguma dificuldade em seguir a dieta para fenilcetonúria?

- a) Gosto ruim da fórmula de aminoácidos
- b) Dificuldade na obtenção da fórmula através do SUS
- c) Alto custo dos alimentos hipoproteicos
- d) Vontade de consumir alimentos hipoproteicos
- e) Pouca opção de alimentos disponíveis
- f) Dificuldade em encontrar alimentos hipoproteicos fora de casa
- g) Não possui dificuldades em seguir a dieta

h) Outras _____

5) o consumo de frutas e legumes é livre?

6) O paciente consome as frutas e legumes abaixo? Indique a frequência.

- a) Maçã gala
- b) Mamão
- c) Manga
- d) Melão
- e) Pera
- f) Uva
- g) Cenoura
- h) Chuchu
- i) Mandioca

7) Existe algum alimento, **dentre os disponíveis em sua dieta PKU**, que você gostaria de comer em maior quantidade do que o indicado? Se sim, qual/quais?

8) Você participa de ações informativas sobre formas de preparo de alimentos hipoproteicos e opções de substituição de ingredientes não permitidos em receitas?

8.2 Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Bioacessibilidade e biodisponibilidade da fenilalanina após a digestão *in vitro*.

Número do CAAE: 67002822.3.3001.5404

(Equipe de pesquisadores: Daniele Cristina da Silva Napoli; Maria Teresa Bertoldo Pacheco; Renata Rodrigues Guirau)

APRESENTAÇÃO DA PESQUISA:

Você está sendo convidado a participar da pesquisa "Bioacessibilidade e biodisponibilidade da fenilalanina após a digestão", que será realizada na Universidade Estadual de Campinas e no Instituto de Tecnologia de Alimentos, sob responsabilidade da pesquisadora Daniele Cristina da Silva Napoli. As informações presentes neste documento foram fornecidas pela pesquisadora Daniele Cristina da Silva Napoli.

Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), visa assegurar seus direitos como participante e será disponibilizado por meio virtual (formulário de pesquisa e anexo ao e-mail de contato). Este arquivo deve ser salvo em local seguro e de fácil acesso para uso futuro, ou deve ser impresso e guardado.

Por favor, leia com atenção e calma, buscando entender completamente a proposta da pesquisa. Se tiver dúvidas sobre qualquer ponto da pesquisa ou de sua participação, antes ou mesmo depois de concordar em ser participante da pesquisa, você poderá esclarecer-las com o(s) pesquisador(es) da equipe Daniele Cristina da Silva Napoli; Maria Teresa Bertoldo Pacheco e Renata Rodrigues Guirau pelos meios de contato descritos neste Termo. Se preferir, você pode consultar seus familiares e/ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá qualquer tipo de penalização ou prejuízo se você não quiser participar ou se retirar sua autorização em qualquer momento, mesmo depois de iniciar sua participação nesta pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE ESTA PESQUISA:

Objetivos: O objetivo desta pesquisa será consiste em avaliar a biodisponibilidade da fenilalanina após a digestão de proteínas completas provenientes de diferentes matrizes alimentares, avaliando o impacto metabólico e a interação com a microbiota intestinal.

Importância do estudo: o estudo busca a construção de conhecimentos científicos sobre a dieta de pacientes brasileiros com fenilcetonúria e até que ponto

o processo de digestão de alguns alimentos permite que a fenilalanina se torne biodisponível para absorção pelo organismo.

Procedimentos e metodologias: Sua participação no estudo consistirá em responder a um questionário semi-aberto que se encontra disponibilizado virtualmente no link fornecido no e-mail, sobre o tema do Projeto de Qualificação da pesquisadora Daniele Cristina da Silva Napoli, segundo objetivo explicitado acima. O questionário possui de 9 a 10 questões de múltipla escolha ou aberta, nas quais o participante vai responder sobre sua dieta e levará cerca de 5 minutos para respondê-lo.

Os dados e informações obtidos durante esta pesquisa serão armazenados pelo período de 5 anos e após esse período, os dados serão excluídos. Os dados serão guardados pelos participantes da pesquisa e armazenados na nuvem (google drive) e se necessário, em repositório de dados da UNICAMP. As informações obtidas por meio pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação, e não será possível identificar o participante através das respostas. Os dados serão utilizados para o direcionamento da pesquisa acima citada, na escolha da matriz alimentar que será submetida a tratamentos e análises in vitro.

Tratamento dos dados: Esta pesquisa prevê o armazenamento dos dados, anonimizados, coletados nesta pesquisa, em repositório institucional de dados, em local virtual, de acesso público, com objetivo de possível reutilização, verificação e compartilhamento, em trabalhos de colaboração científica com outros pesquisadores. Sua identidade não será revelada nesses dados, pois os mesmos serão armazenados de forma anônima (isto é, os dados não terão identificação), utilizando mecanismos que impeçam a possibilidade de associação, direta ou indireta, com você. Cabe ressaltar que a pessoa que compartilhar os dados anonimizados também não terá possibilidade de identificar os participantes dos quais os dados originaram. Sendo assim, não haverá possibilidade de reversão da anonimização.

Desconfortos e riscos previstos: Não há riscos previsíveis para os participantes da pesquisa. O questionário será respondido através de formulário Google, que apresenta os dados de forma anônima, sem a possibilidade de identificar o participante através das respostas. O questionário deve levar, em média, cinco minutos para ser respondidos.

Benefícios: O estudo não oferece benefício direto para os participantes, mas apresenta potencial para benefício comunitário e científico. Os trabalhos decorrentes dessa pesquisa contribuirão para a construção do conhecimento a respeito da dieta de pacientes com fenilcetonúria.

Acompanhamento e assistência: Para qualquer dúvida ou esclarecimentos o participante poderá entrar em contato com a pesquisadora Daniele Cristina da Silva Napoli através do e-mail ou telefone disponibilizados neste termo.

Forma de contato com os pesquisadores: Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Daniele Cristina da Silva Napoli no endereço profissional Avenida Brasil, 2880, jardim Chapadão, telefone (19) 98608-6227, e-mail: danielecristina.cs@gmail.com.

Forma de contato com Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de pesquisas envolvendo seres humanos, protegendo o(a)s participantes em seus direitos e dignidade. Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre aspectos éticos de sua participação e sobre seus direitos como participante da pesquisa, entre em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (CEP-UNICAMP), de segunda a sexta-feira, das 08:00hs às 11:30hs e das 13:00hs às 17:30hs à Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefones (19) 3521-8936 e (19) 3521-7187; e-mail: cep@unicamp.br. Se houver necessidade da intermediação da comunicação em Libras, você pode fazer contato com a Central TILS da Unicamp no site: <https://www.prg.unicamp.br/tils/> e solicitar ajuda para comunicação com o CEP.

GARANTIAS AOS PARTICIPANTES:

Esclarecimentos: Você será informado(a) e esclarecido(a) sobre os aspectos relevantes da pesquisa, antes, durante e depois da pesquisa, mesmo se esta informação causar sua recusa na participação ou sua saída da pesquisa. Os resultados finais ou preliminares da pesquisa serão divulgados em eventos

científicos, publicações e na dissertação da autora, que estará disponível para acesso público em repositórios online.

Direito de recusa a participar e direito de retirada do consentimento:

Você tem direito de se recusar a participar da pesquisa e de desistir e retirar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa sem que isto traga qualquer penalidade ou represálias de qualquer natureza e sem que haja prejuízo para você. A recusa em participar ou a retirada do consentimento não implicará em qualquer penalidade ao participante frente as instituições ITAL e UNICAMP, nem prejudicará o relacionamento com os profissionais dessas instituições ou os pesquisadores responsáveis pela pesquisa.

Sigilo e privacidade: Você tem garantia que sua identidade será mantida em sigilo, e dados e/ou informações identificadas ou identificáveis não serão fornecidos a pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados deste estudo, informações que possam identificá-lo(a) não serão mostradas ou publicadas. Em função da natureza digital desta pesquisa, não é possível garantir segurança ou sigilo absoluto dos dados, mas todo cuidado será tomado pelos pesquisadores para garantir o sigilo de seus dados. Para maior segurança dos dados, serão adotadas as seguintes medidas: os dados serão armazenados na nuvem com acesso mediante senha e somente a equipe de pesquisa terá acesso aos dados.

Ressarcimento: Você não terá qualquer despesa por participar desta pesquisa. Caso tenha gastos para participar desta pesquisa fora da sua rotina você será resarcido integralmente de suas despesas.

Assistência, indenização e medidas de reparação: Você tem direito de buscar indenização e reparação de danos se sentir prejudicado(a) pela participação nesta pesquisa, mesmo se já tiver concordado em participar da pesquisa e assinado TCLE.

Você receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de danos decorrentes da participação nesta pesquisa.

Entrega do TCLE: Você receberá este Termo assinado e rubricado pelo(a) pesquisador(a) por meio do e-mail disponibilizado pelo participante em conversa inicial a respeito da pesquisa.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e desconfortos que esta pode acarretar, aceito participar e declaro ter recebido este documento assinado pelo(a) pesquisador(a) por meio do formulário do questionário.

Responsabilidade do(a) Pesquisador(a)

Asseguro ter cumprido as exigências da Resolução CNS/MS 466/2012, CNS/MS 510/2016 e complementares na elaboração do protocolo desta pesquisa e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter lido, explicado e fornecido este documento ao participante da pesquisa. Informo que este estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo (a) participante.