ARTIGO
DOI: 10.3395/2317-269X.00273

Calidad microbiológica de un hidrolizado de pescado de producción casera

Microbiological quality of home-made fish hydrolysate

Maria Elisabeth Machado Pinto-e-Silva[I,*]

Maria Carolina Batista Campos von Atzingen[I]

Gabriela Mascaretti Dias[I]

RESUMEN

Los hidrolizados de pescado pueden servir de suplemento en dietas para personas con deficiencias en la digestión y/o absorción de proteínas, y también, en el tratamiento de niños desnutridos. El objetivo de ésta investigación fue determinar la calidad microbiológica de un hidrolizado de pescado obtenido en condiciones semejantes a la doméstica, sometido a diferentes tiempos de conservación. En muestras del hidrolizado fresco de tilapia (*Oreochromis niloticus*), sometidas a conservación en temperatura de refrigeración de 4°C por 72 horas por 1 semana, se analizaron coliformes termotolerantes, *Escherichia. coli*, bacterias mesófilas, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras, según los métodos descritos en el "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" y en el "Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água". En ninguna de las muestras se verificó presencia/proliferación de los microorganismos analizados, significando una preservación de la calidad del hidrolizado durante su preparación, conservación apropiada para el consumo y garantía de la inocuidad por hasta una semana de refrigeración.

PALABRAS CLAVE: Hidrolizados proteicos, Microorganismos, Tilapia, Refrigeración, Inocuidad

ABSTRACT

Hydrolyzed fish protein can be used in the nutritional treatment of individuals who have limitations in digesting intact protein and in malnourished children. The objective of this study was to determine the microbiological quality of fish hydrolysate obtained by domestic production and subjected to different periods of conservation. Fecal coliforms such as *Eschericia coli*, mesophilic bacteria such as *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*, molds, and yeasts were investigated according to the "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" and "Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água." Fresh samples of hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus)* as well as samples that had been refrigerated (4°C) for 72 h as well as 1 week were analyzed. If the presence/ growth of analyzed microorganisms was detected in any sample, it meant that the quality of the hydrolysate was preserved during its preparation, it was appropriate for consumption, and its safety was guaranteed up to 1 week in refrigeration.

KEYWORDS: Hydrolyzed protein, Microorganisms, Tilapia, Refrigeration, Safety

[I] Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (FSP/USP), São Paulo, SP, Brasil

* **E-mail:** mmachado@usp.br

Recebido: 01 Fev 2014
Aprovado: 29 Set 2014

INTRODUCCIÓN

Shahidi et al.[1] han informado que la hidrólisis enzimática se puede utilizar para mejorar la calidad y las características funcionales de los subproductos del procesamiento de pescado. Una serie de subproductos de pescado hidrolizados se han reportado en la literatura científica, incluyendo las especies *Lates calcarifer*, *Acipenser persicus*, entre otras[2,3].

La hidrólisis de las proteínas de pescado resulta de la acción de enzimas que actúan como catalizadores biológicos, bajo control del pH, de la temperatura y de otras variables, para potenciar la calidad y biodisponibilidad de la proteína[4]. La acción proteolítica, debidamente controlada, retiene la calidad nutricional del sustrato original, obtenido a partir del músculo del pescado, rico en proteínas de elevado valor biológico, con propiedades funcionales y altamente nutritivo; puede ser utilizado como ingrediente en alimentos para el consumo humano, con la finalidad de enriquecerlos[5].

Los hidrolizados de pescado pueden servir de suplemento en dietas para personas con deficiencias en la digestión y/o absorción de proteínas, y también, en el tratamiento de niños desnutridos, gracias a su elevada digestibilidad y a los aminoácidos esenciales disponibles[6,7].

Además, otras propiedades se atribuyen a los hidrolizados de pescado. El hidrolizado de tiburón punta negra, por ejemplo, puede ser utilizado como una fuente alternativa de antioxidantes naturales[8]. Según Yin et al.[9], el hidrolizado de siluro tiene propiedades funcionales y reológicas, y puede ser utilizado como ingrediente funcional. Wergedahl et al., encontraron que el uso de hidrolizado de pescado promueve la reducción de los niveles de colesterol en ratas[10].

Debido a que el pescado y sus productos son muy perecederos, los cuidados higiénico-sanitarios durante el procesamiento del hidrolizado, unidos a técnicas de eliminación y/o control del crecimiento microbiano, son imprescindibles. La conservación bajo condiciones adecuadas, la obtención de materia prima de procedencia segura, además de tratamientos contra la proliferación de microorganismos y atributos inherentes a la materia prima, como la acidez, son esenciales para garantizar la calidad microbiológica del producto final, así como de su vida útil.

Considerando la importancia nutricional y funcional de los hidrolizados proteicos y su amplia utilización, el presente estudio evaluó la calidad microbiológica de un hidrolizado de pescado obtenido en condiciones semejantes a la doméstica, sometido a diferentes tiempos de conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del hidrolizado

Se utilizó la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) para la obtención del hidrolizado, por presentar carne de alto valor proteico y biológico, bajo costo, poca variación de precios y gran disponibilidad comercial.

Fueron comprados en el comercio minorista de la ciudad de São Paulo, tres kg de filetes de tilapia congelada. Los filetes se encontraban firmes, limpios, sin vísceras ni líquidos.

La hidrólisis proteica se apoyó en el método de Pinto e Silva y Atzingen[11] y datos experimentales de Torrano y Menezes[12]. Los filetes de tilapia fueron sometidos a un tratamiento previo a la hidrólisis, con solución de vinagre al 4% (concentración de aproximadamente 0,16% de ácido acético) durante 10 minutos, para atenuar los atributos sensoriales (olor y sabor) característicos y excesivamente intensos de pescado. Luego fueron escurridos y homogeneizados con zumo de piña "in natura" en la misma proporción de peso (1:1); la mezcla fue colocada al fuego en baño maría por 30 minutos a una temperatura de 60°C y sometida a hervor por más de 5 minutos para la desactivación enzimática de la bromelina. El hidrolizado obtenido fue colado y transferido a envases de vidrio esterilizados y, en seguida, conservados en refrigeración y sellados herméticamente durante 24 horas hasta la formación de dos fases en las cuales el residuo solido fue descartado.

Para garantizar una mayor calidad a lo largo de todo el procedimiento de obtención del hidrolizado fueron considerados como requisitos: la procedencia y apariencia de las materias-primas, las buenas prácticas de manipulación y preparación, así como los cuidados con la higiene general de los ambientes de producción y conservación, de los utensilios y del personal manipulador.

El hidrolizado fue desarrollado en el Laboratorio de Técnica Dietética de la Facultad de Salud Pública de la Universidad de São Paulo bajo condiciones iguales a las domésticas.

La acidez del hidrolizado fue determinada por triplicado con potenciómetro DMPH-2 (pH 0.01 Digimed, São Paulo, Brasil) a 25,8°C. Los resultados son presentados utilizando la media aritmética y la desviación estándar. Tres muestras de hidrolizado fueron sometidas a análisis microbiológico según el tiempo de conservación: 1 – fresco, 2 – conservado en nevera a 4°C por 72 horas y 3 - conservado en nevera a 4°C por 1 semana. Cada muestra fue analizada tres veces.

Análisis microbiológico

Fue analizada la presencia de coliformes termotolerantes, *E. coli*, bacterias mesófilas, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y de mohos y levaduras, según los métodos descritos en el "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" de la Asociación Americana de Salud Pública[13] y en el "Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água"[14].

Coliformes termotolerantes

La determinación de coliformes termotolerantes se realizó utilizando la técnica del Número Más Probable (NMP) a 45ºC, con

diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} en agua peptonada al 0,1%. Fue realizado un pre enriquecimiento para coliformes en medio LST (Caldo Lauril sulfato) a 35ºC por 48 horas, considerando positivos los tubos que presentaron turbidez y formación de gas. Las muestras que presentaron turbidez y gas fueron transferidas para nuevos tubos con medio E.C. y nuevamente incubados por 48 horas a 45ºC. Después del periodo de incubación, los tubos que presentaron características positivas fueron utilizados para determinar la presencia de coliformes termotolerantes (NPM/g)[14].

Escherichia coli

La presencia de *E. coli* fue evaluada en las muestras que presentaron resultados positivos para coliformes termotolerantes. El aislamiento de la bacteria fue realizado en Agar Eosina Azul de Metileno (Levine EMB Agar); las colonias que presentaron morfología típica fueron nuevamente aisladas en Agar Lúria y confirmada su presencia por pruebas bioquímicas. Fue obtenida una estimativa de la densidad original de las bacterias expresando el resultado en Número Más Probable en 100g de muestra (NMP/100g)[14].

Recuento estándar de microorganismos mesófilos

Se realizó por medio del recuento estándar en placa (CPP), utilizando agua peptonada al 0,1% (AP 0,1%) (Bacto peptone Merck) utilizando el medio Plate Count para la siembra (PCA Merck). Las cajas de Petri fueron incubadas a 35ºC por 48 horas y después de este periodo fue realizado el recuento de las colonias.

Salmonella spp.

Para la detección de *Salmonella* spp., las muestras fueron pre enriquecidas en Caldo Lactosado (LB) e incubadas a 35ºC por 18-20 horas. Transcurrido este periodo, una alícuota de 1mL fue transferida para un segundo pre enriquecimiento en Caldo Tetrationato (TTB) y Caldo Selenito-Cistina (SCB) e incubados a 35ºC por 24 horas. Para el aislamiento y diferenciación fueron utilizados los medios selectivos Agar Sulfito de Bismuto (BSA) y Agar Salmonella-Shigella (SS). Las colonias presuntivas de *Salmonella* fueron caracterizadas fenotípicamente en medio IAL.

Staphylococcus aureus

La detección de *S. aureus* fue realizada por recuento de UFC/g de alimento, a partir de diluciones seriadas en agua peptonada 0,1%. Para el aislamiento de este microorganismo, se sembraron 100 µL de cada dilución en placas de Petri con medio agar Baird Parker por triplicado, e incubadas por 48 horas a 37ºC. Fue realizado el recuento de las colonias características y triadas por la coloración de Gram y las pruebas de Catalasa y DNAsa[15].

Recuento de Mohos y Levaduras

Fueron realizadas diluciones seriadas de las muestras hasta 10^{-8} en agua peptonada 0,1%. De cada dilución se sembraron por triplicado 100 µL por superficie en medio Agar Estándar con Cloranfenicol (100 mg/dL) y se incubó a 25ºC durante 5 días[14]. El recuento de colonias se realizó en placas de Petri, limitándose el crecimiento entre 30-300 colonias en cada placa. Fue reportada la media de las colonias observadas para cada dilución.

Se utilizaron los parámetros microbiológicos estipulados por la legislación Brasileña en la Resolución RDC nº 12 de 02/01/2001[16] de la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para la caracterización de los hidrolizados, conforme patrones de seguridad alimentaria.

Las muestras fueron analizadas en el Laboratório de Saúde Pública de la Facultad de Saúde Pública de la Universidade de São Paulo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hidrolizado fue preparado en condiciones iguales a las domésticas, incluyendo etapas críticas de control sanitario como: Descongelamiento bajo refrigeración, higiene de los manipuladores, limpieza del pescado, higienización de los equipos y utensilios (licuadora, tablas, ollas, tenedores, cuchillos). El producto resultante fue un líquido fluido, de color beige claro y olor poco intenso característico del pescado.

pH

La media de los valores de pH obtenidos del hidrolizado de tilapia a temperatura ambiente (25,8°C) fue de 5,04 ± 0,0, similar a la obtenida por Pinto e Silva et al.[17], en hidrolizados de carne bovina, de pollo y de pavo. Se verificó de esta forma que, independiente del tipo de carne el tratamiento conservó un pH bajo en los dos estudios.

De acuerdo con Pardi et al.[18], los ácidos orgánicos de cadena corta, como los ácidos acético, benzoico, cítrico, sórbico y láctico, son usualmente utilizados en alimentos, como agentes reductores de la contaminación microbiológica, debido a su baja solubilidad, toxicidad y sabor suave. Utilizados de forma amplia para conservación de carnes y sus productos, la acción protectora atribuida a ellos, es sobretodo debida a la caída del pH provocada en el medio en que son añadidos. Se cree, por lo tanto, que los ácidos orgánicos presentes en la piña, sobre todo los ácidos cítrico, málico y ascórbico, son los responsables por la disminución de los valores de pH observada en los hidrolizados y que este hecho puede contribuir para la manutención de su calidad microbiológica y aumento de su vida útil.

Análisis microbiológico

Como se puede observar en la Tabla 1, las pruebas realizadas en las muestras, resultaron negativas para todos los microorganismos estudiados, igualmente, no se detectaron alteraciones microbiológicas en el hidrolizado con una semana de conservación en nevera a 4°C.

El hidrolizado de tilapia analizado puede ser caracterizado, de acuerdo a los parámetros de la Resolución RDC nº 12 de 02/01/2001[16], como "producto de acuerdo con los patrones

Tabla. Análisis microbiológico de un hidrolizado de pescado según tiempo de conservación.

Microorganismo	Muestras								
	HF A	HF B	HF C	H72h A	H72h B	H72h C	H1S A	H1S B	H1S C
Coliformes termotolerantes NMP/g	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
E. coli NMP/g	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
S. aureus UFC/g*	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
Bactérias mesófilas UFC/g	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
Mohos y levaduras UFC/g	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
Salmonella sp/25g	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.

HF: Hidrolizado de tilapia fresco; H 72H: Hidrolizado de tilapia conservado en nevera a 4°C durante 72hs; H 1S: Hidrolizado de tilapia conservado en nevera a 4°C durante 1 semana; Aus.: Ausencia
*10^2UFC/g (sensibilidad del método).

legales vigentes" o "en condiciones sanitarias satisfactorias" considerando que los resultados analíticos han sido negativos para todos los microorganismos evaluados, es decir, "por debajo de los límites establecidos".

Teniendo en cuenta los resultados de las medias de pH, se estima que la acidez de los hidrolizados proteicos puede conferir protección adicional contra el crecimiento microbiológico, y de forma específica contra la proliferación bacteriana, si se considera dentro de un contexto higiénico-sanitario y de control efectivo. Según Silva Jr.[19], la mayoría de las bacterias se desarrolla en un pH casi neutro, entre 6,0 y 7,0, como por ejemplo, *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*, *Yersinia* y *Campylobacter*. Algunas de ellas pueden disminuir o hasta suspender su multiplicación en ambientes con pH entre 4,5 y 5,2. Por otro lado, los mohos y levaduras se desarrollan en un intervalo de pH más amplio, llegando a ser 1,5 el valor mínimo y 11,0 el valor máximo para la multiplicación de algunos de ellos, siendo generalmente ideales los ambientes con pH de 5,5.

El pH ácido de la piña podría estar proporcionando una protección adicional contra el crecimiento microbiano en el hidrolizado. La utilización de pequeñas concentraciones de ácido acético como parte del procesamiento, a pesar de ser para propósitos sensoriales, podría contribuir en la preservación del medio ácido protector contra el desarrollo de bacterias, más específicamente, *Salmonella*, *E. coli* y *S. aureus*. Como no se observaron alteraciones en la calidad sanitaria del hidrolizado, en los diferentes tiempos de conservación analizados, los resultados referentes a la vida útil pueden indicar que existe un efecto adicional del ácido acético al dificultar el desarrollo bacteriano.

El pescado y los productos derivados son propicios para el desarrollo de microorganismos (debido al alto valor biológico y elevada actividad acuosa del pescado) siendo vulnerables a la contaminación por patógenos[20]. Por tal razón, se hace necesario un riguroso control higiénico-sanitario durante todas las etapas del procesamiento del hidrolizado de tilapia. La eliminación y/o disminución de riesgos, en la selección de la materia prima y su adecuado tratamiento, el control del binomio tiempo/temperatura para cocción, el hervor y la adecuada conservación, así como, los cuidados de higiene personal, del local de trabajo y de los utensilios y envases utilizados, son determinantes para que no haya peligro de contaminación.

La presencia de hongos y levaduras en alimentos puede indicar contaminación proveniente de procedimientos realizados en condiciones higiénicas y sanitarias inadecuadas[15,19]. En la Tabla, se observa la ausencia de bacterias mesófilas, mohos y levaduras, lo que indica que los cuidados en el procesamiento y almacenamiento de los hidrolizados fueron satisfactorios.

En lo que se refiere a la investigación de coliformes termotolerantes, *E. coli*, *Salmonella* y *S.aureus*, los resultados estuvieron de acuerdo a los estándares nacionales de calidad microbiológica reflejando la condición general de higiene durante el proceso de producción de alimentos[16]. Debido a que *E.coli* es una bacteria indicativa de contaminación fecal, se hace necesario determinar su incidencia en el alimento[21], teniendo en cuenta el peligro relacionado a cuadros de toxi-infección alimentaria. Algunos serotipos de *E.coli* son causantes de gastreoenteritis, principalmente en niños, adultos mayores y/o convalecientes, con tiempo de incubación de 6 a 36 horas y duración de dos dias [15].

Los cuidados en cada etapa de preparación, así como la higiene del manipulador, son aspectos que se relacionan con la presencia de *Salmonella* spp, causadora de infecciones en humanos. Tales infecciones pueden ser prevenidas o minimizadas por medio de cuidados en el procesamiento de alimentos, desde su adquisición hasta su distribución para el consumo final[22, 23]. Como se observa en la Tabla, todos estos cuidados fueron seguidos cuidadosamente.

Con relación a la bacteria *S. aureus*, la contaminación de los alimentos ocurre comúnmente pos-manipulación, indicativo de malas prácticas de higiene personal y de manoseo[21]. A pesar de la cocción ser capaz de destruir esta bacteria, si existe la presencia de toxinas en el alimento, éstas no serán totalmente inactivadas por métodos de cocción normal o pasteurización, y otros métodos de tratamiento térmico corrientes[15]. En el preparo del hidrolizado de pescado, los cuidados en la selección de ingredientes, higiene del manipulador y el control de temperatura de cocción, baño de María y hervor y posterior refrigeración, contribuyeron para la obtención de un producto que cumple con la legislación sanitaria (Tabla).

Otros estudios con hidrolizado de carnes obtenidos de forma casera, confirmaron que, desde que las normas higiénicas-sanitarias sean respetadas, son obtenidos productos que cumplen con

la legislación vigente. Penterich[24] obtuvo un producto destinado a la alimentación infantil, con hidrolizado de carne, con el mismo estándar microbiológico del presente estudio.

De esta forma, se observó que es viable la preparación de hidrolizados, en condiciones domésticas y que siguiendo la metodología y los padrones de cuidados en su elaboración, puede resultar un producto apto para el consumo con calidad microbiológica dentro de los límites permitidos.

CONCLUSIONES

A técnica de preparo en nivel doméstico se mostró eficiente pues no se encontró evidencia del crecimiento de ninguno de los microorganismos, mencionados en la literatura, en las muestras evaluadas. El hidrolizado de tilapia con hasta una semana de conservación en refrigeración a 4°C, puede ser considerado apto para consumo de acuerdo con los estándares microbiológicos.

REFERENCES

1. Shahidi F, Botta JR. Seafoods: chemistry, processing technology, and quality. London: Blackie; 1994.
2. Nankervis L, Southgate PC. Enzyme and acid treatment of fish meal for incorporation into formulated microbound diets for barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. Aquac Nutr. 2009;15(2):135-43. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00576.x
3. Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Food Chem. 2009;115(1):238-42. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013
4. Windsor M, Barlow S. Introducción a los subproductos de pesquería. Zaragoza: Acríbia; 1984.
5. Ogawa M, Maia EL. Manual de pesca. São Paulo: Varela; 1999.
6. Sgarbiere VC. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela; 1996.
7. Nesse KO, Nagalakshmi AP, Marimuthu P, Singh M. Efficacy of a fish protein hydrolysate in malnourished children. Indian J Clin Biochem. 2011;26(4):360-5. http://dx.doi.org/10.1007/s12291-011-0145-z
8. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Shahidi, F. Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: antioxidant activity and its potential in model systems. Food Chem. 2012;135(3):1118-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.080
9. Yin H, Pu J, Wan Y, Xiang B, Bechtel PJ, Sathivel SJ. Rheological and functional properties of catfish skin protein hydrolysates. J Food Sci. 2010;75(11):E11-7. http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01385.x
10. Wergedahl H,Gudbrandsen OA, Røst TH, Berge RK. Combination of fish oil and fish protein hydrolysate reduces the plasma cholesterol level with a concurrent increase in hepatic cholesterol level in high-fat-fed Wistar rats. Nutrition. 2009;25(1):98-104. http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2008.07.005
11. Silva MEMP, Atzingen MCV. Análise sensorial de preparações com hidrolisados de carne. Ciênc Tecnol Aliment. 2010;30(2):349-53. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000200010
12. Torrano ADM, Menezes HC. Caracterização do cação salgado como matéria-prima para processamento. Col Instit Tecnol Aliment. 1977;8:199-215.
13. Dowes FP, Ito H. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC: American Public Health Association; 2001.
14. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo: Varela; 2010.
15. Siqueira RS. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília, DF: Embrapa; 1995.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária — ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União; 10 jan 2001.
17. Silva MEMP, Mazzilli RN, Cusin FJ. Composition of hydrolysates from meat. J Food Comp Anal. 1999;12:219-25.
18. Pardi MC, Santos IF, Souza ER, Pardi HS. Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da carne e subprodutos. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 1994. vol 2.
19. Silva Junior, EA. Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos. São Paulo: Varela; 2005.
20. Huss HH, Reilly A, Embarek PKB. Prevention and control of hazards in seafood. Food Control. 2000;11(2):149-56. http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00087-0
21. Jay JM. Modern food microbiology. 6. ed. Gaitherburg: Aspen; 2000.
22. Oscar TP. A quantitative risk assessment model for Salmonella and whole chickens. Int J of Food Microbiology. 2004;93:231-47.
23. Cliver DO, Rieman HP. Foodborne diseases. 2. ed. Londres: Academic Press; 2002.
24. Penterich VRA. Desenvolvimento de preparações com hidrolisado de frango para crianças de 0 a 12 meses com reações adversas aos leites [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2006.

Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.