

Raquel Linhares Bello de Araújo

**OBTENÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DA
CASCA DE ABACAXI E SUA UTILIZAÇÃO NO
PREPARO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE
FARINHA DE TRIGO COM TEOR REDUZIDO DE
FENILALANINA**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**

Folha de Aprovação

[A ser substituída pela versão definitiva após a defesa, no momento da reprodução e encadernação. Será fornecida pela Secretaria do Programa]

Dedico este trabalho às minhas filhas, Ana Raquel
e Isabella.

E ao meu marido, Otaviano Jr.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo DOM da VIDA, e pela oportunidade de vivê-la, plenamente.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram a conquistar etapas tão importantes na minha vida. Mãe, com uma saudosa lembrança, só tenho a agradecer pela minha formação pessoal e presença constante na minha infância, valor inestimável. Sei que hoje, estaria orgulhosa de sua filha! Pai, você, com toda sua calma e sapiência, me ajudou a enxergar melhor os dois lados de todos os fatos, dando equilíbrio e harmonia à minha vida. Obrigada por tudo!

Aos meus amores: Ana Raquel e Isabella. Cada sorriso, cada gesto de afeto, e cada chamado de “mamãe” me fazia querer ser melhor e continuar lutando pelos meus sonhos. Sei que foi uma tarefa árdua, aturar uma mãe tão atarefada. Quantas vezes, por questões de estudos e trabalho, ficamos longe, não brincamos ou dormimos juntas? Mesmo assim, souberam esperar e hoje dedico esta vitória à vocês! Nada teria sentido se vocês não estivessem aqui!

Ao meu marido Otaviano Jr., pelo apoio e compreensão, por acreditar em mim e se esforçar a fim de facilitar a realização deste sonho, sendo muitas vezes “pai e mãe”. Obrigada por aceitar compartilhar os espinhos e as glórias desta nossa caminhada.

À minha irmã, amiga e confidente Luciana. Pelas palavras amigas, preocupação constante, pela atuação de “Dindinha”, diminuindo minha ausência junto às minhas filhas. Obrigada pela grande ajuda de modo a facilitar a realização deste trabalho.

À todos os meus familiares e amigos que me incentivaram e torceram pelo meu sucesso, em especial, a Ana Luíza e Otaviano, pela ajuda constante e dedicação às minhas filhas, e minha madrinha Maria Ângela, por acreditar em mim, sempre.

À Prof. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre, não apenas uma orientadora, mas uma perfeita educadora. Sua disciplina, dedicação e amor à pesquisa nos estimula a sermos profissionais plenos e realizados. Agradeço a confiança, a paciência e o respeito a mim oferecidos. Obrigado pelo incentivo, pelas palavras de apoio e pela ajuda nos momentos difíceis.

Aos professores membros da banca examinadora: Profa. Dra. Lúcia Peret, Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória, Profa. Dra. Mônica Ribeiro Pirozi e Dra. Scheilla Carvalho Vitorino, pelo profissionalismo e pelas contribuições valiosas, de forma a enriquecer este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Virgílio, agradeço a harmoniosa convivência no departamento de alimentos da FAFAR/UFMG, e ainda, pela serenidade, respeito profissional e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Amintas Figueiredo, pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Santoro, por disponibilizar o Laboratório de Físico-Química de Proteínas do ICB-UFMG, para a realização de algumas etapas deste trabalho. Agradeço também seu auxílio na interpretação dos resultados.

Ao técnico do ICB Jamil, pela ajuda constante na realização das análises no Laboratório de Físico-Química de Proteínas do ICB-UFMG. Agradeço também ao Dr. André Bélico e à futura doutora Kádima Teixeira pelos ensinamentos transmitidos.

Ao CETEC e à profa. Rosa Junqueira, pelo empréstimo de equipamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM – na pessoa do Dr. Dirceu Deocleciano, diretor da Faculdade de Ciências da Saúde e Presidente da Fundação Educacional de Patos de Minas-MG, pela liberação de minhas atividades docentes para a finalização deste trabalho. Agradeço também a confiança e respeito dedicados durante os sete anos de trabalho nesta instituição.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, que participaram ativamente da minha formação profissional e incentivaram a busca contínua do conhecimento.

Às funcionárias do CPGCA, Úrsula e Marilene, pela conversa amiga, apoio e auxílio em todas os assuntos administrativos.

Ao funcionário do laboratório de Bromatologia Marcos Costa Lage, pela alegria e boa vontade sempre!

Ao grupo de amigos do Laboratório de Bromatologia/Pesquisa. Mesmo quando eu estava longe, sentia a presença e sabia do carinho de todos:

À grande amiga Maitê Costa Silva, profissional competente e dedicada, com sua simplicidade e alegria, torcendo para o meu sucesso. Obrigada!

Agradeço de coração a oportunidade de ter conhecido pessoas tão especiais, como Camila Salles Ramos, Lydiane Amorim e Letícia Lima. Vocês realmente demonstraram doação, compromisso com o trabalho e amizade durante todo o período que passamos juntas. Sem vocês, este trabalho não teria se realizado!

À Vivi, pessoa única, simples, verdadeira e companheira. Você faz diferença na vida das pessoas que estão ao seu redor. O seu silêncio fala mais de amizade e solidariedade do que qualquer palavra. Serei grata por toda minha vida por tudo que representou para mim.

À todos que através dos estágios, me ajudaram muito na parte prática do trabalho, em especial à Karen Valente, Gabriella Maria Miranda e Flávia Lana.

Ao Mauro, gênio da computação, sempre presente e nunca negando ajuda, pelos conhecimentos para a publicação dos artigos e na formatação da tese, meu eterno agradecimento

À todos amigos que conheci no laboratório, em especial Wendel, Carlos, Mariana, Malena, Priscila, Nicole, Paula, Débora, pela ajuda, palavra amiga e sorriso junto ao “bom dia”.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

À todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

Se deixei de citar algum nome aqui, peço desculpas pois neste momento as palavras se esvaem e a emoção toma conta de mim. Mas a todos que sabem do papel importante na minha vida, deixo aqui o meu profundo agradecimento!

Quem tem “por que” e “por quem” viver é capaz de suportar qualquer “como”.

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	18
RESUMO	19
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	27
OBJETIVO GERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
REVISÃO DE LITERATURA	29
1 FENILCETONÚRIA	29
1.1 Considerações gerais	29
1.2 Classificação	31
1.3 Diagnóstico	32
1.4 Tratamento	33
2 FARINHA DE TRIGO	36
2.1 O trigo	36
2.1.1 Considerações gerais	36
2.1.2 Estrutura do grão de trigo	39
2.2 A farinha de trigo	40
2.2.1 Composição química da farinha de trigo	41
2.2.2 Proteínas da farinha de trigo	43
3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	45
3.1 Generalidades	45
3.2 O abacaxizeiro e o abacaxi	47
3.2.1 Resíduos do abacaxi	49
4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	50
4.1 Linearidade	51
4.2 Efeito de matriz	52
4.3 Seletividade	53
4.4 Exatidão e precisão	54
4.5 Limites de detecção e quantificação	56
5 REDUÇÃO DO TEOR DE FENILALANINA	57
5.1 Extração protéica	58
5.2 Hidrólise protéica	61
5.2.1 Fatores interferentes	63
5.2.2 Importância	64
5.2.3 Proteases	65
5.2.3.1 Bromelina	66
5.3 Remoção de fenilalanina	68
5.3.1 Métodos de remoção da fenilalanina	68
5.3.2 Métodos de determinação do teor de fenilalanina	70
5.3.2.1 Espectrofotometria derivada segunda	70
6 CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA)	76
TRABALHO EXPERIMENTAL	91
APRESENTAÇÃO	91

CAPÍTULO I

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS DA CASCA DE ABACAXI.....	94
RESUMO.....	94
1 INTRODUÇÃO	95
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	96
2.1 MATERIAL	96
2.2 MÉTODOS.....	97
2.2.1 Preparo do extrato enzimático da casca de abacaxi	97
2.2.2 Precipitação protéica	97
2.2.2.1 Precipitação com sulfato de amônio	97
2.2.2.2 Precipitação isoelétrica.....	98
2.2.2.3 Precipitação com etanol.....	98
2.2.3 Determinação do teor de proteínas.....	98
2.2.4 Determinação da atividade específica dos extratos enzimáticos da casca de abacaxi	98
2.2.5 Avaliação do efeito do pH e da temperatura na atividade específica e na estabilidade da enzima... ..	100
2.2.6 Análise estatística	101
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTO E PRECIPITADOS	101
3.2 EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTO E PRECIPITADO	103
3.3 EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTO E PRECIPITADO.....	107
4 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

CAPÍTULO II

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO QUANTITATIVO PARA DETERMINAÇÃO DE FENILALANINA EM FARINHA DE TRIGO POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA SEGUNDA	114
RESUMO.....	114
1 INTRODUÇÃO	116
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	118
2.1 MATERIAL	118
2.1.1 Amostras	118
2.1.2 Reagentes e soluções	118
2.1.2.1 Soluções estoque de de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano a 0,001 mol/L	118
2.1.2.2. Soluções da curva de calibração de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano	119
2.1.2.3 Solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0	119
2.1.2.4 Solução de ácido clorídrico a 5,7 mol/L.....	119
2.1.2.5 Solução de hidróxido de sódio a 3 mol/L	119
2.2 MÉTODOS.....	120
2.2.1 Hidrólise ácida	120
2.2.2 Determinação espectrofotométrica da L-fenilalanina	120
2.3 PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO	121
2.3.1 Linearidade.....	121

2.3.2 Efeitos de matriz	122
2.3.3 Seletividade.....	122
2.3.4 Exatidão, precisão e limites.....	123
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.1 LINEARIDADE	124
3.2 EFEITOS DE MATRIZ.....	128
3.3 SELETIVIDADE.....	131
3.4 EXATIDÃO, PRECISÃO E LIMITES	133
4 CONCLUSÃO.....	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

CAPÍTULO III

EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA FARINHA DE TRIGO.....	139
RESUMO.....	139
1 INTRODUÇÃO	140
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	142
2.1 MATERIAL	142
2.2 MÉTODOS.....	142
2.2.1 Determinação da composição química da farinha de trigo.....	142
2.2.2 Extração enzimática das proteínas da farinha de trigo.....	143
2.2.2.1 Avaliação do efeito da temperatura	143
2.2.2.2 Avaliação do efeito do tempo de extração	144
2.2.2.3 Avaliação do efeito do tratamento físico.....	144
2.2.2.4 Avaliação do efeito da relação enzima:substrato e da concentração da matéria-prima.....	144
2.2.3 Determinação do rendimento da extração protéica	145
2.2.4 Análise estatística	145
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA	145
3.2 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS.....	147
3.3 EFEITO DOS PARÂMETROS NA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS	149
3.3.1 Temperatura de reação	150
3.3.2 Tempo de reação	151
3.3.3 Tratamento físico da amostra.....	152
3.3.4 Relação enzima:substrato e concentração da matéria-prima	152
4 CONCLUSÃO.....	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

CAPÍTULO IV

OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE FARINHA DE TRIGO COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA.....	157
RESUMO.....	157
1 INTRODUÇÃO	158
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	160
2.1 MATERIAL	160
2.2 MÉTODOS.....	161
2.2.1 Extração das proteínas	161
2.2.2 Preparo dos hidrolisados protéicos.	161
2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos.....	162
2.2.4 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina.....	164

2.2.5 Efeito de alguns parâmetros hidrolíticos sobre a remoção de fenilalanina.	164
2.2.6 Análise estatística	165
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	165
3.1 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA	165
3.2 EFEITO DE PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA	168
3.2.1 Tipo de enzima e ação enzimática isolada	168
3.2.2 Associações enzimáticas: simultânea x sucessiva.....	169
3.2.3 Ordem de adição das enzimas.....	170
3.2.4 Associação enzimática X Ação isolada das enzimas.....	171
3.2.5 Temperatura da reação	172
3.2.6 Tempo de reação	173
3.2.7 pH.....	174
3.2.8 Relação enzima:substrato	175
3.2.8.1 Relação E:S do extrato bruto da casca do abacaxi	176
3.2.8.2 Relação E:S da pancreatina.....	177
3.2.9 Tratamento físico do extrato protéico.....	178
3.2.10 Relação proteína: carvão ativado.....	179
4 CONCLUSÃO.....	181
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

CAPÍTULO V

PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DA FARINHA DE TRIGO..	184
RESUMO.....	184
1 INTRODUÇÃO	185
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	187
2.1 MATERIAL	187
2.2 MÉTODOS.....	187
2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo	187
2.2.2 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos.....	189
2.2.3 Análise estatística	189
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	190
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	190
3.1.1 Perfil peptídico.....	190
3.1.2 Teor de peptídeos e de aminoácidos livres.....	193
3.2 EFEITO DE PARÂMETROS SOBRE O PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS	194
3.2.1 Ordem de adição de enzimas	195
3.2.2 Temperatura de reação	195
3.2.3 Relação E:S.....	196
3.2.4 Tratamento físico da amostra.....	197
4 CONCLUSÃO.....	198
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	198

CAPÍTULO VI

PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DA FARINHA DE TRIGO, APÓS A REMOÇÃO DE FENILALANINA.....	202
RESUMO.....	202
1 INTRODUÇÃO	203
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	205
2.1 MATERIAL	205
2.2 MÉTODOS.....	206

2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo	206
2.2.2 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos	206
2.2.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos.....	207
2.2.4 Análise Estatística	208
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	208
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	208
3.1.1 Perfil peptídico.....	208
3.1.2 Teor de peptídeos e de aminoácidos livres.....	211
3.2 EFEITO DE PARÂMETROS SOBRE O PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS	213
3.2.1 Ordem de adição das enzimas	213
3.2.2 Temperatura de reação	214
3.2.3 Efeito da relação E:S	215
3.2.4 Tratamento físico da amostra.....	215
4 CONCLUSÃO.....	216
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	216

CAPÍTULO VII

EFEITO DA REMOÇÃO DE FENILALANINA SOBRE O PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DA FARINHA DE TRIGO.....	220
RESUMO	220
1 INTRODUÇÃO	221
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	223
2.1 MATERIAL	223
2.2 MÉTODOS.....	224
2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo	224
2.2.2 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos	224
2.2.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos	225
2.2.4 Análise Estatística	226
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	226
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	226
3.1.1 Perfil peptídico.....	226
3.1.2 Teores de peptídeos e de aminoácidos livres.....	229
3.1.3 Efeito da remoção de Phe sobre o perfil peptídico	231
4 CONCLUSÃO.....	232
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	232
CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	236

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1: Classificação das diferentes formas de hiperfenilalaninemias de acordo com o nível sanguíneo de fenilalanina,apresentado no teste de sobrecarga.....	32
Tabela 2: Composição química da farinha de trigo tipo I	42
Tabela 3: Conteúdo de proteína e de aminoácidos essenciais em alguns cereais.....	43
Tabela 4: Produção mundial de abacaxi em toneladas (t) e toneladas por hectare (t/ha).....	48
Tabela 5: Valores de concentrações e de recuperação, média e desvio padrão relativo aceitáveis para resultados quantitativos em análise de analitos traços.....	56

Capítulo 1

Tabela I.1: Caracterização dos extratos enzimáticos da casca de abacaxi.....	102
--	-----

Capítulo 2

Tabela II.1: Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio da linearidade, para curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1mol/L pH 7,0 na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL.....	127
Tabela II.2: Avaliação da linearidade das curvas de calibração de Phe usual e em matriz, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, nos experimentos de efeitos de matriz	130
Tabela II.3: Comparação entre as interseções e inclinações das curvas usual e em matriz para Phe	131
Tabela II.4: Verificação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos para análise de variância.....	134

Capítulo 3

Tabela III.1: Composição química da farinha de trigo tipo I.....	146
Tabela III.2: Rendimento da extração enzimática das proteínas da farinha de trigo ...	148

Capítulo 4

Tabela IV.1: Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo.....	163
Tabela IV.2: Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo	166

Capítulo 5

Tabela V.1: Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo.....	188
Tabela V.2: Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do extrato protéico de farinha de trigo	194

Capítulo 6

Tabela VI.1: Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo.....	207
Tabela VI.2: Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos	212

Capítulo 7

Tabela VII.1: Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo.....	225
Tabela VII.2: Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos	230

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1: Via de hidroxilação da fenilalanina	30
Figura 2: Corte longitudinal do grão de trigo.....	39

Trabalho experimental

Figura 1: Fluxograma da parte experimental desenvolvida nesta trabalho.....	93
---	----

Capítulo 1

Figura I.1: Efeito do pH na atividade específica do extrato enzimático bruto e precipitado da casca de abacaxi	104
Figura I.2: Efeito da temperatura na atividade específica dos extratos enzimáticos bruto e precipitado da casca de abacaxi.....	106
Figura I.3: Efeito do pH na estabilidade dos extratos enzimáticos bruto e precipitado da casca do abacaxi.....	107
Figura I.4: Efeito da temperatura na estabilidade dos extratos enzimáticos bruto e precipitado da casca do abacaxi.	109

Capítulo 2

Figura II.1 : Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1mol/L pH 7,0 na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com indicação dos respectivos <i>outliers</i> diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.	124
Figura II.2: Gráfico de probabilidade normal da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1mol/L pH 7,0 na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL.....	125
Figura II.3: Representação da homogeneidade variâncias da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio 0,1mol/L pH 7,0 na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL pelo teste de Levene modificado.....	126

Figura II.4: Gráfico de Durbin-Watson da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1mol/L pH 7,0 na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL.....126

Figura II.5: Curva de calibração da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1mol/L pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com respectiva equação e coeficiente de determinação.....127

Figura II.6: Curvas de calibração de Phe usual e em matriz, na faixa de 0,010mg/mL a 0,035mg/mL, com respectivas equações e coeficientes de determinação.....128

Figura II.7: Espectros de derivada segunda obtidos para as soluções de 0,035 mg/mL utilizadas no estudo de seletividade 132

Figura II.8: Porcentagens de recuperação individuais obtidas para as doze replicatas de amostra (contendo 354 mg/100g de Phe em farinha de trigo), analisadas em quatro ensaios, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial 133

Capítulo 4

Figura IV.1: Tipo de enzima e ação enzimática isolada.....168

Figura IV.2: Ação enzimática simultânea.....170

Figura IV.3: Ordem de adição das enzimas.....171

Figura IV.4: Temperatura de reação.....172

Figura IV.5: Tempo de reação. 174

Figura IV.6: Efeito do pH. 175

Figura IV.7: Efeito da relação E:S do EB.....176

Figura IV.8: Efeito da relação E:S da pancreatina.....177

Figura IV.9: Efeito do tratamento físico do extrato protéico. 179

Figura IV.10: Relação proteína: carvão ativado.....180

Capítulo 5

Figura V.1: Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm.....190

Capítulo 6

Figura VI.1: Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm.....209

Capítulo 7

Figura VII.1: Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm.....227

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Área Corrigida da Fração
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BH₄	Tetrahidrobiopterina
CA	Carvão ativado
E:S	Relação enzima e substrato
EB	Extrato enzimático bruto da casca de abacaxi
EDS	Espectrofotometria derivada segunda
FAO	Food and Agriculture Organization
HILIC	Cromatografia líquida de alta eficiência de interação hidrofílica
HMW	Alta massa molecular
HPA	Hiperfenilalaninemia
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LDE	Limite de detecção do equipamento
LDM	Limite de detecção do método
LMW	Baixa massa molecular
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
PAH	Fenilalanina hidroxilase
Phe	Fenilalanina
PHEA	Poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica
PKU	Fenilcetonúria
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
REP	Rendimento de extração protéica
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio
SE-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Ultra-violeta

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é uma desordem metabólica congênita na qual os indivíduos não tratados, ainda nos primeiros meses de vida, desenvolvem retardo mental irreversível, sendo que a utilização da farinha de trigo na alimentação destes pacientes não é permitida. Neste trabalho, foram desenvolvidas algumas etapas do processo de obtenção de uma farinha de trigo com teor reduzido de fenilalanina (Phe), para ser incorporada na alimentação dos fenilcetonúricos. Inicialmente, foi feito um estudo sobre a obtenção, precipitação e caracterização de extratos enzimáticos de casca de abacaxi, tendo sido determinados seus teores de proteína, suas atividades proteolítica e específica, bem como avaliado o efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica e estabilidade destes extratos. Em seguida, as proteínas da farinha de trigo foram extraídas enzimaticamente, testando-se as variáveis tempo, temperatura, tratamento físico da amostra, relação enzima:substrato (E:S) e concentração inicial de matéria-prima. O extrato protéico foi, posteriormente, hidrolisado pela ação, tanto de proteases comerciais quanto pelos extratos enzimáticos obtidos no laboratório do presente trabalho, avaliando-se o efeito de alguns parâmetros hidrolíticos, tais como o tipo de enzima, a associação e a ordem de adição das enzimas, o tempo, a temperatura e o pH da reação, o uso do tratamento físico do extrato protéico e a relação enzima:substrato (ES). A associação de três diferentes tipos de carvão ativado (CA) foi empregada como meio adsorvente para remover a Phe, variando-se a relação proteína:CA. A eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor de Phe livre na farinha de trigo e em seus hidrolisados, após tratamento com CA. Para a utilização deste método, fez-se, previamente, a sua validação. Finalmente, foi realizada a caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo, antes e após a remoção de Phe pelo CA. Os resultados obtidos indicaram que, para o extrato enzimático bruto da casca do abacaxi, os valores ótimos foram: pH 6,0, temperatura de 70 °C e tempo de máxima ação proteolítica de 1h 30 min. Dentre as três metodologias empregadas para a precipitação do extrato protéico, o uso do etanol foi o mais vantajoso, dando origem à um extrato com maior atividade proteolítica e valores ótimos de pH de 7,0, temperatura de 70 °C, e tempo de máxima ação de 1h 30min. A

metodologia de extração protéica, que levou ao maior rendimento (89 %), foi a que empregou a concentração inicial de matéria-prima de 1:3 (p/v), com agitador ultraturrax a 1800 x g, a relação E:S de 10:100, a 40 °C, durante 2h. Os parâmetros de desempenho estudados na validação indicaram a adequação da EDS para o monitoramento e controle dos teores de Phe em farinha de trigo. A condição que levou ao menor teor final de Phe (503,29 mg/100g) foi a que empregou a associação sucessiva do extrato bruto (EB) (E:S 10:100, 1h 30min) com a pancreatina (E:S 3:100, 3h 30min), no pH 7,0, a 50 °C, tendo atingido 68 % de remoção de Phe. Acrescenta-se, ainda, que o melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, para as duas condições testadas, ou seja, antes e após a remoção de Phe, foi encontrado para o mesmo hidrolisado, obtido quando a pancreatina (E:S = 4:100) atuou primeiro por 3h 30min, seguida da ação do EB (E:S =10:100) durante 1h 30min, nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima, apresentando valores médios de 13,04 % de di-tripeptídeos, 39,4 % de aminoácidos livres e 12,5 % para os grandes peptídeos.

Palavras-chave: farinha de trigo, aproveitamento de resíduo, extração protéica, hidrólise protéica, remoção de fenilalanina, perfil peptídico.

ABSTRACT

PREPARATION OF AN ENZYMATIC EXTRACT FROM PINEAPPLE PEEL AND ITS USE FOR OBTAINING WHEAT FLOUR PROTEIN HYDROLYSATES WITH LOW-PHENYLALANINE CONTENT AND NUTRITIONALLY APPROPRIATE PEPTIDE PROFILE.

Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disease in which the untreated individuals can show irreversible mental retardation, and the use of wheat flour by phenylketonuric's patients it's not allowed. In this work, some steps were developed for obtaining wheat flour with low-phenylalanine (Phe) content, to be introduced in phenylketonuric's diet. Initially, a study was performed on the preparation and characterization of enzymatic extracts from pineapple peel, in which their protein contents and proteolytic activities were assessed as well as the effect of pH and temperature on the proteolytic activity and stability was evaluated. After, the wheat flour proteins were enzymatically extracted and some parameters were tested, such as time, temperature, physical treatment of the sample, enzyme:substrate ratio (E:S) and initial concentration of raw matter. Then, the protein extract was hydrolyzed by the action commercial enzymes and of enzymatic extracts obtained in the laboratory of the present study. Some enzymatic parameters were evaluated, such as type of enzyme, type of enzymatic association and order of enzyme action, time, temperature, pH, physical treatment of protein extract and enzyme:substrate ratio (E:S). The association of three kinds of activated carbon (AC) was used as adsorbent, varying the protein:AC ratio. The efficiency of Phe removal was evaluated by second derivative spectrophotometry measuring the Phe content in wheat flour and in its protein hydrolysates after AC treatment. To use this method was developed a procedure for single-laboratory validation. Finally, the characterization of the peptide profile of wheat flour protein hydrolysates was studied, before and after Phe removal by AC. The results showed that for the crude enzymatic extract (CE) of pineapple peel the optima values found for pH, temperature and time, corresponding to the maxima values of specific activity were 6.0, 70 °C and 1 h 30 min. Among the three methods used for precipitation of the crude enzymatic extract, the use of ethanol was the most advantageous, leading to an extract with the highest specific activity and the optima values were: for pH 7.0; for temperature,

70 ° C; and the time of maximum proteolytic activity was 1h 30min. The method used for protein extraction that produced the highest yield (88.53 %) was that using the initial concentration of raw matter of 1:3 (w/v), treatment with ultra-turrax, E:S of 10:100, at 40 °C, during 2h. The parameters studied at single-laboratory validation showed fitness for the respective purpose, i.e, monitoring and controlling phenylalanine content in wheat flour. The condition that led to the smallest Phe content (503.29 mg/100g), was the one using successive association of CE (E: S 10:100, 1h 30 min) with pancreatin (E:S 4:100, 3h 30 min) pH 7.0, at 50 °C, reaching 67.64% of Phe removal. Moreover, the best peptide profile, from the nutritional point of view, for the two conditions, ie, before and after Phe removal, was found for the same hydrolyzate, obtained by using firstly pancreatin (E:S= 4:100) for 3h 30min followed by CE (E:S =10:100) for 1h 30min, at optima conditions of pH and temperature of each enzyme, reaching average values of 13.04 % of di-tripeptides, 39.4 % of free amino acids and 12.5 % of large peptides.

Key words: wheat flour, use of agroindustrial waste, protein extraction, protein hydrolysis, Phe removal, peptide profile.

INTRODUÇÃO

Pacientes com fenilcetonúria (PKU) não são capazes de converter a fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr), devido a uma deficiência ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase no fígado, com consequente aumento da produção de metabólitos, tais como, fenilactato, piruvato, ortohidroxi-fenilacetato e feniletilamina. O acúmulo desses metabólitos anormais e de Phe no plasma pode promover o aparecimento de retardo mental, progressivo e irreversível (RAMASWAMI & SMITH, 1997; STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000). O tratamento da PKU é, basicamente, dietético e consiste na redução dos níveis plasmáticos elevados de Phe para concentrações consideradas não lesivas ao sistema nervoso, devendo ser esta dieta iniciada até o primeiro mês de vida do recém-nascido e mantida por toda a vida (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS et al., 1993; SHIMAMURA et al., 1999; STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000).

No Brasil, são utilizadas, para o tratamento da PKU, misturas de aminoácidos livres, importadas e de elevado custo. Estes fatores, associados à baixa disponibilidade de alimentos com teores reduzidos de Phe, tornam a dieta de fenilcetonúricos monótona, pouco atrativa e de difícil adesão (MIRA & MARQUEZ, 2000). Como alternativa, pode-se incorporar ao programa alimentar dos fenilcetonúricos, alimentos cuja fenilalanina foi, total ou parcialmente, removida (KANUFRE et al., 2001; CABRERA-PADILLA et al., 2009).

Os cereais são alimentos amplamente consumidos, e, dentre eles, o trigo é o que possui a maior aceitação (KAJISHIMA et al., 2003). A farinha de trigo ocupa um lugar relevante na alimentação do brasileiro, com grande utilização no preparo de alimentos, tanto em nível doméstico como industrial. Entretanto, sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos não é permitida, e depende do nível de Phe no soro destes pacientes, obedecendo-se os limites de Phe estipulados na legislação (BRASIL, 2002).

Este fato demonstra a importância do desenvolvimento de uma farinha de trigo com teor reduzido de Phe. A primeira etapa neste processo envolve a extração protéica, que é feita enzimaticamente. Faz-se, depois, a hidrólise protéica, empregando-se diferentes enzimas proteolíticas e condições de reação (SILVESTRE et al., 2009). Finalmente, considerando-se que as proteínas constituintes da farinha de trigo, ao serem

submetidas à ação de uma protease, promovem a exposição da Phe, realiza-se sua remoção por um meio adsorvente (OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

Todas estas etapas foram realizadas, anteriormente, no mesmo laboratório do presente trabalho, para o preparo de diversos alimentos, visando sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos. Dentre estes alimentos, encontram-se o leite em pó (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), o soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), o arroz em grãos (LOPES et al., 2008), o fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), a farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009), o feijão (LOPES Jr., 2008), o leite integral (SOUZA et al., 2009) e o concentrado protéico de soro de leite (SILVA, 2009).

Com relação à etapa da extração protéica, o método químico é o mais comumente utilizado, porém, este apresenta inúmeros inconvenientes, tais como a desnaturação protéica, formação de compostos tóxicos (lisinoalanina), o escurecimento da amostra e a extração de compostos não-protéicos (WANG et al., 1999; MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, 2000; PRATA & SGARBIERI, 2005). Uma alternativa a estes problemas, consiste na utilização de enzimas para extrair as proteínas dos cereais, a partir de seus produtos como a farinha e o farelo (EUBER et al., 1991; TANG et al., 2002).

Na etapa de hidrólise protéica, empregam-se normalmente, proteases comerciais, que são produtos importados e, portanto, apresentam elevado custo. Devido a isto, tem-se observado um interesse crescente por processos que envolvam o aproveitamento de resíduos agroindustriais com a finalidade de se obter extratos enzimáticos (MARIN et al., 2002; ALEXANDRINO et al., 2007; LIMA et al., 2007). Neste trabalho, a casca de abacaxi foi utilizada como resíduo agroindustrial, pelo fato do Brasil ser um grande produtor de abacaxi, ocupando a primeira posição na América do Sul (CÉSAR, 2005).

A utilização da casca de abacaxi como fonte de proteases, compreende, inicialmente, a extração destas enzimas, seguida da precipitação e caracterização do extrato obtido, quanto ao estabelecimento dos valores ótimos de pH e temperatura de ação, bem como o estudo do efeito destes parâmetros na estabilidade da enzima.

No que se refere à etapa de remoção de Phe, vários procedimentos são citados na literatura, empregando-se meios adsorventes como resinas e carvão ativado (CA), e, ainda, a peneira molecular e a cromatografia de troca iônica (KITAGAWA et al., 1987; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993; OUTINEN et al., 1996).

A avaliação da eficiência da remoção de Phe é feita pela sua quantificação na matéria-prima e nos seus hidrolisados protéicos, após a utilização do meio adsorvente. Para tal, são descritos na literatura diversos métodos, como a cromatografia gasosa (MAYADUNNE et al., 2005); a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1986); a HPLC de fase reversa (ZEZZA et al., 1992); a HPLC de troca iônica (CABRERA-PADILLA et al., 2009; GALVÃO et al., 2009) e a espectrofotometria derivada segunda - EDS (ROJAS et al., 1988; SILVESTRE et al., 1993).

A dosagem de Phe nos alimentos deve ser realizada empregando-se métodos analíticos confiáveis e validados (PIECYK et al., 2007). Os procedimentos de validação, reconhecidos como um dos pontos críticos em sistemas de gestão da qualidade laboratoriais, fornecem todos os parâmetros de desempenho necessários, indicando, assim, a adequação para uso de um determinado método (SOUZA, 2007).

Uma vez obtidos os hidrolisados protéicos contendo baixo teor de Phe, estes poderão ser utilizados na reconstituição de uma farinha de trigo contendo este aminoácido na quantidade que se enquadre nas especificações da legislação brasileira (0,1 g/100 g de produto) (BRASIL, 2002).

Considerando que estes hidrolisados consistirão na base protéica da alimentação dos fenilcetonúricos, é importante que estes preparados possuam adequado valor nutricional, ou seja, elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di-tripeptídeos. Este fato está relacionado a uma absorção mais rápida e completa destes peptídeos, em relação às proteínas intactas ou aos aminoácidos livres (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1986; VIJAYALAKSHIMI et al., 1986; RÉRAT, 1993; BOZA et al., 2000).

Dessa maneira, a caracterização do perfil peptídico destes hidrolisados protéicos torna-se necessária. Para tal, diversos métodos estão descritos na literatura, tais como eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (LI-JUN et al., 2008), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN et al., 2008), HPLC capilar (ITO et al., 2005) e HPLC de fase reversa (NOGUEIRA et al., 2005). Entretanto, estes métodos apresentam uma série de inconvenientes, como a interação com a fase estacionária. Visando reduzir este problema, SILVESTRE et al. (1994a) desenvolveram um método analítico, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou fracionar e quantificar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da. Este método foi, posteriormente, empregado pelo mesmo

grupo do presente trabalho, na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes protéicas, tais como a caseína (SILVESTRE et al., 1994b; MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2004; MORAIS et al., 2005), o leite (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006), o soro de leite (BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), o arroz em grãos (LOPES et al., 2008) e o concentrado protéico de soro de leite (SILVA, 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral obter hidrolisados protéicos de farinha de trigo, com teor reduzido de fenilalanina e perfil peptídico nutricionalmente adequado, empregando-se um extrato enzimático da casca de abacaxi, isoladamente e em associação com uma pancreatina comercial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato enzimático bruto, a partir da casca de abacaxi variedade Pérola;
- Precipitar este extrato, empregando-se três diferentes metodologias: precipitação isoelétrica, etanólica e por sulfato de amônio;
- Quantificar os teores de proteína dos extratos enzimáticos bruto e precipitados;
- Determinar as atividades proteolíticas e específicas dos extratos enzimáticos bruto e precipitados;
- Caracterizar os extratos bruto e precipitados e avaliar o efeito do pH e da temperatura na atividade e na estabilidade da enzima;
- Determinar a composição química da farinha de trigo;
- Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação de fenilalanina em farinha de trigo, por espectrofotometria derivada segunda;
- Extrair enzimaticamente as proteínas da farinha de trigo, empregando-se uma protease alcalina de *Bacillus licheniformis*;
- Otimizar o rendimento da extração protéica, variando-se diversos parâmetros, tais como tempo, temperatura, tratamento físico da amostra, relação enzima: substrato e concentração inicial de matéria-prima;

- Obter os hidrolisados protéicos da farinha de trigo, variando-se diversos parâmetros de reação, tais como tipo de enzima, associação e ordem de adição enzimática, tempo, temperatura, pH, relação enzima:substrato e tratamento físico do extrato protéico;
- Remover a fenilalanina do extrato protéico da farinha de trigo, empregando-se, concomitantemente, 3 tipos de carvão ativado como meio adsorvente;
- Avaliar a eficiência da remoção de Phe, através de sua quantificação por espectrofotometria derivada segunda;
- Analisar o efeito da relação proteína:carvão ativado sobre a remoção de fenilalanina;
- Caracterizar o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo;
- Avaliar o efeito do processo de remoção de fenilalanina sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo

REVISÃO DE LITERATURA

1 FENILCETONÚRIA

1.1 Considerações gerais

A patologia conhecida como fenilcetonúria (PKU) foi descrita pela primeira vez em 1934, quando Folling, um médico e bioquímico norueguês, identificou o ácido fenilpirúvico na urina de dois irmãos institucionalizados com retardo mental e que apresentavam odor característico na urina. Posteriormente, descobriu que 1 % da população internada na mesma instituição que os irmãos também excretava o ácido fenilpirúvico. Em 1935, Penrose caracterizou a doença como sendo geneticamente transmissível de natureza autossômica recessiva, nomeando-a Fenilcetonúria.

A PKU é causada pela atividade deficiente ou ausente da enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH), que catalisa a conversão de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). Este erro inato do metabolismo produz um acúmulo de Phe no sangue, que ativa a via de transaminação da Phe, levando à formação de fenilpiruvato e outros metabólitos, que são rapidamente excretados na urina. Observa-se, também, uma elevação na concentração de Phe no líquido, provavelmente por um mecanismo de competição do aminoácido com a glicose para ultrapassar a barreira hematoencefálica, favorecendo a lesão neuronal (BURTIS & ASHWOOD, 1996). Além disso, a incapacidade de metabolizar a Phe acarreta uma diminuição nos níveis plasmáticos de tirosina e, conseqüentemente, a redução dos neurotransmissores formados a partir deste aminoácido, como dopamina, epinefrina e norepinefrina, podendo ocasionar o retardo mental, manifestação clínica mais severa da doença. A produção de melanina também é afetada, sendo observado o clareamento da pigmentação da pele, cabelo e olhos. A via de hidroxilação da Phe (Figura 1), é um passo obrigatório e limitante na via catabólica, e leva à completa oxidação da Phe a CO_2 e água.

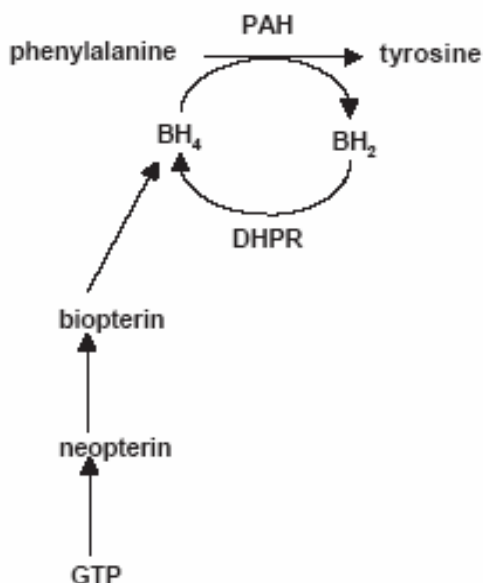


Figura 1: Via de hidroxilação da fenilalanina. Fonte: HENDRIKSZ & WALTER (2004).

Sabe-se que estas hiperfenilalaninemias (HPA), nome genérico dado aos níveis elevados de Phe no sangue, podem estar relacionadas, além de alterações da atividade enzimática da fenilalanina-hidroxilase, com a deficiência de enzimas que sintetizam ou reduzem a coenzima tetrahydrobiopterina (BH_4) (TRAHSM, 2002). Assim, são encontrados diferentes tipos de hiperfenilalaninemias, de acordo com o erro metabólico envolvido, formando um grupo heterogêneo de doenças, incluindo a PKU clássica, PKU leve e variações de hiperfenilalaninemias, como a HPA transitória e a PKU atípica (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

A PKU atípica é uma desordem que ocorre devido a erros no metabolismo da coenzima BH_4 , cofator essencial na hidroxilação de Phe, aumentando indiretamente os níveis de Phe sanguínea (MIRA & MARQUEZ, 2000). Essa variante faz com que uma pequena parcela de pacientes com deficiência da coenzima tetrahydrobiopterina redutase ou sintetase, seja diagnosticada incorretamente como PKU clássica e submetida ao tratamento baseado nos níveis de Phe sanguíneos. Vários grupos de pesquisadores relatam que o tratamento inadequado faz com que o quadro neurológico e de retardo mental desses pacientes persista, ou mesmo se agrave, pois a dieta restrita em Phe não reverte os efeitos causados no sistema nervoso central pela deficiência dos neurotransmissores (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Dentro do grupo de erros inatos do metabolismo de aminoácidos, a PKU é a manifestação clínica mais encontrada (MIRA & MARQUEZ, 2000). A PKU acomete,

aproximadamente, 1:8.000 recém-nascidos na Europa Ocidental, em média 1:10.000 nos Estados Unidos, mas é muito mais rara em japoneses e quase desconhecida em africanos. Já no Brasil, a incidência é de uma criança fenilcetonúrica a cada 15.000 recém-nascidos (RAMASWAMI & SMITH, 1997; HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MARCO & WAITZBERG, 2004) e em Minas Gerais, foi demonstrado que a incidência de Fenilcetonúria em Minas Gerais é 1:21.175 nascidos vivos (MARTINS, 2005).

Outra ocorrência grave da doença é a fenilcetonúria materna, podendo levar a uma síndrome clínica fetal, pois eleva ao dobro a concentração de fenilalanina sérica no feto, mesmo que o controle dos níveis séricos esteja adequado para a mãe (MIRA & MARQUEZ, 2000; MARCO & WAITZBERG, 2004). A patogênese desta síndrome pode ser explicada pela hipótese de que os elevados níveis de Phe sanguíneos provocam uma inibição no transporte competitivo de outros aminoácidos aromáticos (Trp e Tyr) para dentro da placenta, acarretando deficiência de Tyr. Além da deficiência mental, observa-se com frequência, a microcefalia, a cardiopatia congênita e o peso baixo ao nascimento (MIRA & MARQUEZ, 2000).

1.2 Classificação

Existem controvérsias quanto à nomenclatura utilizada para caracterizar as diferentes condições associadas a altas concentrações de Phe sanguíneas. No entanto, a classificação mais utilizada atualmente é apresentada na Tabela 1. Sabendo-se que a concentração normal de Phe no sangue está usualmente entre 50 e 120 $\mu\text{mol/L}$, as diferentes formas de PKU são classificadas de acordo com o nível de Phe apresentado no teste de sobrecarga, que é realizado aos seis meses de idade (STARLING et al., 1999; HENDRIKSZ & WALTER, 2004; KANUFRE, 2006).

Tabela 1: Classificação das diferentes formas de hiperfenilalaninemias de acordo com o nível sanguíneo de fenilalanina, apresentado no teste de sobrecarga

Nível de fenilalanina	Classificação
Menor que 240 $\mu\text{mol/L}$	Hiperfenilalaninemia transitória
Entre 240 $\mu\text{mol/L}$ e 600 $\mu\text{mol/L}$	Hiperfenilalaninemia não PKU
Entre 600 $\mu\text{mol/L}$ e 1200 $\mu\text{mol/L}$	PKU leve
Acima de 1200 $\mu\text{mol/L}$	PKU Clássica

Fonte: STARLING et al., 1999; KANUFRE, 2006.

1.3 Diagnóstico

Os níveis de Phe sanguínea são normais ao nascimento em crianças portadoras de PKU, no entanto esses níveis aumentam rapidamente a partir dos primeiros dias de vida. Porém, a criança é aparentemente normal durante os primeiros meses, sendo que os sinais de atraso no desenvolvimento aparecem apenas por volta do terceiro ou quarto mês. As crianças tornam-se inquietas, irritadas e podem apresentar convulsões, além de outros sintomas. Assim, faz-se necessária a realização de exames em todos os recém-nascidos, preferencialmente entre o terceiro e o sétimo dia de vida, independentemente da história de prematuridade, alimentação recebida, uso de medicamentos ou internação hospitalar (MIRA & MARQUEZ, 2000; SOUZA et al., 2002; HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Saúde, e prevê a triagem com detecção de casos suspeitos, confirmação diagnóstica, acompanhamento e tratamento de pacientes de casos identificados com fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doenças falciformes e outras hemoglobinopatias e fibrose cística (BRASIL, 2001).

Já, em Minas Gerais, o programa de triagem neonatal foi implantado em setembro de 1993, fruto de uma parceria entre a Secretaria de Estado da Saúde e a Faculdade de Medicina da UFMG, através do NUPAD – Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico, que foi credenciado pelo Ministério da Saúde como serviço de referência

em triagem neonatal no Estado (STARLING et al., 1999; NUPAD, 2008). Esta triagem neonatal, conhecida como Teste do Pezinho, é realizada no quinto dia de vida, e atinge 100% dos municípios mineiros, contemplando aproximadamente 96 % dos nascidos vivos do estado. Este programa garante tratamento e acompanhamento médico gratuitos, e o fornecimento de medicamentos e dieta especiais (AGUIAR, 2004; NUPAD, 2008).

Dessa forma, a conduta diagnóstica baseia-se na triagem neonatal, em que recém-nascidos com exames suspeitos para fenilcetonúria ($\geq 240 \mu\text{mol}$ de Phe/L) são encaminhados ao Ambulatório de Fenilcetonúria do Hospital das Clínicas da UFMG para esclarecimento diagnóstico e tratamento, se necessário. Recém-nascidos com níveis sanguíneos de Phe $\geq 600 \mu\text{mol/L}$ no dia da primeira consulta, são imediatamente tratados (STARLING et al., 1999).

1.4 Tratamento

O tratamento da PKU é basicamente dietético, devendo ser iniciado, preferencialmente, até os 21 dias de vida, e consiste na redução dos níveis plasmáticos elevados de Phe para concentrações consideradas não lesivas ao sistema nervoso, de acordo com a faixa etária do paciente (STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000; HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MARCO & WAITZBERG, 2004).

A finalidade da utilização da dieta pobre em Phe consiste em fornecer ao organismo apenas as quantidades imprescindíveis do aminoácido, de acordo com a idade e os níveis sanguíneos de Phe, para a síntese de proteínas, regeneração e crescimento normal da criança (MIRA & MARQUEZ, 2000). Isto é alcançado por meio de uma restrição severa a proteínas naturais, já que a maioria das crianças com fenilcetonúria pode tolerar menos do que 500 mg de fenilalanina em 24 h. Com isso, torna-se necessária a utilização de uma outra fonte artificial de aminoácidos essenciais e não essenciais, e/ou na produção e disponibilização de alimentos adequados a esses pacientes (HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

A importância do controle da dieta e dos níveis de Phe é bem estabelecida na infância. A interrupção prematura do tratamento põe em risco as funções cognitiva e emocional, incluindo a perda progressiva do QI, dificuldade de aprendizado, distúrbios de atenção e comportamentais (MIRA & MARQUEZ, 2000; MARCO & WAITZBERG, 2004).

O planejamento dietético da PKU consiste em prescrição dietética com baixa quantidade de Phe, geralmente associadas a fórmulas industrializadas isentas de Phe, que estão, normalmente associadas com fórmula láctea, para prover proteínas de alto valor biológico, promovendo o crescimento adequado da criança. Os outros alimentos são introduzidos de acordo com a idade da criança e sempre controlando a ingestão total de Phe (MARCO & WAITZBERG, 2004).

Os alimentos permitidos na alimentação dos fenilcetonúricos são, na sua maioria, os que devem ser restringidos na dieta de crianças normais. Dentre estes, alguns devem ser estimulados, tais como: balas, pirulitos, sorvetes de frutas, sucos artificiais, refrigerantes, farináceos oriundos da mandioca, e temperos, como vinagre, mostarda e pimenta. Considerando, que a oferta calórica adequada é fator essencial ao controle dos níveis séricos de Phe, esta recomendação torna-se necessária (ACOSTA & YANNICELLI, 1997; MARCO & WAITZBERG, 2004).

Os alimentos com médios teores de Phe devem ser fornecidos na dieta, pois são importantes para assegurar a saciedade e a oferta calórica adequada, evitando assim, possíveis transgressões. As quantidades destes alimentos são determinadas pela idade, tolerância individual e pelos níveis séricos apresentados periodicamente. Como exemplos destes alimentos temos: massas: (macarrão sem ovos), arroz, angu, farofa, raízes e tubérculos (batata inglesa, batata doce, batata baroa, mandioca, cará, inhame), legumes (abóbora, abobrinha, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, chuchu, couve-flor, jiló, quiabo, repolho, vagem), folhosos e outros vegetais (acelga, alface, almeirão, couve, agrião, mostarda, pimentão, tomate, pepino, cebola), além de frutas em geral (ACOSTA & YANNICELLI, 1997; MARCO & WAITZBERG, 2004).

Os alimentos com altos teores de Phe não são permitidos em nenhuma circunstância, uma vez que até pequenas quantidades dos mesmos podem provocar alterações drásticas nos níveis séricos de Phe, além de predispor o paciente fenilcetonúrico a repetir este comportamento, transgredindo sua dieta. Dentre esses alimentos estão as carnes e derivados de qualquer tipo, as leguminosas (feijões, ervilhas, soja, grão de bico, lentilha), leite e derivados, assim como ovos, nozes, salgadinhos em pacotes, gelatinas, bolos, salgados, farinha de trigo, pães em geral, pão de queijo, biscoitos (ACOSTA & YANNICELLI, 1997; MARCO & WAITZBERG, 2004).

Produtos alimentícios, contendo adoçantes artificiais à base de aspartame, não devem ser utilizados na dieta, uma vez que o aspartame é um dipeptídeo do éster metílico de Phe e aspartato (MARCO & WAITZBERG, 2004).

Em pacientes com PKU clássica, é necessário o uso de substitutos protéicos sintéticos para o controle dos níveis séricos de Phe. Estes substitutos podem ser divididos em dois grupos: misturas de L-aminoácidos e hidrolisados protéicos (MILUPA, 1995), sendo os primeiros, os mais disponíveis no mercado.

Um fator limitante no consumo destes produtos dietéticos especiais para PKU é o fato de serem importados e de alto custo. Os mais frequentemente utilizados são misturas de aminoácidos livres de Phe ou formulações contendo estes aminoácidos associados a amido de milho, gordura e açúcar em quantidades apropriadas para garantir a oferta calórica e protéica. Estes produtos são suplementados com vitaminas, minerais e tyr que torna-se um aminoácido essencial, uma vez que sua síntese ocorre a partir da fenilalanina (MILUPA, 1995).

Ressalta-se, ainda, que do ponto de vista sensorial, essas misturas possuem odor e paladar desagradáveis e sua ingestão, que deveria ocorrer em pequenas porções durante o dia, frequentemente é feita de uma só vez, com prejuízo na utilização biológica e com aumento da metabolização dos aminoácidos por via oxidativa. O consumo dos aminoácidos em dose única pode resultar em náuseas, vômitos, tontura e diarreia. Além disso, as misturas de aminoácidos sintéticos também são indesejáveis do ponto de vista do equilíbrio osmótico, pois causam hiperosmolaridade do trato gastrointestinal, resultando em absorção ineficiente pelo organismo (MIRA & MARQUEZ, 2000; MaCDONALD et al., 2003). Acrescenta-se ainda, que apesar desses produtos oferecerem facilidade na prescrição e distribuição aos pacientes, eles resultam em uma dieta dispendiosa, monótona e pouco palatável (CLEMENTE, 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

Nos anos 70, iniciou-se no Japão a investigação sobre a possibilidade de produção de hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe. Procurou-se obter concentrados protéicos inodoros, sem cor e sem sabor a partir de proteínas de soja e de peixe, por proteólise enzimática (MIRA & MARQUEZ, 2000). A ingestão de proteínas hidrolisadas apresenta vantagens relacionadas ao seu teor de oligopeptídeos. A absorção de di- e tripeptídeos é mais rápida e completa que aquela observada para uma mistura equivalente de aminoácidos (GRIMBLE et al., 1986; ZIEGLER et al., 1990; FRENHANI & BURINI, 1999; SHIMAMURA et al., 1999). Além disso, proteínas hidrolisadas apresentam menor osmolaridade do que as misturas de aminoácidos, reduzindo a incidência de diarreia osmótica (FURST et al., 1990; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994).

O Ministério da Saúde do Brasil preconiza que o tratamento da PKU deve ser continuado durante toda a vida (BRASIL, 2002), o que ressalta a importância de produzir alimentos com teor reduzido de Phe, especialmente os proibidos, tais como a farinha de trigo, para que possa ser incorporada, sem restrições, na dieta de fenilcetonúricos, atendendo, assim, a grande demanda que vai desde a infância até a fase adulta.

2 FARINHA DE TRIGO

2.1 O trigo

2.1.1 Considerações gerais

Historicamente, o trigo é, desde a pré-história, o mais importante dos cereais, e provavelmente, a mais antiga planta cultivada. Serviu de sustento de civilizações da Mesopotâmia e do Nilo, e conquistou a Europa como o primeiro produto agrícola utilizado no processamento de alimentos (ORTOLAN, 2006).

Entre os alimentos, os cereais são os mais consumidos mundialmente, sendo o trigo o que tem maior aceitação (KAJISHIMA et al., 2003). Atualmente, a produção de trigo representa cerca de 30% da produção mundial de cereais, totalizando 610,2 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2009). Os principais produtores de trigo mundiais são China, EUA, Índia, Rússia e França e os maiores exportadores são EUA, Canadá, União Européia, Austrália e Argentina (CONAB, 2007).

O cultivo do trigo é tão disseminado pelo mundo inteiro que, em qualquer mês do ano, ele é colhido em alguma parte de nosso planeta, graças aos avanços no melhoramento genético da triticultura, que permitiram a criação de espécies capazes de se adaptarem melhor às condições de clima e solo onde se deseja cultivar este cereal. Atualmente, a espécie mais cultivada para o processamento de alimentos à base de trigo (especialmente pães), é o *Triticum aestivum*, (ORTOLAN, 2006), representando mais de 90% da produção mundial (MIRANDA, 2006).

Da produção total de trigo, 65 % são consumidos por humanos, principalmente na forma de farinha branca (72-80 % de extração) usada na produção de pães, massas alimentícias, bolos, biscoitos ou como ingrediente na elaboração de inúmeros produtos alimentares. Cerca de 20 % são utilizados para alimentação animal e os restantes 15 % são usados como semente e em aplicações industriais, sendo que pequena mas

significativa proporção é perdida durante manuseio e processamento pós-colheita (MIRANDA & EL-DASH, 2002; MIRANDA, 2006). Esta ampla aplicação do trigo, na fabricação de produtos alimentícios, está associada às suas propriedades tecnológicas e nutricionais, devido a seus constituintes, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos, e em menor quantidade, fibras, vitaminas e minerais, que satisfazem parte das necessidades energéticas da população (ORTOLAN, 2006).

O primeiro registro de plantio de trigo no Brasil data de 1534, quando foi realizado o cultivo na Capitania de São Vicente. Somente em 1737, a lavoura tritícola foi introduzida no Rio Grande do Sul por colonos vindos dos Açores. A cultura adquiriu tamanha expressão que, nas duas décadas iniciais do século XIX, o Rio Grande do Sul chegou a exportar o cereal para outros estados e até para outros mercados. Mas, entre 1810-1815 com o aparecimento da ferrugem, o trigo deixou de existir como cultivo econômico (SOARES, 1980).

Os maiores incrementos de área colhida com trigo ocorreram nos períodos de 1975/80 e 1986/90, quando foram implementadas políticas de sustentabilidade da produção nacional. Nestes períodos, o Governo Federal proporcionou ao triticultor brasileiro uma melhor remuneração para a atividade, estimulando o uso de tecnologias modernas (BRASIL, 1993). Em 1990, ocorreu a diminuição do apoio governamental à cultura, associada à maior liberdade de importação, resultando na redução da produção interna. Com isso, a maior parte do trigo consumido no Brasil passou a ser importado deixando de gerar emprego e renda na economia brasileira. Ao mesmo tempo em que havia redução da produção e ausência do apoio governamental, as indústrias passaram a exigir trigo de melhor qualidade industrial. A partir de 1990, a pesquisa concentrou maior atenção no desenvolvimento de variedades de maior potencial genético e de melhor qualidade industrial. Desse modo, os produtores que utilizavam de maneira integral as tecnologias preconizadas pela pesquisa agropecuária, continuaram obtendo rendimentos acima da média para os padrões brasileiros (COLLE, 1998).

O cultivo de trigo tem grande importância para o Brasil, pois serve como cobertura do solo no inverno e como sucessão a soja e ao milho, ou outras culturas, reduzindo a erosão, e a degradação dos solos, além de sua participação na agricultura familiar (ORTOLAN, 2006). O trigo também é necessário para a economia do Brasil, devido ao elevado consumo de seus derivados, principalmente, farinha, pães e massas. No entanto, a produção brasileira não tem sido suficiente para atender a demanda, agravada, ainda, pela grande quantidade de grãos perdidos ou colhidos com qualidade

inferior, decorrentes de chuva no período da colheita, ou ocorrência de perdas pós-colheitas, devido ao ataque de insetos (COLLE, 1998; MACEDO, 2009).

Atualmente, o trigo consumido no Brasil é de procedência nacional e importado, sendo que o mercado interno responde pela produção de 4,1 milhões de toneladas, dentre as 10,2 milhões de toneladas de trigo consumidas anualmente (MACEDO, 2009). O estado do Paraná é o maior produtor nacional, representando juntamente com o Rio Grande do Sul, cerca de 90 % da produção interna (GUARIENTI et al., 2003). O preço do trigo nacional subiu 25,55 % em 2008, na comparação com o ano anterior, passando de R\$ 522,00 a tonelada para R\$ 656,00. Em 2006, o produto custava R\$ 410,00 a tonelada (MACEDO, 2009).

O trigo produzido na região Sul apresenta qualidade tecnológica adequada para panificação, igual ou superior à apresentada pelo trigo da Argentina, principal país exportador para o mercado interno (ORTOLAN, 2006). O custo médio por tonelada de trigo produzido na Argentina passou de R\$ 447,00 em 2007 para R\$ 688,00 em 2008, uma alta de 53,44 %. Em 2006, a tonelada custava R\$ 357,00.

Por outro lado, graças à parceria entre agricultores e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que promoveu o melhoramento genético de cultivares, o trigo mineiro tem merecido destaque nos últimos 3 anos, sendo que a área plantada com este cereal em Minas Gerais praticamente dobrou de tamanho na última safra, chegando aos 20 mil hectares. Neste estado, principalmente as regiões do Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro, apresentam uma série de vantagens no cultivo do trigo quando comparadas à Região Sul, tais como estações de chuva e seca bem definidas, que possibilitam previsibilidade, tanto de volume de produção quanto de qualidade da safra associada à baixa umidade do ar durante o ciclo da cultura, diminuindo a incidência de pragas e doenças. Além disso, pode-se destacar o alto potencial produtivo, obtendo-se índices de 4 mil kg/ha em sequeiro e 7 mil kg/ha no sistema irrigado e, ainda, excelente qualidade industrial, com trigo pão e melhorador. O cultivo local ocorre de forma a possibilitar a rotação de culturas, sendo que a colheita é realizada na entressafra do Sul e Argentina, principais concorrentes no mercados brasileiros. Todos estes fatores, aliados à posição geográfica favorável ao escoamento da safra e à capacidade da indústria moageira mineira, contribuíram para que o trigo mineiro despontasse no mercado nacional (EMBRAPA, 2009).

Nos Estados Unidos e Canadá, sendo este último o segundo maior fornecedor de trigo para o mercado brasileiro, os custos de produção são iguais ou superiores aos do

Brasil. O consumo *per capita* de trigo no Brasil é de 50 kg habitante ano, e na Argentina é de 130 kg. (GRAZINA, 2007).

2.1.2 Estrutura do grão de trigo

O Trigo é um cereal fasciculado, pertencente à família Poácea, e ao gênero *Triticum*, possuindo diversas espécies. Os grãos de trigo possuem tamanhos e cores variáveis, e o formato oval, com as extremidades arredondadas. Numa das extremidades, encontra-se o gérmen e na outra, cabelos finos. Ao longo do lado ventral, nota-se uma reentrância conhecida como “crease”, que dificulta o processo de moagem (ORTOLAN, 2006).

A Figura 2 mostra a estrutura do grão de trigo em corte longitudinal.

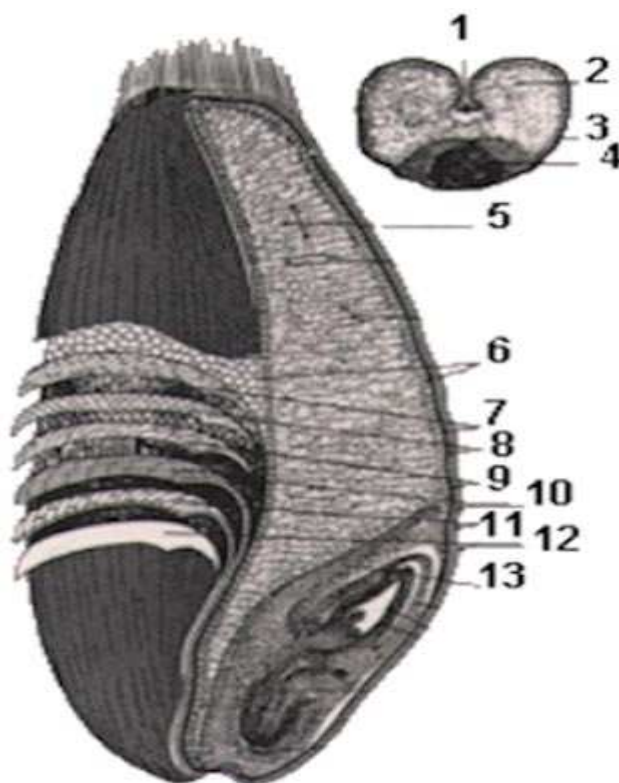


Figura 2: Corte longitudinal do grão de trigo. 1 - Crease; 2 - endosperma; 3 - farelo; 4 - gérmen; 5 - endosperma; 6 - aleurona; 7 - camada hialina; 8 - testa; 9 - células tubulares; 10 - células cruzadas; 11 - hipoderme; 12 - epiderme; 13 - gérmen. Fonte: ABITRIGO, 2006.

Os grãos são divididos, tecnologicamente, em três partes: gérmen, endosperma e pericarpo, que representam 3 %, 83 % e 14 % do grão, respectivamente (GUTKOSKI et al., 1999; ORTOLAN, 2006). A parte mais externa do grão é o pericarpo, que é constituído, principalmente, pela epiderme, hipoderme e células tubulares. O endosperma é a principal porção do grão, sendo constituído de amido e de proteínas de reserva, formadoras do glúten. Finalmente, o gérmen é a estrutura que apresenta o material genético para o desenvolvimento de nova planta (MCKEVITH, 2004).

A composição química dos grãos dos cereais é dependente do ambiente, solo e cultivar, sendo que os constituintes não se distribuem uniformemente pelo grão. O pericarpo é rico em pentosanas, celulose e minerais. A aleurona é constituída, principalmente, de minerais (fitato e fósforo), proteínas, lipídeos, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina) e enzimas. Já no endosperma, predomina o amido e proteínas de reserva e o gérmen possui alto conteúdo de lipídeos e outros nutrientes, tais como proteínas, açúcares redutores, vitaminas e minerais (ARAÚJO et al., 2008; SILVA et al., 2008)

2.2 A farinha de trigo

O trigo é amplamente utilizado na alimentação humana sob a forma de farinha, facilitando o consumo deste cereal, e possibilitando a adequada utilização de suas propriedades tecnológicas e nutricionais (MIRANDA & EL-DASH., 2002; ORTOLAN, 2006). A farinha de trigo é definida como o produto obtido a partir da moagem do grão de trigo *Triticum aestivum*, e/ou de outras espécies do gênero *Triticum*, sendo classificada em tipo I, tipo II e integral (BRASIL, 2005), de acordo com a Instrução Normativa nº 8 de 2 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), denominada Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo.

Segundo MACEDO (2009), o volume nacional de produção de farinha de trigo atingiu 7.050.000 toneladas e o consumo de 39,17 kg *per capita*. Deste total, 54,7 % foram destinados à panificação, 14,2 % a produção de massas, 11,06 % a produção de biscoitos, 18,03 % o uso doméstico, e 2 % foram usados para outros fins. Entre os

alimentos elaborados com farinha, os pães e as massas alimentícias constituem os alimentos mais difundidos na dieta do brasileiro, representando importante fonte de carboidratos (ORTOLAN, 2006).

Na indústria de alimentos, a qualidade da farinha de trigo varia, diferentemente, para usos distintos nos produtos, além de ser definida pela sua capacidade de produzir, uniformemente, um produto final atrativo e com custo competitivo e, ainda, ser representada, usualmente, por várias medidas e características que as experiências têm indicado como significantes no uso final (FARONI et al., 2002). Assim sendo, o termo “qualidade da farinha” é relativo e denota a adequação da farinha para um certo uso, não tendo nenhuma relação com seu valor nutritivo. Ressalta-se, igualmente, que uma farinha de boa qualidade para o pão não o é, necessariamente, para bolos e vice-versa. Além disso, a qualidade da farinha é bastante diferente entre uma amostra que irá produzir um pão daquela que irá produzir um biscoito, dependendo diretamente do tipo de trigo do qual é proveniente, assim como do processo de produção (BENASSI & WATANABE, 1997).

Dada a grande diversidade de farinhas de trigo, é necessária a utilização de vários métodos para determinar essas características. Os métodos mais utilizados são os relacionados com as características reológicas da massa, a partir de sistemas simples de mistura de água e farinha. Existe uma série de aparelhos para medir estas propriedades, tais como farinógrafo, extensógrafo e alveógrafo. A definição de uso final de uma farinha deve ser feita após a avaliação conjunta dos resultados obtidos após todas as análises (GUTKOSKI et al., 2007).

2.2.1 Composição química da farinha de trigo

A farinha de trigo consiste, basicamente, de amido (70-75 %), água (14 %) e proteínas (10-12 %). Apresenta, também, polissacarídeos não amiláceos (2-3 %) e lipídeos (2 %) que, mesmo estando presentes em quantidades menores, exercem um papel importante na produção de alimentos derivados da farinha de trigo (ORTOLAN, 2006). Os teores máximos de cinzas de 0,8, 1,4 e 2,5 %, são empregados para se classificar as farinhas em tipo I, tipo II e integral, respectivamente (BRASIL, 2005).

O controle da umidade da farinha de trigo, é desejável para que o seu teor não seja superior a 15 % (BRASIL, 2005), exigidos pela legislação brasileira, não somente por motivos econômicos, já que a farinha é comercializada em base úmida mas,

também, pela manutenção da qualidade e do valor nutricional durante o armazenamento.

A composição da farinha de trigo é o resultado da interação das condições de cultivo do trigo (interferência do solo, clima, pragas, manejo da cultura e da cultivar), em soma à interferência das operações de colheita, secagem e armazenamento, fatores estes que influem diretamente sobre o uso industrial deste produto (MIRANDA & EL-DASH, 2002; GUTKOSKI, 2007).

Assim, pode-se observar nas tabelas abaixo (Tabela 2 e 3), a variação entre os teores dos constituintes do trigo e da farinha de trigo.

Tabela 2 - Composição química da farinha de trigo tipo I

Componentes (g/100g)	TACO / UNICAMP ¹	FAO ²	USP ³
Umidade	13	12	10,5
Proteína	9,8	8,6	11,7
Lípides	1,4	1,0	1,4
Cinzas totais	0,8	0,4	0,5
Fibra alimentar total	2,3	2,1	2,8
Carboidratos	75	73,9	76

¹ TACO (2007); ² FAO (2002); ³ USP (2006).

A importância dos cereais, incluindo o trigo, na nutrição de milhões de pessoas de todo o mundo é altamente reconhecida, podendo ser considerados como fonte de energia e de proteínas, nas dietas da população dos países em desenvolvimento. Entretanto, as suas proteínas apresentam uma qualidade nutricional limitada devido à deficiência de alguns aminoácidos essenciais, principalmente a lisina (FAO, 1992).

Tabela 3 – Conteúdo de proteína e de aminoácidos essenciais em alguns cereais

Cereal	Proteína (g/100 g)	Aminoácidos Essenciais (mg/100 g)								
		Lys	Ile	Leu	Met	Phe	Thr	Trp	Val	His
Arroz Polido ¹	7,2	258	308	589	168	381	255	83	435	168
Trigo ²	12,2	179	204	417	94	435	183	68	276	143
Milho ²	9,5	167	230	783	120	305	225	44	303	170
Sorgo ²	10,1	126	245	832	87	306	189	87	313	134
Centeio ²	11,0	212	219	385	91	276	209	46	297	138
Aveia ²	13,0	232	236	454	105	313	207	79	319	131

Lys: Lisina; Ile: Isolceucina; Leu: Leucina; Met: Metionina; Phe: Fenilalanina; Thr: Treonina; Trp: Triptofano; Val: Valina; His: Histidina; ¹ USDA (2006); ² FAO (1981).

Fonte: adaptado de VIEIRA (2007).

Ressalta-se ainda, como pode ser visto na Tabela 3, que dentre os cereais, o trigo apresenta o maior teor de Phe.

2.2.2 Proteínas da farinha de trigo

A proteína contida nos cereais é significativa para seu valor nutricional, e no caso de alguns alimentos, como o trigo, é também importante para as propriedades funcionais (SILVA, 2003). Dentre as farinhas dos diferentes cereais, apenas a do trigo possui habilidade de formar uma rede elástica e contínua, que retém o gás carbônico liberado durante todo o processo de fermentação da massa pelas leveduras, permitindo sua expansão (GIANIBELLI et al., 2002; GALERA, 2006). As proteínas do glúten são as principais responsáveis por estas características, sendo que a qualidade destas varia em função das variedades de trigo plantadas e condições de cultivo, como adubação, temperatura, índice pluviométrico, dentre outros. Essas proteínas podem ser classificadas de acordo com a solubilidade (OSBORNE, 1907), citado por SGARBIERI (1996), com a estrutura molecular (KREIS & SHEWRY, 1985), com a estrutura química (MACRITCHIE & LAFIANDRA, 1997), com similaridades químicas e genéticas (SHEWRY et al., 1997), citado por SANTOS (2008).

As proteínas presentes na farinha de trigo podem ser divididas em dois grupos, de acordo com a solubilidade: as formadoras e as não formadoras do glúten. Dentre as proteínas não formadoras do glúten, que representam cerca de 15-20 % do total presente no trigo, estão as albuminas e as globulinas. Estas proteínas são, principalmente, monoméricas, apresentando peso molecular inferior a 25.000 Da, e apresentam menor importância tecnológica (MACRITCHIE & LAFIANDRA, 1997; GIANIBELLI et al., 2002; GALERA, 2006).

Já as proteínas formadoras do glúten, que consistem em cerca de 80 -85 % do total presente no trigo, são insolúveis em água, mas capazes de formar uma rede viscoelástica, que permite a retenção de gases produzidos durante a fermentação microbiana da massa (LOOKHART et al., 1993; MACRITCHIE & LAFIANDRA, 1997; GIANIBELLI et al., 2002; VAN DER BORGHT et al., 2005).

Quando a farinha de trigo é misturada com a água e homogeneizada mecanicamente, no processo de fabricação de pães, ocorre a hidratação das proteínas gliadina e glutenina que passam a formar um complexo protéico pela sua associação por pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e pontes dissulfeto, formando, assim, o glúten (BOBBIO & BOBBIO, 2001).

A principal diferença entre estes dois grupos de proteínas de reserva relaciona-se com a funcionalidade. A gliadina é constituída de apenas uma cadeia polipeptídica, enquanto que a glutenina é formada por várias cadeias polipeptídicas, unidas entre si por ligações dissulfeto. Esta estrutura confere elevado peso molecular à glutenina, sendo responsável, também, pela elevada insolubilidade desta proteína (GIANIBELLI et al., 2002). As gliadinas, são prolaminas monoméricas, cujo peso molecular situa-se entre 30.000 e 80.000 Da, e são formadas por apenas uma cadeia, tornando-se extremamente viscosas quando hidratadas. Estas são ricas em prolina e glutamina e apresentam baixo nível de lisina. Possuem resíduos de cisteína capazes de formar pontes dissulfeto intramoleculares, podendo ser separadas em 4 diferentes tipos, α -, β -, γ e ω , baseando-se na mobilidade por SDS-PAGE. Na formação da massa, as gliadinas atuam promovendo a extensibilidade, característica reológica importante para a formação adequada da massa (VERMEYLENA et al., 2005; VAN DER BORGHT et al., 2005). Estas proteínas podem se associar entre si ou com cadeias de gluteninas, através de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (VAN DER BORGHT et al., 2005).

As gluteninas representam cerca de 85 % das proteínas poliméricas, cuja característica principal consiste na presença de ligações dissulfídricas intra e intermoleculares formando, assim, cadeias compostas por subunidades. São formadas

por dois grupos de subunidades, os de alta massa molecular (HMW) – 80.000 a 120.000 Da e os de baixa massa molecular (LMW) – 30.000 a 55.000 Da, ligadas entre si por pontes dissulfeto (MACRITCHIE & LAFIANDRA, 1997). Estas proteínas conferem à massa resistência à extensão (VAN DER BORGHT et al., 2005).

As subunidades de LMW se subdividem de acordo com a mobilidade em SDS-PAGE em dois grupos, subunidades B e C, com massa molecular igual a 40.000 e 50.000 Da, respectivamente. As subunidades de gluteninas HMW ou tipo A, têm massas moleculares de 90.000 a 136.000 Da (EDWARDS et al., 2007). As LMW representam 60 % do total de gluteninas presentes no endosperma do trigo, entretanto, devido à similaridade de massa molecular com as gliadinas, a visualização em SDS-PAGE unidimensional fica prejudicada (GIANIBELLI et al., 2002).

No que se refere às subunidades HMW, embora representem um dos componentes minoritários das proteínas do endosperma do trigo, são essenciais no processo de panificação, por serem o principal fator determinante da elasticidade do glúten (GIANIBELLI et al., 2002). Nestas subunidades, encontra-se elevado conteúdo de resíduos de cisteína, que por sua vez, relacionam-se com a promoção das ligações dissulfídicas entre as subunidades HMW e LMW, responsáveis pela formação das proteínas poliméricas (WRIGLEY, 1988; LEMELIN et al., 2005).

Apesar de que no presente trabalho as proteínas do glúten não se encontrarem intactas, uma vez que foram parcialmente hidrolisadas, não se pode descartar a possibilidade de utilizar a farinha de trigo resultante na fabricação de pães, uma vez que outros cereais, que não contém glúten, ou apresentam baixo teor deste nutriente, são utilizados com esta finalidade. Ressalta-se, ainda, que a farinha resultante poderá ser utilizada, também, na fabricação de vários produtos tais como bolos, biscoitos e mingaus, além de manter suas propriedades como agentes espessantes e gelificantes em diversas preparações culinárias (GRISWOLD, 1972).

3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

3.1 Generalidades

A indústria de alimentos produz, ao longo de sua cadeia, uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, gerando prejuízos financeiros, além de inúmeros problemas ambientais (COELHO et al., 2001; SENA et al., 2006; LIMA et al., 2007). Entretanto, nos

últimos anos, especial atenção vem sendo dada para a minimização e/ou promoção do uso eficiente destes resíduos, sendo desenvolvidos vários bioprocessos capazes de utilizar estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (COELHO et al., 2001; ALEXANDRINO, 2007). Desta forma, poderia-se garantir a obtenção de um material alternativo, de baixo custo, de fácil disponibilidade, além de auxiliar na redução do seu acúmulo no ambiente (LIMA et al., 2007). Buscando-se alternativas de lucro para os sítios de produção, vários resíduos já foram estudados, tais como a casca do coco verde, que foi utilizada na produção de enzimas, principalmente, de proteases, pectinases e celulases por *Aspergillus niger* (COELHO et al., 2001). Da mesma forma, o bagaço úmido de laranja foi utilizado como substrato para a ação do fungo *Pleurotus ostreatus*, visando à obtenção das enzimas lacase e peroxidase (ALEXANDRINO et al., 2007), enquanto que as folhas jovens de *Camellia sinensis* (chá preto), serviram de substrato para a produção de mudas de alface, tomate e pepino (LIMA et al., 2007).

No Brasil, assim como na maioria dos países em desenvolvimento, ocorre a desnutrição da população, principalmente a de baixa renda. Esta situação decorre tanto do custo das proteínas alimentares, quanto do mau aproveitamento das fontes disponíveis, e até de hábitos nutricionais inadequados. O aproveitamento do sangue bovino e de suas frações é interessante pelas propriedades nutricionais (fonte de proteínas e ferro) e funcionais (textura, solubilidade, capacidade de formação de gel e de emulsificação) de suas proteínas, além de diminuir a poluição ambiental. Este resíduo da indústria frigorífica, quando não aproveitado, se apresenta como material de elevado índice poluente, o que faz crescer o interesse e a necessidade de sua exploração econômica (MASSARO & PINTO, 2002).

De forma semelhante, o soro de leite, que consiste no líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína, principal proteína do leite (SISO et al., 1996; SGARBIERI et al., 2004), é também definido como um subproduto da fabricação de queijo, sendo considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial usado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento (SISO et al., 1996; WALZEN et al., 2002). Além da poluição ambiental, o descarte do soro é também um desperdício de material protéico e outros nutrientes, uma vez que retém cerca de 55 % dos nutrientes do leite (SISO, 1996; ALMEIDA et al., 2001). Entretanto, a visão do soro de leite como um poluente tem mudado radicalmente, especialmente em países ricos, com as descobertas de propriedades funcionais e bioativas do soro e seus

componentes sendo, considerado um co-produto da produção de queijo (WALZEN et al., 2002).

No laboratório de Bromatologia/ Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, no qual foi desenvolvido o presente trabalho, vários estudos foram realizados visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais. Em alguns destes estudos, o interesse em utilizar o resíduo estava associado a uma aplicação tecnológica, enquanto que, em outros, o enfoque era o aproveitamento de matérias-primas subutilizadas no desenvolvimento de formulações alimentícias. No primeiro caso, enquadra-se a pesquisa envolvendo a obtenção da globina e do plasma, a partir do sangue bovino, obtido de frigorífico, e sua aplicação como agentes emulsionantes e substitutos de gordura em patê de presunto (SILVA et al., 2000; VIANA et al., 2005). Para o segundo caso, pode-se citar o aproveitamento do soro do leite como matéria-prima no preparo de hidrolisados protéicos ricos em oligopeptídeos, que poderão ser utilizados como fonte de proteínas em suplementos nutricionais para diversas aplicações clínicas (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; BIASUTTI et al., 2007; AFONSO et al., 2008; SILVA, 2009).

3.2 O abacaxizeiro e o abacaxi

O abacaxizeiro é uma angiosperma, monocotiledônea, da família Bromeliaceae, planta herbácea perene, que produz uma fruta única em uma inflorescência terminal. O modo usual e natural de propagação é através de mudas como coroa, filhote e rebentão. A coroa (tufo de folhas no ápice da fruta) proporciona uma plantação homogênea, de florescimento uniforme, mas é pouco utilizada, pois geralmente acompanha a fruta em sua comercialização “in natura”. Os filhotes, que são as brotações do pedúnculo, são bastante usados em plantios, por estarem disponíveis em maior quantidade. Os rebentões, que são as brotações do talo, são os tipos de muda mais usados no caso do cv *Smooth Cayenne*, cuja produção de filhotes é pequena (MEDINA, 1987). Para o plantio de um hectare são necessários de 35.000 a 70.000 mudas, dependendo do espaçamento usado. Por outro lado, a taxa média de produção de mudas por planta é relativamente pequena, variando de 3 a 6 mudas ao final de 18 meses de cultura (PY et al., 1984). Desta forma, um problema sério para os agricultores é a disponibilidade de mudas saudáveis e de boa qualidade (SANTOS, 1985).

Esta planta caracteriza-se por ser muito sensível ao frio, porém, resiste bem à seca. Exige, por isso, clima quente ou mesotérmico, onde não há perigo de ocorrência de geadas. A temperatura média favorável situa-se entre 21 °C e 27 °C. Quando a

temperatura se mantém acima de 32 °C, verificam-se danos na planta devido à transpiração excessiva; quando a temperatura cai abaixo de 20 °C, a planta entra em estado de inatividade (MEDINA, 1987). Portanto, as regiões Nordeste e Sudeste do Brasil apresentam as condições climáticas ideais para a produção do fruto (MARIN et al., 2002).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais, sobretudo das espécies Pérola e *S. Cayenne*, com destaque para os estados de Minas Gerais, Pará e Paraíba (SANTOS, 1985; MARIN et al., 2002). Acrescenta-se, ainda, que o Brasil ocupa a primeira posição na América do Sul e o terceiro lugar no *ranking* mundial, contribuindo com mais de 13 % da produção mundial (Tabela 4), sendo que cerca de 60 % a 65 % da produção desta fruta destina-se ao consumo interno (MARIN et al., 2002). O abacaxi é fonte da enzima proteolítica bromelina, um produto de alto valor comercial, que não é produzido no Brasil. Esta enzima é encontrada no fruto, no talo, no caule, nas folhas e nas raízes do abacaxizeiro e, em todas as espécies do gênero Bromeliaceae (LOPES et al., 2005).

Tabela 4 – Produção mundial de abacaxi em toneladas (t) e toneladas por hectare (t/ha)

Abacaxi	Produção (t)	Produção (t/ha)
Mundial	15.288.018	843.231
Tailândia	1.900.000	87.000
Filipinas	1.759.290	48.230
Brasil	1.435.190	54.683
China	1.320.000	70.500
Índia	1.300.000	90.000

Fonte: FAO (2005). Atualizado em fevereiro/2005; t = toneladas; t/ha=toneladas/hectare.

3.2.1 Resíduos do abacaxi

A agroindústria do abacaxi origina dois resíduos nutricionalmente diferentes. O primeiro, que permanece no local ou próximo ao plantio, é conhecido como resíduo pós-colheita da planta de abacaxi, sendo que, quando este é dessecado, recebe o nome de feno de abacaxi e, ao ser moído, é denominado farinha de abacaxi, muito utilizado na alimentação de bovinos. Já o segundo resíduo é considerado subproduto da indústria de conserva de abacaxi, e é composto de casca, coroa, brotos da fruta, anexos da fruta moídos e polpa, da qual se extrai o suco (MARIN et al., 2002).

O abacaxi fruto é a parte comercializável da planta, entretanto, esta porção representa somente 23 % do total da planta, enquanto que o restante formado por caule, folha, casca, coroa e talo, é considerado subproduto agrícola e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em perdas econômicas. A composição deste resíduo pode modificar-se de acordo com a qualidade e a variedade da fruta (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

Para o aproveitamento dos resíduos pós-colheita, sem perda da qualidade, é necessário que se faça a colheita e se estabeleçam condições ideais de armazenamento, com temperatura e umidade relativa controladas, permitindo retardar o processo vital do produto, através da redução do seu metabolismo, sem, contudo, alterar a sua fisiologia (CHITARRA & CHITARRA, 1990). A maioria dos produtores rurais não dispõe de tecnologias adequadas de armazenamento, que deve ser feito em atmosfera fresca e ventilada. Desta forma, grande parte destes resíduos agrícolas são perdidos (SANTOS, 1985), apesar de apresentarem teores representativos de carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas, que possibilitariam a sua utilização industrial como matéria-prima para a obtenção de bromelina, amido, fibras, álcool etílico e ração animal (BALDINI et al., 1993). Além disso, a perda de resíduos agrícolas pode estar associada ainda, à falta de interesse e cultura dos produtores.

Quanto ao resíduo da indústria de conserva de abacaxi, seu valor nutricional é alto, uma vez que os principais constituintes da sua matéria orgânica são os carboidratos solúveis, principalmente açúcares, além da pectina que age protegendo a mucosa gastrointestinal, neutralizando as proteínas bacterianas (MARIN et al., 2002).

Algumas pesquisas têm sido desenvolvidas visando o aproveitamento dos resíduos do abacaxi como casca e cilindro central. SREENATH et al. (1994) utilizaram enzimas comerciais (celulase e pectinase) para a extração do suco a partir destes

resíduos, enquanto TANAKA et al. (1999) empregaram estes mesmos resíduos, como substrato de baixo custo, para produção de etanol por fermentação. Em outro estudo, BORGES et al. (2004) produziram suco de abacaxi a partir de cascas, centro e aparas do fruto, após estes resíduos terem sido submetidos às etapas de branqueamento sob pressão, prensagem e filtração.

No presente trabalho, definiu-se o aproveitamento do resíduo da casca de abacaxi, pela maior facilidade de aquisição, em comparação com os demais resíduos deste fruto.

4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, que consiste em um processo contínuo, iniciado no planejamento da estratégia analítica e realizado ao longo de todo o seu desenvolvimento e aplicação (RIBANI et al., 2004; MARTINS, 2008).

Dentro do âmbito geral de validação de métodos, é possível distinguir dois tipos. O primeiro, chamado de *validação no laboratório* (*in house validation* ou *single laboratory validation*), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente, ou para verificar se um método adotado de outras fontes está sendo bem aplicado. Estes estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adaptáveis à diferentes situações. As validações intralaboratoriais atendem um importante nicho de processos de validação de métodos, devido à sua flexibilidade e habilidade em fornecer resultados rápidos para novas aplicações (VAN DER VOET et al., 1999). Os procedimentos de validação intralaboratoriais têm sido internacionalmente aceitos, uma vez que diferentes organismos oficiais têm proposto protocolos para este tipo de validação, por exemplo NATA (1997); AOAC (1998); EURACHEM (1998); EC (2002); AOAC *International*, ISO e IUPAC (THOMPSON et al., 2002); e INMETRO (2007). Além disso, por estes processos, pode-se avaliar, não somente a exatidão e a precisão de um método, mas também

outros parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, limites de detecção e de quantificação (VAN DER VOET et al., 1999). Por outro lado, trabalhar isoladamente reduz, de forma inevitável, a quantidade de dados obtidos, restringindo informações como, por exemplo, àquelas relativas à comparabilidade interlaboratorial. Apesar da impossibilidade de estudo do parâmetro reprodutibilidade nas validações intralaboratoriais, o que exigiria a execução de experimentos em diferentes laboratórios, esta informação nem sempre é necessária (EURACHEM, 1998). Muitas vezes, estudos de reprodutibilidade parcial são suficientes (VAN DER VOET et al., 1999). Da mesma forma, é possível obter uma estimativa da comparabilidade de resultados de medição de qualquer método com outros métodos, pelo ensaio de materiais de referência certificados, ou pela comparação do método em estudo com outro, para o qual a validação já tenha sido feita (EURACHEM, 1998).

O segundo tipo, validação completa, ou interlaboratorial, é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim, a metodologia pode ser aceita como uma oficial para uma determinada aplicação (HORWITZ, 1995; VAN DER VOET et al., 1999).

Para a validação de um método analítico quantitativo, não normalizado, levam-se em conta os seguintes parâmetros: linearidade, efeito de matriz, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção do equipamento e do método e limite de quantificação do método (SOUZA, 2007).

4.1 Linearidade

A linearidade do método é verificada por meio da regressão linear simples ou método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Contudo, algumas considerações devem ser avaliadas (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Sob o ponto de vista experimental, a avaliação da linearidade consiste em construir uma curva de calibração estabelecida com pelo menos seis níveis de concentrações (abscissa), mais o zero, e suas absorbâncias (ordenada). As soluções de cada concentração são preparadas em triplicatas independentes, isto é, não constituem repetições de leitura. As amostras devem ser lidas em ordem aleatória (THOMPSON et al., 2002; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

O ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO assume várias premissas

relativas aos resíduos da regressão e ao modelo. Os resíduos são variáveis aleatórias com média zero e variância constante e desconhecida. Seguem a distribuição normal, e são homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X (variável independente). Além disso, o resíduo de uma observação não deve ser correlacionado com o resíduo em outra observação, ou seja, a covariância deve ser zero e a relação entre X e Y (variável dependente) deve ser linear. Após as curvas prontas, é feito o cálculo do resíduo Jackknife, para tratamento de “outliers”. Em seguida, as premissas da regressão são avaliadas (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

4.2 Efeitos de Matriz

O delineamento experimental para testes de efeitos de matriz consiste do preparo de curvas de calibração usuais (curvas de analito em solventes), e curvas de materiais de referência ou de adição de analito, em amostras brancas ou não (curvas de analito em matriz), com concentrações idênticas ou abrangendo a mesma faixa de concentração (SOUZA, 2007).

Consideram-se amostras brancas aquelas de matrizes isentas do analito, ou para as quais o analito não tenha sido detectado. O uso de amostras típicas de cada matriz é fundamental para eliminar a possibilidade de efeitos de matriz, que diferem em magnitude de uma amostra para a outra. As curvas de analito em matriz são preparadas por adição do analito a soluções teste, obtidas de amostras ensaiadas nas mesmas condições dos procedimentos normais. Isto, para que as quantidades e as características dos interferentes presentes no extrato final de uma amostra sejam reproduzidas nas curvas. Cumpre observar que, não somente os interferentes provenientes da matriz são avaliados nestes experimentos, mas também todos aqueles provenientes de materiais, reagentes e soluções utilizados no preparo das amostras (SOUZA, 2007; LABANCA, et al., 2008).

Os estudos de efeitos de matriz se espelham nos experimentos de avaliação da linearidade. Assim, as considerações sobre o delineamento experimental para comprovação da linearidade, também são válidas para o preparo das curvas de calibração, destinadas às verificações dos efeitos de matriz (SOUZA, 2007).

Primeiramente, o teste de F é utilizado para avaliar a premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão, confrontando a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (há homoscedasticidade) contra

a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heteroscedasticidade). A estatística do teste é a razão entre as variâncias F , sendo a maior variância no numerador e a menor no denominador. A hipótese nula é rejeitada quando a estatística F calculada for maior que o valor crítico (SOUZA, 2007).

Quando o teste indicar homoscedasticidade, as inclinações e interseções das curvas de solventes e de matriz são comparadas pelo teste de t com variâncias combinadas. Se houver heteroscedasticidade, o teste de t é empregado utilizando as variâncias amostrais de cada curva (SOUZA, 2007).

Quando houver indicações de que as inclinações são significativamente diferentes, curvas matrizadas ou método de adição são empregados nas demais etapas da validação e nas atividades de rotina. No caso de apenas as interseções serem significativamente diferentes, a concentração prévia do analito deve ser estimada (possibilidade de não ser uma amostra branca verdadeira) (SOUZA, 2007).

4.3 Seletividade

Apesar dos estudos de efeitos de matriz garantirem uma avaliação parcial da seletividade do método, em relação aos interferentes presentes na amostra e no processo analítico, outras interferências também poderão acontecer. Entender os diferentes mecanismos que causam interferências pode ajudar na estruturação dos experimentos complementares para avaliação da seletividade e, também, na identificação de soluções para os problemas encontrados. Estudos da seletividade são usualmente limitados pelo conhecimento sobre o analito e potenciais interferentes. Há casos em que interferências químicas podem ser identificadas para um método em particular, mas as chances de serem encontradas na prática podem ser improváveis. Da mesma forma, é muito difícil determinar que não exista interferentes, uma vez que a possibilidade de sempre encontrar um interferente não é reconhecida previamente. Assim, os analistas devem equilibrar, com base em tempo, custos e benefícios, a busca por interferentes no processo de validação (VESSMAN et al., 2001; RIBANI et al., 2004).

Experimentos para avaliação da seletividade, descritos na literatura sobre validação intralaboratorial de métodos, envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras brancas, amostras contendo o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos ou por meio de variações nas

condições instrumentais (VESSMAN et al., 2001).

4.4 Exatidão e precisão

Experimentos para avaliação de exatidão envolvem ensaios com materiais de referência certificados ou não, amostras brancas e adicionadas, enquanto na verificação da precisão são necessários ensaios replicados, sob condições preestabelecidas de repetitividade e reprodutibilidade parcial (SOUZA, 2007).

Materiais de referência certificados são relacionados a todos os aspectos da tendência (do método, do laboratório e do ensaio), por apresentarem incerteza estabelecida e rastreabilidade a padrões internacionais comprovada. Estes materiais são utilizados com diversas finalidades, tais como alcançar a rastreabilidade em medidas analíticas, calibrar equipamentos e métodos, monitorar o desempenho do laboratório, validar métodos e permitir a comparação entre métodos. Entretanto, os materiais de referência certificados são caros e podem não ser representativos de amostras típicas, não garantindo a exatidão do método. A condição ideal seria utilizar um material de referência certificado da matriz de interesse. No caso da precisão, o uso de materiais de referência certificados, os quais são frequentemente bem mais homogêneos que amostras verdadeiras, podem subestimar a variação dos resultados (THOMPSON et al., 2002).

Na área de alimentos, materiais de referência certificados são escassos e dispendiosos, principalmente devido às dificuldades no preparo, homogeneização e garantia de estabilidade durante armazenamento e transporte. Quando não há material de referência certificado disponível, uma amostra branca da matriz de interesse pode ser adicionada de quantidades conhecidas de analito na forma de material puro (ou de pureza conhecida) e estável, ou de outro material bem caracterizado, para realização de ensaios de recuperação aparente (SOUZA, 2007). Este método de adição/ recuperação, empregado nos casos em que não é possível obter amostras brancas para os analitos e matrizes em questão, permite o estudo de diferentes tipos de analitos, concentrações e matrizes. Embora amostras adicionadas não tenham incertezas associadas, estudos de recuperação aparente com tais materiais permitem avaliar tendências devidas a efeitos relacionados ao analito adicionado. Na maioria das vezes, amostras adicionadas não representam fielmente a forma na qual o analito se encontra na matriz em amostras naturais, fornecendo uma impressão pouco realista de eficiência dos processos de extração. Em decorrência disto, recuperações aparentes satisfatórias em ensaios com

amostras adicionadas não são garantia de exatidão, mas recuperações aparentes insatisfatórias são indicativas de falta de exatidão (THOMPSON et al., 2002; RIBEIRO et al., 2008). Na Tabela 5 são apresentados valores críticos para a porcentagem de recuperação média em função da concentração do analito.

Ensaio das mesmas amostras, pelo método em validação e por um outro método de referência, podem, igualmente, serem empregados para avaliação da exatidão. Todavia, estes experimentos exigem que o laboratório tenha condições de operar adequadamente os dois métodos. Exatidão e precisão são geralmente dependentes da concentração do analito, devendo ser determinadas para um diferente número de concentrações. Na literatura sobre validações intralaboratoriais de métodos, um mínimo de três níveis de concentração, com três a dez replicatas por nível, é frequentemente recomendado (SOUZA, 2007).

Nos experimentos para avaliação da precisão, as variações entre ensaios devem representar o que normalmente acontece no laboratório em condições de rotina. Os materiais usados devem ser típicos em termos de tipos de matriz, devendo representar as amostras encontradas na aplicação do método. Variações de lotes e marcas de reagentes, analistas e equipamentos também devem ser representativas no delineamento dos parâmetros repetitividade e reprodutibilidade parcial (SOUZA, 2007).

Na área de alimentos, o sugerido é adotar os valores obtidos pelos modelos de HORWITZ (1982) e THOMPSON et al. (2000) para avaliar os resultados de precisão (Tabela 5).

As estatísticas para análise de dados com objetivo de avaliação da precisão, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade, estão bem estabelecidas pela ISO 5725 (ISO, 1994 a,b,c,d,e; ISO, 1998). Esta norma recomenda a análise de variância para este propósito, sendo citada em alguns documentos que tratam da validação intralaboratorial de métodos. A análise de variância assume várias premissas, como: os resíduos são variáveis aleatórias, normalmente distribuídas; os resíduos são homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X ; o resíduo de uma observação não é correlacionado com o resíduo em outra observação; os efeitos dos diferentes fatores são aditivos.

Em experimentos delineados somente sob condições de repetitividade, a estimativa direta do desvio padrão dos resultados é considerada (SOUZA, 2007).

TABELA 5 – Critérios de aceitabilidade para média e desvio padrão em função da concentração do analito

Exatidão ¹		Precisão ²	
Valor referência	Recuperação (%)	Valor referência	DP _R - σ_T ou σ_H
≥ 10 ppb	80 – 110	$c > 13,8\%$	$\sigma_T = 0,01c^{0,5}/mr$
> 1 ppb e < 10 ppb	70 – 110	≥ 120 ppb e $\leq 13,8\%$	$\sigma_H = 0,02c^{0,8495}/mr$
≤ 1 ppb	50 – 120	$c < 120$ ppb	$\sigma_T = 0,22c/mr$

*c = concentração teórica expressa como fração de massa ($1 \text{ ppb} = 1 \times 10^{-9}$), mr = fração de massa (ppb = 10^{-9})

σ_T = desvio padrão de reprodutibilidade estimado pela equação de Thompson

σ_H = desvio padrão de reprodutibilidade estimado pela equação de Horwitz

Fonte: ¹ EC (2002); ² HORWITZ (1982), THOMPSON (2000).

4.5 Limites de detecção e de quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2007).

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento, enquanto que a definição do limite de detecção do método (LDM) baseia-se na concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 % ou 99 % de confiança, de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz (INMETRO, 2007).

Na validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática, ou seja, obter a média das respostas conseguidas para amostras brancas mais três desvios padrão, considerando análise de sete ou mais amostras de branco. Quando o experimento for realizado com replicatas de amostras contendo o analito em baixa concentração, o limite de detecção corresponde a três desvios padrão das respostas obtidas (THOMPSON et al., 2002; INMETRO, 2007; SOUZA, 2007).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como

sendo a média das respostas obtidas para amostras brancas mais cinco, seis ou dez desvios padrão, considerando análise de sete ou mais amostras de branco. Algumas vezes, é também denominado de “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias (SOUZA, 2007). A diferença entre os Limites de Detecção e de Quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas (INMETRO, 2007).

5 REDUÇÃO DO TEOR DE FENILALANINA

Os grãos de cereais constituem a principal fonte alimentar da maioria das pessoas nos países em desenvolvimento, e esforços têm sido feitos no sentido de aumentar sua produção e utilização (FAGEER & TINAY, 2004).

Dentre os subprodutos dos cereais, a farinha de trigo ocupa um lugar relevante na alimentação do brasileiro, com grande utilização no preparo de alimentos, tanto em nível doméstico como industrial. Entretanto, sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos é proibida, visto que o teor de Phe presente neste alimento, encontra-se acima do permitido pela legislação brasileira (0,1 g/100g de alimento) (BRASIL, 2002). Neste sentido, é de grande interesse desenvolver uma farinha de trigo contendo teor reduzido de Phe, para que possa ser incorporada, sem restrições, na dieta de fenilcetonúricos,

O presente trabalho representa um passo relevante neste sentido, pois envolve 3 etapas do processo de obtenção desta farinha de trigo, sendo as duas primeiras representadas pela extração e hidrólise protéica. Estes procedimentos consistem em tratamentos enzimáticos das proteínas, no qual diferentes proteases e condições de reação são testadas (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009). Na terceira etapa, realiza-se a remoção de Phe, empregando-se o carvão ativado, como meio adsorvente (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Abaixo, estão descritas algumas características destas três etapas.

5.1 Extração protéica

A extração de proteínas alimentares envolve a aplicação de métodos químicos ou enzimáticos. Com relação aos primeiros, ressalta-se que diversas técnicas são descritas na literatura, envolvendo fontes protéicas variadas, assim como o estudo do efeito de alguns fatores sobre o rendimento da extração, como concentração da matéria-prima, tipo de solvente, temperatura e tempo de extração. Dentre os métodos químicos, os que empregam soluções alcalinas são os mais relatados na literatura, entretanto este procedimento pode causar reações secundárias indesejáveis e potencial toxicidade, tal como a formação do complexo lisinoalanina, acarretando perda do valor nutritivo das proteínas. Outra desvantagem do tratamento alcalino refere-se à ocorrência da reação de Maillard, a qual causa o escurecimento dos produtos e maior extração de componentes não protéicos, que co-precipitam com a proteína e diminuem a qualidade do isolado protéico (WANG et al., 1999).

Dentre os trabalhos relatados, que utilizaram a extração alcalina de proteínas alimentares, alguns podem ser citados. Assim HOJILLA-EVANGELISTA et al. (1992) recuperaram 57 % das proteínas do milho floculado, empregando uma solução de NaOH a 0,1mol/L. KAMPEN (1995) extraiu 85 % de proteínas do grão de milho, utilizando-se uma solução alcalina de NaOH a 0,1 mol/L, com valor de pH entre 9 e 12. De forma semelhante, NETTO & REIS (2006) realizaram a extração das proteínas do pseudocereal amaranto (*Amaranthus cruentus*), suspenso em uma solução alcalina de NaOH a 2mol/L, tendo sido obtido um conteúdo protéico entre 60 % e 63 %. Resultado inferior foi encontrado por AULER (2002) que, ao promover a extração protéica do amaranto, também com uma solução de NaOH a 2mol/L, obteve 29 % de rendimento de extração protéica (REP).

No Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, onde foi desenvolvido o presente trabalho, foi empregada uma solução alcalina (NaOH a 3mol/L, pH 12) para extrair as proteínas do fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007) e do arroz em grãos (LOPES et al., 2008), atingindo rendimentos de 76 % e 85 %, respectivamente.

O emprego de soluções salinas diluídas, também é relatado na literatura, e visa a solubilização das globulinas, que consistem na única fração protéica solúvel neste meio, e a consequente precipitação das proteínas insolúveis, albuminas, prolaminas e gluteninas, de acordo com a classificação de solubilidade de proteínas, de OSBORNE (1907), citado em SGARBIERI (1996). Porém, este processo não é muito vantajoso, pois a sua aplicação influencia as propriedades funcionais, reduzindo a capacidade

emulsionante e o índice de atividade emulsionante das proteínas alimentares (DUARTE et al., 1998). Outra desvantagem relatada na literatura refere-se à cristalização dos sais empregados (MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, 2000) e a necessidade de técnicas de diálise ou ultrafiltração para a retirada do sal (PRATA & SGARBIERI, 2005).

Apesar destes inconvenientes, o método químico utilizando diferentes soluções salinas, foi empregado para extrair proteínas de feijão (SHEHATA & THANNOUN, 1981), milho (FAGEER & TINAY, 2004), e farinha de soja desengordurada (SEIBEL & BELÉIA, 2008), tendo sido encontrado um REP de 80 %, 99 % e 47 %, respectivamente.

Em relação à extração das proteínas do trigo e de seus derivados, não foram encontrados trabalhos na literatura que relataram o emprego, em separado, de soluções alcalinas ou salinas. Na maioria dos casos, utilizou-se estas soluções em reações sequenciais com soluções alcoólicas ou ácidas, visando a recuperação das frações protéicas do trigo, separadamente.

Assim, MIFFLIN et al. (1983), no intuito de isolar a glutenina do trigo, realizaram, inicialmente, a extração da albumina e da globulina com solução de NaCl a 0,5 mol/L, seguida da extração da glutenina com solução etanólica a 70 % e, finalmente, a solubilização da glutenina com solução de ácido acético a 0,01 mol/L. Neste trabalho, não foi mencionado o valor do rendimento da extração, tendo sido informado apenas que este procedimento originou uma quantidade significativa de proteína no resíduo insolúvel, e a quantidade de glutenina obtida foi pequena. Em outro trabalho, FU & SAPIRSTEIN (1996) usaram sucessivamente, água destilada e deionizada, solução de NaCl a 2 % (p/v) e, por último, uma solução de n-propanol a 50 % (v/v) para extrair todas as proteínas monoméricas e algumas poliméricas da farinha de trigo, obtendo-se um rendimento entre 75 % e 82 %. De forma semelhante, para a extração das proteínas do glúten, MOHAMED & RAYAS-DUARTE (2003), empregaram uma solução de ácido acético a 0,1mol/L, seguida por uma de NaOH a 1mol/L. Entretanto, não foi informado pelos autores o rendimento da extração protéica obtido com este processo.

Apesar dos métodos químicos serem os mais comumente utilizados, estes vêm sendo paulatinamente substituídos pelo emprego de enzimas proteolíticas, devido à crescente preocupação de órgãos governamentais e do consumidor com a segurança alimentar. No que se refere aos métodos enzimáticos para a extração de proteínas alimentares, é importante ressaltar que as enzimas proteolíticas são empregadas para a solubilização protéica, à medida em que estas promovem o rompimento das ligações peptídicas, e, ainda, que as proteínas são mais suscetíveis ao ataque enzimático em sua forma desnaturada do que na nativa (FURLAN & OETTERER, 2002). A explicação para

este fato está associada à mudança da conformação globular ou filamentosa compacta da forma nativa, para uma conformação mais aberta da proteína desnaturada, permitindo um melhor acesso das enzimas proteolíticas a um maior número de ligações peptídicas, o que contribui para elevar o grau de hidrólise (SGARBIERI,1996).

Em relação à forma em que deve se apresentar a matéria-prima nos processos enzimáticos de extração das proteínas, EUBER et al. (1991) relataram que a única restrição é que esta esteja suficientemente fragmentada, para maximizar a área de superfície efetivamente exposta para a ação da enzima.

Várias enzimas têm sido empregadas com esta finalidade, sendo que as matérias-primas, mais comumente utilizadas, consistem da soja e de cereais. No caso da soja, dois trabalhos foram encontrados na literatura. Assim, FREITAS et al. (1998), estudando a incubação em meio aquoso do grão de soja extrusado, com enzimas celulolíticas e proteolíticas obtiveram um rendimento de 74 % na extração das proteínas. FISCHER et al. (2001) avaliaram a extração de proteínas da farinha de soja desengordurada, pelo uso de preparações enzimáticas contendo uma endoprotease (alcalase do *Bacillus licheniformis*), um complexo de proteases (flavourzima do *Aspergillus oryzae*), seguido de uma preparação de carboidrase do *Aspergillus aculeatus* e do *Humicola insolens*. O uso das proteases mostrou-se eficiente na obtenção de 89 % a 94 % das proteínas da farinha de soja, já as carboidrases não contribuíram na extração das proteínas. Entretanto, os autores sugeriram que a extração incompleta se deve à interferência da matriz, provavelmente devido às interações entre proteínas e outros constituintes da amostra.

Quanto aos cereais, o arroz foi a única matéria-prima utilizada por outros autores, para a extração enzimática de suas proteínas, não tendo sido encontrados na literatura trabalhos abordando a utilização de enzimas na extração das proteínas da farinha de trigo. Assim, EUBER et al. (1991) utilizaram um sistema de amilase e diferentes tipos de proteases, variando-se, apenas, para esta última, a relação enzima:substrato (1 % a 4%), pH (6,5 a 9,0), tempo (1 a 5 h) e temperatura (40 °C a 60 °C) de reação hidrolítica, a fim de se obter o concentrado protéico. Os resultados alcançados foram específicos para cada tipo de protease utilizada, obtendo-se 47 % de rendimento de extração ao se empregar uma protease alcalina bacteriana (Alcalase, Novo, Wilton, CT), 61 % com a utilização de uma protease neutra de origem fúngica (Prozyme 6, Amano International Enzyme Co., Inc., Troy, VA), e 75 % pela ação da pancreatina.

Em um estudo conduzido por TANG et al. (2002), foi avaliado o emprego de uma amilase e da protease de *Aspergillus sp*, associadas ou não com processos físicos, na

extração de proteínas do arroz desengordurado, registrando-se 62 % e 67 % de extração, respectivamente. Por outro lado, WANG & WANG (2004) utilizaram uma protease neutra do *Bacillus subtilis*, combinada com o ultrassom no intuito de obter, separadamente, o amido do arroz e obtiveram, no resíduo, um conteúdo protéico máximo de 0,9%.

No Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, onde foi realizado o presente trabalho, o método enzimático, empregando-se enzimas e condições de reações variadas, foi utilizado para a extração das proteínas do fubá de milho, da farinha de arroz e do feijão. Assim, CAPOBIANGO et al. (2007) utilizaram a enzima de *Bacillus licheniformis* (Protemax[®] 580L) na relação enzima:substrato (E:S) de 1:10, para extrair as proteínas do fubá de milho, sendo os melhores resultados obtidos a 5, 15 e 24 h a 55 °C, alcançando a média de 84 % de rendimento. Já, SILVESTRE et al. (2009), obtiveram um menor valor de rendimento de extração protéica (REP), 63 %, utilizando na extração das proteínas da farinha de arroz, uma enzima de *Bacillus subtilis* (Protemax[®] N200) na relação E:S de 10:100, concentração inicial de matéria-prima a 1:10 (p/v), sem emprego do tratamento físico, no pH 10,5 e a 50 °C. LOPES Jr. (2008), obteve, para o feijão, um elevado valor de REP (93 %) utilizando-se uma enzima de *Bacillus licheniformis* na relação enzima:substrato (E:S) de 10:100, durante 3 h de reação e no pH inicial de 10,5.

5.2 Hidrólise protéica

A hidrólise de proteínas consiste na clivagem de suas ligações peptídicas, empregando-se um método ácido, alcalino ou enzimático, sendo que apenas este último promove a liberação de peptídeos de diferentes tamanhos, além dos aminoácidos livres. Cada metodologia apresenta vantagens e desvantagens, dependendo da sua utilização e dos objetivos a serem alcançados (BERNARDI, 2000).

O tratamento químico consiste num processo de difícil controle, que origina produtos com reduzida qualidade nutricional, podendo destruir alguns aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar racemização de outros (ADLER-NISSEN, 1981; LAHL & BRAUN, 1994; CLEMENTE, 2000). Além disso, no final do processo de hidrólise ácida, quando ocorre a neutralização do ácido formado pela adição de uma base, observa-se uma elevada formação de sal no hidrolisado (FURLAN & OETTERER, 2002). Dessa forma, os processos químicos não são facilmente aceitos, principalmente devido à crescente preocupação do consumidor quanto à segurança alimentar.

O tratamento enzimático, utilizando proteases específicas, apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, tais como, a especificidade de ação, o maior controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, menor conteúdo de sal no hidrolisado final e formação mínima de subprodutos (CHEFTEL et al., 1989; MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995). A hidrólise enzimática, ainda, dá origem a oligopeptídeos que nutricionalmente são superiores à uma mistura de aminoácidos livres e apresentam um elevado potencial para o preparo de formulações hipoalergênicas (ANANTHARAMAN & FINOT, 1993). Além disto, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é, frequentemente, desnecessária ou mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser utilizados em concentrações maiores (REED, 1975).

Por outro lado, uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática consiste no desenvolvimento de sabor amargo, cuja intensidade depende do grau de hidrólise e da especificidade da protease, ou seja, do tamanho dos peptídeos gerados e da intensidade de quebra das ligações. Acredita-se que o sabor amargo decorra da exposição de aminoácidos ou grupos hidrofóbicos ao ambiente aquoso, pois o peso molecular dos peptídeos é tal que eles não podem se esconder dentro da molécula protéica, o que ocorreria normalmente na proteína intacta (MINAGAWA et al., 1989; FURLAN & OETTERER, 2002). Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (ADLER-NISSEN, 1981; MINAGAWA et al., 1989). Segundo FREITAS et al. (1998), o controle da quantidade de enzima utilizada na hidrólise pode promover a formação de peptídeos de peso molecular maiores que aqueles responsáveis pelo desenvolvimento de sabor amargo.

Com o objetivo de reduzir ou mascarar uma possível presença deste sabor indesejável nos hidrolisados protéicos, algumas técnicas têm sido sugeridas, entre elas a aplicação da cromatografia de interação hidrofóbica; o tratamento com carvão ativado; a hidrólise com exopeptidases; a formação de plasteína, a extração com solventes orgânicos e o uso de ciclodextrinas (STEVENSON et al., 1999; MARTINS, 2005; ASTRAY et al., 2009). Além do mascaramento do gosto amargo, a reação da plasteína é útil para a incorporação de tirosina e triptofano, parcialmente perdidos durante a hidrólise enzimática (MIRA & MARQUEZ, 2000). Entretanto, esta técnica apresenta limitações associadas à toxicidade e, ainda, à reversibilidade e ao baixo rendimento da reação (PEDERSEN, 1994; STEVENSON et al., 1999).

No Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, onde foi realizado o presente trabalho, a técnica de encapsulamento em lipoesferas e lipossomas foi

desenvolvida e empregada, com êxito, no sentido de reduzir o sabor amargo dos hidrolisados de caseína, obtidos pela ação da papaína (MORAIS et al., 2005).

5.2.1 Fatores interferentes

Por se tratar de uma reação enzimática, visando à obtenção de produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor (SVENNING et al., 1993), algumas variáveis devem ser controladas, tais como pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima/substrato (E:S) e inativação enzimática ao final do processo. Deve-se dispor, também, um bom método para a determinação do grau de hidrólise (CÂNDIDO, 1998).

Vários trabalhos, realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, mostraram a influência desses parâmetros hidrolíticos na obtenção de perfil peptídico nutricionalmente adequado, especialmente no que se refere ao teor de oligopeptídeos (MORATO et al., 2000; MORAIS et al., 2004, 2005; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SOARES et al., 2007; SOUZA et al., 2008).

A escolha da enzima proteolítica é de extrema importância, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos, além dos aminoácidos que deverão se apresentar na forma livre (CHATAUD et al., 1988; HAQUE & MOZAFFAR, 1992).

Na produção de hidrolisados, a associação de enzimas de ampla especificidade tem sido, igualmente, empregada, levando a uma hidrólise extensa, com maior porcentagem de pequenos peptídeos e de aminoácidos, portanto melhor composição (REED, 1975; GUADIX et al., 2000). Com o intuito de se obter hidrolisados para serem usados em formulações especiais, tem-se utilizado, preferencialmente, uma reação sequencial de endopeptidases e exopeptidases. O uso inicial de endopeptidases facilita a ação das exopeptidases em uma segunda etapa, acarretando uma degradação mais completa (CLEMENTE, 2000).

A ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada por alguns autores, visando a interrupção da reação hidrolítica, empregando-se temperaturas na faixa de 80 °C a 90 °C, por 10 a 20 min. (MINAGAWA et al., 1989; LOOSEN et al., 1991; NAKAMURA et al., 1993). Segundo KILARA (1985), o tempo requerido para atingir um

determinado grau de hidrólise diminui exponencialmente com o crescente aumento da temperatura da reação, até o momento em que a inativação enzimática pelo calor se torna significativa. Como as enzimas são termolábeis, o aumento da temperatura acarreta a perda gradual de suas propriedades catalíticas, até atingir a inativação total, na temperatura máxima. Deste modo, se por um lado as temperaturas mais elevadas aumentam o rendimento das reações enzimáticas, por outro, podem provocar a inativação da enzima, dependendo do calor aplicado (REED, 1975).

5.2.2 Importância

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, tais como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL, 1993). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor dos produtos *in natura* (CHEFTEL et al., 1989).

No Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, proteases variadas foram utilizadas em estudos sobre propriedades funcionais de proteínas do leite e do sangue bovino, tendo sido mostrado que o efeito positivo da hidrólise enzimática depende da fonte protéica e das condições hidrolíticas empregadas (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2003 a,b; VIANA et al., 2005; VIEIRA et al., 2006; BIASUTTI et al., 2007).

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas pelo tratamento enzimático, uma vez que diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE et al., 1985; VIJAYALAKSHIMI et al., 1986; RÉRAT et al., 1993; FRENHANI e BURINI, 1999; BOZA et al., 2000). Assim sendo, um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética consiste na sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos (VIJAYALAKSHIMI et al., 1986).

Os hidrolisados enzimáticos são, geralmente, destinados a três grandes grupos no âmbito da Nutrição Clínica: formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo,

como a PKU e a fibrose cística; formulações especiais para adultos com função gastrointestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos; e suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (FRENHANI & BURINI, 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000; TRAHMS, 2002).

Em vários trabalhos, realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, a hidrólise enzimática foi utilizada no intuito de elevar o teor de oligopeptídeos de hidrolisados protéicos (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2001, 2004; MORAIS et al., 2005; BARBOSA et al., 2004; LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006; AFONSO et al., 2008).

5.2.3 Proteases

As proteases, também chamadas de proteinases (REED, 1975), são enzimas que catalisam a hidrólise das proteínas. Segundo BEYNON & BOND (2001), pertencem à classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. As enzimas proteolíticas consistem de um grupo grande e complexo, que diferem entre si de acordo com as especificidades pelo substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, atividade e estabilidade térmica e em diferentes valores de pH (BEYNON & BOND, 2001).

São divididas em endopeptidases e exopeptidases (REED, 1975), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (RAO et al., 1998; CLEMENTE, 2000). As endopeptidases atuam, preferencialmente, nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N - e C - terminal, sendo que a presença de grupos amino ou carboxila livres exercem um efeito negativo na atividade da enzima. Já, as exopeptidases atuam, somente, nos finais das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, região N - ou C- terminal, são classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. Estas enzimas são divididas em quatro subgrupos, de acordo com seu mecanismo catalítico: serino proteases, aspártico proteases, cisteíno proteases, e metaloproteases, e podem ser produzidas a partir de plantas, animais ou microorganismos (RAO et al., 1998).

Aproximadamente, 60 % do total das enzimas industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Nesta última, as proteases são utilizadas como auxiliares no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, laticínios, chocolate, ovos, produtos à base de ovos, carne, peixe e

legumes e na produção de proteína hidrolisada e flavorizantes (FURLAN & OETTERER, 2002).

5.2.3.1 Bromelina

Bromelina é o nome dado ao extrato de proteases provenientes dos vegetais da família *Bromeliaceae*, sendo que o abacaxi é a mais rica fonte destas enzimas (GUPTA et al., 2003; HEBBAR et al., 2008). Constitui uma extraordinária mistura de diferentes tiolendopeptidases e outros componentes como fosfatases, glucosidases, peroxidases, celulasas, glicoproteínas e carboidratos (ROWAN et al., 1990; HAQ et al., 2005). É um produto altamente comercial, que não é produzido no Brasil (LOPES et al., 2005).

A bromelina pertence ao grupo das cisteíno proteases, juntamente com as outras proteases de origem vegetal, a papaína (obtida do mamão) e a ficina (do figo), e a enzima microbiana *Streptococcus sp.* A similaridade destas enzimas deve-se ao fato de todas serem inibidas por reagentes sulfidrílicos, e terem a mesma sequência de aminoácidos ao redor dos resíduos de cistina e histidina do sítio ativo (WHITAKER, 1994).

A bromelina pode ser extraída de diversas partes do abacaxi como polpa, talo, caule, folhas e raízes (BABU et al., 2008), apresentando massa molecular próxima de 31.000 Da (HARRACH et al., 1998). As enzimas proteolíticas encontradas no talo recebem o nome de bromelina do talo e têm o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto e têm o número sistemático EC 3.4.22.5. Estas duas enzimas diferem, basicamente, na sequência de aminoácidos de sua composição, sendo imunologicamente diferentes, certamente produtos de genes distintos. A bromelina produzida e utilizada industrialmente consiste em uma mistura das duas (ROWAN et al., 1990; BABU et al., 2008).

A bromelina atua, primariamente, por ação proteolítica direta, hidrolisando ligações peptídicas, preferencialmente onde forem encontrados resíduos de alanil, glicil e leucil. Esta ação proteolítica ocorre sobre as proteínas solúveis, assim como sobre as proteínas estruturais de membrana, principalmente nos receptores e marcadores de superfície (MAURER, 2001, HALE et al., 2005). Possui, ainda, atividade tiol-redutase, promovendo a ruptura de pontes dissulfeto entre cadeias peptídicas (MAURER, 2001).

Comparando-a com outras proteases, como a papaína, a bromelina é de mais fácil obtenção e aparece em maiores quantidades, em razão de sua presença na fruta, como também na planta do abacaxi. Apesar de não estar presente nos primeiros

estágios de desenvolvimento do fruto, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, quando apresenta um pequeno decréscimo. Outra vantagem da utilização das proteases do abacaxi, em comparação com outras proteases vegetais, refere-se ao fato de que o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases, no estado maduro (CÉSAR, 2005). Entretanto, a quantidade produzida ainda é pequena, em relação às necessidades de mercado, o que a torna um produto de alto valor comercial (PIZA, 1997). O preço no catálogo da Sigma (2000) de um preparado, parcialmente purificado, é de cerca de US\$ 450//Kg e o preço da enzima usada, industrialmente, é em média 20 % menor que este. O valor comercial, assim como sua atividade aumentam proporcionalmente à sua pureza (MEINIG, 1999).

MOORE & CAYGILL (1979) mostraram que a atividade proteolítica da enzima depende de vários fatores, como variedade, parte e idade da planta da qual é extraída e decresce com a maturidade da fruta. Foi verificado por ROWAN et. al. (1990), que a bromelina do fruto possui uma atividade proteolítica maior que a do talo em diversos substratos protéicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e à temperatura de 70 °C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60 °C e pH 7,0.

As preparações de bromelina são impuras e, geralmente, os principais contaminantes são outras enzimas proteolíticas e não proteolíticas, tais como as fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidases (MURACHI, 1960). SUH et al. (1992) purificaram a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza, respectivamente) por cromatografia de filtração em gel, e obtiveram massas moleculares em 32,5 e 37 kDa, respectivamente, com rendimento de 23 % em atividade. MURACHI (1960) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de filtração em gel, e determinou que a massa molecular da fração pura foi de 28 kDa. ROWAN et al. (1990) relataram a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*), como sendo bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

A matéria-prima mais empregada para obtenção de bromelina são os talos maduros de abacaxizeiros, utilizando-os após a colheita das frutas. No entanto, podem ser utilizadas também folhas, suco, cascas e resíduos. A porção central do talo contém mais proteases do que a parte mais externa, sendo que a bromelina aparece, em maior concentração na porção inferior dos talos de plantas maduras (BALDINI et al., 1993).

Existem, na literatura, diversos trabalhos sobre as propriedades da bromelina, extraída de plantas de abacaxi, especialmente do cultivar *Smooth Cayenne*. O uso de bromelina é variado, sempre fundamentado em sua propriedade proteolítica (BALDINI et

al., 1993). Na farmacologia, segundo MEINIG (1999), o primeiro efeito da bromelina relatado foi como digestivo, substituindo a pepsina e a tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. É utilizada também no tratamento de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas e sinusites. Faz parte de componentes ativos de fármacos, que ativam a circulação sanguínea, e a respiração, pois suprimem os depósitos protéicos em veias e artérias. Nas terapias contra o câncer, é utilizada no aumento de lises de células cancerosas. Recentemente, tem sido relatado que as proteases extracelulares exercem um papel específico regulatório na modulação da resposta imune e, também, podem agir como sinalizadoras em processos de mutagêneses (MYNOTT et al., 1999). A bromelina promove o aumento nos níveis de antibióticos, quando administrados concomitantemente (WINTER, 1990).

Além disso, essa enzima apresenta diversas aplicações importantes nas indústrias de alimentos: no amaciamento de carnes, pois degrada suas proteínas conjuntivas, tornando possível este amaciamento; na produção de biscoitos, a partir de farinhas de trigo com alto teor protéico; na produção de ovos desidratados; na preparação de leite de soja e isolados protéicos, e nas cervejarias, para clarificação da cerveja, hidrolisando certos complexos proteínas-taninos formados durante a fermentação (FREIMAN & SABAA-SRUR, 1999). Outras aplicações para a bromelina referem-se ao tratamento de couros, nas indústrias têxteis, para amaciamento de fibras e, também, na produção de detergentes.

5.3 Remoção de fenilalanina

As pesquisas visando à produção e à utilização de proteínas hidrolisadas com teor reduzido de Phe, iniciaram-se nos anos 70, no Japão (MIRA & MARQUEZ, 2000), procurando atender a necessidade especial da dieta dos fenilcetonúricos, que preconiza a baixa ingestão de proteínas. Além disso, o fornecimento de proteínas hidrolisadas de alto valor biológico, com baixo teor de Phe, reduz a osmolaridade das dietas, comparando-as com aquelas formuladas apenas com a mistura de aminoácidos livres (ARAI et al., 1986).

5.3.1 Métodos de remoção da fenilalanina

Considerando que a Phe está presente em todas as proteínas de origem animal e vegetal, na proporção de 3 a 6%, vários métodos têm sido propostos com o intuito de

reduzir este aminoácido de alimentos (OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999). A escolha do procedimento deve sempre considerar a praticidade, a reprodutibilidade e a relação custo/eficiência, além de resultarem em produtos palatáveis e seguros (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993).

Os métodos mais utilizados envolvem uma hidrólise ácida ou enzimática de uma proteína de alto valor biológico, seguida da remoção de Phe, realizada através de técnicas e procedimentos diferenciados, como o uso de carvão ativado (CA), da peneira molecular e da cromatografia de troca iônica (KITAGAWA et al., 1987; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993; OUTINEN et al., 1996). A desaminação, com a enzima fenilalanina amônia liase, também é sugerida (MACDONALD & D'CUNHA, 2007).

LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) relataram que a hidrólise enzimática parece ser a alternativa mais viável para preparar produtos com baixos teores de Phe, tanto pelo aspecto econômico quanto pelo menor dano aos aminoácidos associados, em comparação às hidrólises ácidas ou alcalinas.

OUTINEN et al. (1996) utilizaram as resinas de adsorção XAD-4 e XAD-16, removendo de 92 a 100 % da Phe de hidrolisados pancreáticos de diversas fontes protéicas. DE HOLANDA & VASCONCELOS (1989) desenvolveram um método em que a Phe foi removida de um hidrolisado ácido de caseína com a resina de adsorção XAD-4. Este tratamento reduziu o teor de Phe na caseína de 3,42 para 1,35 g Phe/100 g de alimento, ficando este valor acima do que pode ser utilizado por pacientes com PKU, que de acordo com a legislação brasileira é de 0,1g Phe/100g de alimento (BRASIL, 2002).

Vários autores utilizaram o CA para a remoção de Phe, obtendo-se resultados satisfatórios. Assim, KITAGAWA et al. (1987) removeram 97 % de Phe dos hidrolisados de soro de leite, enquanto que SHIMAMURA et al. (1999), trabalhando com a mesma matéria-prima e o CA, removeram entre 85 a 95 % de Phe. De forma semelhante, este mesmo adsorvente foi utilizado por LOPEZ-BAJONERO et al. (1991), em hidrolisados de caseína comercial e de leite em pó desnatado, preparados pelo emprego de uma protease produzida pelo *Aspergillus oryzae* e da papaína, respectivamente, removendo, em ambos os hidrolisados, 92 % da fenilalanina. Ainda, MOSZCZYNSKI & IDIZIAK (1993) realizaram um estudo comparativo entre diferentes suportes, a fim de se avaliar a eficiência de remoção de Phe dos hidrolisados de caseína, preparados através da associação das enzimas quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase.

Para tal, foram empregados quatro tipos de carvão ativado (ácido, básico, neutro e grau analítico), três tipos de resinas de troca iônica Amberlite (IRA-458, IRA-401 e IRA-40Q) e a filtração em peneira molecular Sephadex G-15, sendo que, dentre eles, o carvão ativado de grau analítico mostrou ser o suporte que proporcionou a maior remoção de fenilalanina (89,5 %).

Em estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, o carvão ativado foi utilizado, com eficiência, na remoção de Phe de proteínas hidrolisadas de leite em pó desnatado (94 % a 99 %) (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), de soro de leite em pó (75 % a 99 %) (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007) de arroz em grãos (85 % a 100 %) (LOPES et al., 2008), de farinha de arroz (26 % a 94 %) (SILVESTRE et al., 2009), de fubá de milho (69 % a 98 %) (CAPOBIANGO et al., 2007) e de feijão (25 % a 88 %) (LOPES Jr., 2008).

5.3.2 Métodos de quantificação do teor de Phe

Visando a determinação do teor de fenilalanina em proteínas hidrolisadas, vários métodos já foram descritos na literatura, tais como a cromatografia gasosa (MAYADUNNE et al., 2005); a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (DENG et al., 2002); a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1986); a HPLC de fase reversa (ZEZZA et al., 1992); a HPLC de troca iônica (CABRERA-PADILLA et al., 2009; GALVÃO et al., 2009); o sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999) e a espectrofotometria derivada segunda - EDS (O'HARVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; RAGONE et al., 1984; ROJAS et al., 1988; SILVESTRE et al., 1993).

Outro método cromatográfico foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do presente trabalho, baseado na cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), que permitiu a determinação, não apenas da Phe, mas dos demais aminoácidos essenciais, em hidrolisados enzimáticos de caseína preparados pela ação da pepsina, subtilisina e tripsina, isoladamente e associadas entre si (CARREIRA et al., 2002).

5.3.2.1 Espectrofotometria derivada segunda (EDS)

A EDS é uma técnica analítica simples, rápida e de custo relativamente baixo, tendo sido considerada por vários autores como um método quantitativo e qualitativo vantajoso, de grande utilidade. Baseia-se na derivação do espectro de absorção normal

dos compostos analisados, utilizando-se as contribuições individuais dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), uma vez que esses apresentam bandas de absorção características na região do ultravioleta, entre 230 nm e 310 nm, possibilitando-se, assim, quantificá-los (O'HARVER, 1974; RAGONE et al., 1984; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988; MICLO et al., 1995).

Diversos autores têm relatado a eficiência da EDS para quantificar resíduos de Phe, Tyr e Trp em proteínas ou em hidrolisados protéicos. Assim, ICHIKAWA & HIROSHI (1977, 1979, 1981a,b) observaram a eficiência da EDS para medir Phe em proteínas ou em hidrolisados protéicos. Estes autores, primeiramente, examinaram resíduos de Phe em proteínas e demonstraram que entre 245 nm e 270 nm os resíduos de aminoácidos de tirosina e triptofano não causam diferença significativa nas propriedades da Phe. Dois anos mais tarde, determinaram a Phe, por este método, em proteínas desnaturadas, encontrando resultados que concordavam com os descritos na literatura. Vários autores têm relatado a grande confiabilidade do uso da EDS, entre 245 e 270 nm, para quantificar os resíduos de Phe em proteínas, desde que as variáveis como o pH e a adição de outras substâncias sejam controladas (BRANDTS & KAPLAN, 1973; O'HARVER, 1974; MATSUSHIMA et al., 1975; ICHIKAWA & HIROSHI, 1977, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; ICHIKAWA & HIROSHI, 1981a,b; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988).

SILVESTRE et al. (1993) utilizaram a EDS, pela primeira vez para se avaliar a pureza de hidrolisados comerciais, indicando a adição de aminoácidos livres, de proteínas nativas ou mesmo de hidrolisados com diferentes graus de hidrólise. Além disso, esses autores demonstraram que a intensidade dos picos, no espectro de derivada segunda de proteína e peptídeos, está relacionada com a exposição dos aminoácidos aromáticos, sendo maior quanto mais próximo o grupamento aromático estiver da posição C - ou N -terminal.

Ressalta-se, ainda, que no mesmo laboratório do presente trabalho, a EDS foi utilizada para a quantificação de Phe em várias fontes protéicas, tais como leite em pó (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), arroz em grãos (LOPES et al., 2008), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), feijão (LOPES Jr., 2008) e farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009).

6 CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS

A caracterização dos hidrolisados, de interesse nutricional, tem por objetivos a determinação do grau de hidrólise; a avaliação da distribuição dos peptídeos, de acordo com a massa molecular e o tamanho da cadeia; a identificação de peptídeos bioativos; a determinação da especificidade de novas endoproteases, além da verificação e localização de modificações químicas na estrutura primária dos peptídeos, incluindo, alterações nas cadeias laterais de alguns aminoácidos e glicação dos aminoácidos por açúcares redutores (JOST et al., 1991; VISSER et al., 1992; GONZÁLES-TELLO et al., 1994; LÉONIL et al., 2000).

Para que estes objetivos sejam alcançados, são realizadas análises qualitativas e quantitativas. No primeiro caso, a caracterização dos hidrolisados baseia-se no fracionamento e posterior identificação dos seus peptídeos, no intuito de conhecer o seu perfil peptídico (VERNEUIL et al., 1990; AUBRY et al., 1992).

A introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídeos promove uma melhor utilização das proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade. Assim, os hidrolisados protéicos vêm sendo usados na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção, fenilcetonúria e pessoas com alergia a proteínas (CLEMENTE, 2000; LI-JUN et al., 2008). Além disto, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de pacientes HIV positivos (BOUNOUS et al., 1993), idosos (PALLAS, 2002), na nutrição de esportistas (PIMENTA et al., 2006), como também, em dietas para controle de peso (AOYAMA et al., 2000).

Inúmeros métodos têm sido relatados na literatura, visando o fracionamento de hidrolisados protéicos.

A utilização da HPLC com microcolunas de diâmetro inferior a 1mm é, normalmente, empregada no fracionamento de peptídeos, principalmente quando se tem pequena quantidade de amostra. DAVIS & LEE (1992) empregaram esta técnica, chamada de HPLC-capilar, na separação de peptídeos provenientes da hidrólise do citocromo C por uma endoprotease (endo Lys C), tendo apresentado resultados associados com o tamanho dos pepetídeos.

A cromatografia de troca iônica é um outro método também utilizado para analisar estes compostos, sendo relatado por DIZDAROGLU et al. (1985) a eficiência desta

técnica em fracionar os hidrolisados trípticos do citocromo C e da lisozima, visto que o número de picos detectados, para estes último composto, corresponde aproximadamente, ao número de fragmentos esperados para uma digestão tríptica da lisozima.

A cromatografia de troca ligante, que envolve a formação de complexos com íons metálicos, especialmente Cu (II) é capaz de fracionar peptídeos e aminoácidos de hidrolisados protéicos, de acordo com o tamanho molecular. Isto ocorre devido à baixa afinidade dos peptídeos pela fase estacionária imobilizada com íons metálicos, comparando-se com os aminoácidos livres (SALMONA et al., 1982).

Devido à simplicidade e rapidez, a SDS-PAGE foi utilizada por SCHIMIDT & POLL (1991) para estimar a distribuição de peptídeos por pesos moleculares. Entretanto, esta técnica não permitiu a identificação dos oligopeptídeos, os quais são arrastados no momento da coloração e lavagem do gel.

A técnica da HPLC, especialmente a de fase reversa (RP-HPLC), mostrou-se eficiente para separar peptídeos, além de fornecer informações sobre a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade destes (LEMIEUX et al., 1991; VAN DER VEN et al., 2002). Contudo, apesar de apresentar um alto poder de resolução, o método de RP-HPLC permite, apenas, uma caracterização parcial de hidrolisados protéicos. Isto ocorre pelo fato de que os critérios de separação entre as fases, baseiam-se na hidrofobicidade ou nas cargas dos peptídeos, não sendo adequados para a caracterização do ponto de vista nutricional, em que a qualidade está associada com o tamanho do peptídeo.

A cromatografia de exclusão molecular ou de filtração em gel, especialmente quando aplicada no modo de alta eficiência (SE-HPLC), tem sido citada como uma importante técnica para investigar o perfil de peptídeos em hidrolisados protéicos. Diferentes materiais têm sido elaborados como suporte para separar os peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia. Muitos géis são estudados no intuito de se definir qual é o mais adequado para determinado aminoácido ou peptídeo. Por exemplo, os géis Sephadex G-25 (AMIOT & BRISSON, 1980; ZHANG et al., 1992), Sephadex G-10 (LANDRY et al., 1988) e o Bio-gel P-2 (ILIEV & TCHORBANOV, 1992) foram utilizados por vários autores para a determinação do triptofano em hidrolisados de leite.

LEMIEUX et al. (1991) compararam a utilidade de cinco métodos cromatográficos para fracionar um hidrolisado protéico de caseína comercial. O melhor sistema para se avaliar a distribuição do peso molecular consistiu no emprego da SE-HPLC. A combinação de SE-HPLC e RP-HPLC mostrou ser eficiente no fracionamento de peptídeos fosforilados e desfosforilados de hidrolisado de caseína, além da identificação

de mais de 200 destes compostos (LEMIEUX et al., 1991). Apesar destes resultados positivos, o emprego da técnica de SE-HPLC é ainda limitado por diversos fatores, tais como as interações secundárias, eletrostáticas ou hidrofóbicas, entre os solutos e a fase estacionária e, ainda, a ineficácia em separar pequenos peptídeos (KOPACIEWICZ & REGNIER, 1982; LEMIEUX et al., 1991; GOLOVCHENKO et al., 1992).

Buscando minimizar estes problemas, SILVESTRE et al. (1994a) desenvolveram um método eficiente para este fim, empregando a SE-HPLC. Assim, uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica (PHEA) foi utilizada, o que possibilitou o fracionamento de peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da.

A EDS foi empregada por SILVESTRE et al. (1993b) para analisar hidrolisados de caseína. Com este método, os autores estimaram o grau de hidrólise e a homogeneidade dos hidrolisados (presença de hidrolisado protéico ou mistura de aminoácidos).

Na análise quantitativa de hidrolisados protéicos, metodologias variadas têm sido empregadas na determinação dos teores de seus constituintes, sendo que as técnicas utilizadas são baseadas na quantificação direta ou no fracionamento prévio dos diferentes constituintes, seguido de um método de dosagem (MINAGAWA et al., 1989; ADACHI et al., 1991; LEMIEUX et al., 1991; PIHLANTO-LEPPALA et al., 2001).

A determinação do teor de aminoácidos livres, empregando-se o analisador de aminoácidos, é um processo muito utilizado nos estudos de hidrolisados protéicos (CHANG et al., 1973; VERNEUIL et al., 1990; ARMSTEAD & LING, 1991; AUBRY et al., 1992; ZHANG et al., 1992). Entretanto, os resultados obtidos por estas estimações diretas representam, apenas, um conhecimento parcial da composição dessas misturas complexas. Por isto, é importante utilizar inicialmente um método cromatográfico, para a separação de peptídeos e aminoácidos e, posteriormente, um método de dosagem, a fim de melhor caracterizar os hidrolisados protéicos (SILVESTRE et al., 1993).

Uma outra técnica proposta fundamenta-se na determinação contínua de compostos nitrogenados de frações cromatográficas. Contudo, apesar de sua precisão, esta metodologia é longa e trabalhosa. A medida da absorbância em ultra-violeta (UV), a 280 nm, consiste em uma técnica rápida e apresenta-se como uma alternativa. Neste caso, porém, peptídeos que não contém aminoácidos aromáticos não são detectados (HERNANDEZ & ASENJO, 1982; KEOHANE et al., 1985). Por outro lado, a medida da absorbância pode ser útil no caso de dosagem de um aminoácido aromático,

previamente separado dos outros aminoácidos por um método cromatográfico (ILIEV & TCHORBANOV, 1992).

SILVESTRE et al. (1994) desenvolveram um método rápido para quantificar peptídeos das frações obtidas por SE-HPLC, baseado na medida da absorbância no UV, após correções devido à presença de aminoácidos aromáticos, utilizando a multidetecção em três comprimentos de onda (230, 280 e 300 nm). Os resultados obtidos apresentaram boa correlação com a determinação clássica de aminoácidos e, segundo os autores, esse método pode ser usado como uma boa alternativa para caracterizar hidrolisados protéicos.

Na verdade, este método já foi largamente utilizado no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, para a quantificação de peptídeos e de aminoácidos livres de hidrolisados provenientes de várias fontes protéicas, tais como a caseína (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2004; BARBOSA et al., 2004; MORAIS et al., 2005), leite em pó (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006), soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; AFONSO et al., 2008) e concentrado protéico de soro de leite (SILVA, 2009).

Da mesma forma, a EDS foi utilizada neste mesmo laboratório para a avaliação do grau de encapsulação de hidrolisados enzimáticos de caseína (MORAIS et al., 2004), assim como na determinação de aminoácidos aromáticos de hidrolisados enzimáticos de leite em pó (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006), de soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), de fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), de arroz (LOPES et al., 2008), de farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009) e de concentrado protéico do soro de leite (SILVA, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Estas referências bibliográficas incluem as citadas na Introdução e na Revisão de Literatura.

- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: IDF (Inter. Dairy Fed.) *Sem. Prot. Fat Glob Modif.*, p. 97-105, 1993.
- ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. Estatísticas. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/banco_de_dados.asp>. Acesso em: 8 jan. 2006.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI S. Protocolo 1 – *Phenylketonuria* (PKU). In: Ross Products Division, Abbott Laboratories. The ross metabolic formula system - *Nutricion support protocol*. 3.ed. Columbia: Keziaz Strvat, 1997.
- ADACHI, S.; KIMURA, S.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v.55, n.4, p.925-932, 1991.
- ADLER-NISSEN, J. Processamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29-33, 1981.
- AFONSO, W.O.; BIASUTTI, E.A.R.; CASTRO, V.M.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Utilização do soro de leite visando reduzir a poluição ambiental: hidrólise pela pancreatina. *Tecno-lógica*, v. 12, n. 2, p. 7-16, 2008.
- AGUIAR, M.J.B. Genetic services and research in the state of Minas Gerais. *Brazil. Comm Genet*, v. 7, n. 4, p. 117-120, 2004.
- ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.
- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, n. 2, p.187-192, 2001.
- AMIOT, J.; BRISSON, G.J. Continuous automatic nitrogen determination for gel chromatography of protein enzymatic hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v.193, p.496 - 499, 1980.
- ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P.A. Nutritional aspects of food protein in relation to technology. *Food Rev. Int.*, v. 9, p. 629-655, 1993.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: FIBGE, v.53, p.1-30, 1993.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *AOAC Peer-verified methods program. Manual on policies and procedures*. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 1998. 35 p.
- AOYAMA, T.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (Yellow KK). *Nutrition*, v. 16, p. 349-354, 2000.
- ARAI, S.; MAEDA, A.; MATSUMURA, M.; HIRAO, N.; WATANABE, M. Enlarged scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.*, v.50, n.10, p.2929-2931, 1986.
- ARAUJO, D.M.; SILVA, J.H.V.; ARAÚJO, J.A.; TEIXEIRA, E.N.M.; FILHO, J.J.; RIBEIRO, M.L.G. Farelo de trigo na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de recia. *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 37, n. 1, p.67-72, 2008.

- ARMSTEAD, I.P.; LING, J.R. Chromatographic separation of mixed peptides from amino acids in biological digests with volatile buffers. *J. Chromatogr.*, v.586, p.259-263, 1991.
- ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, 2009.
- AUBRY, A.F.; CAUDE, M.; ROSSET, R. Separation and identification of dipeptides in a hydrolyzed brain extract. *Chromatogr.*, v. 33, p. 533-538, 1992.
- AULER, F. *Produção e caracterização de farinhas e concentrados protéicos de amaranto (Amaranthus cruentus)*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. 2002. 75 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- BABU, B.R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chem. Eng. Proc.*, v.47, p. 83-89, 2008.
- BALDINI, V.L.S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E.A.H.; SALES, A.M.; DRAETTA, I.S. e GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da Bromelina e cultivares de abacaxizeiro. *Colet. ITAL*, v. 23, n. 1, p. 44-55, 1993.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BENASSI, V.T.; WATANABE, E. Fundamentos da Tecnologia de Panificação. Rio de Janeiro: Embrapa-CTAA, v. 1, p. 55, 1997.
- BERNARDI, C.R. *Preparo de hidrolisados protéicos e análise de aminoácidos por duas metodologias*. Santa Catarina: Centro de Ciências Agrárias da UFSC. 2000. 131 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- BEYNON, R.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes*. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 340 p.
- BIASUTTI, E.A.R.; VIEIRA, C.R.; CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Study of some functional properties of casein: effect of pH and tryptic hydrolysis. *Inter. J. Food Proper.*, v. 10, n. 1, p.173-183, 2007.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. *Química do processamento de alimentos*. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 144 p.
- BORGES, C.D.; CHIM, J.F.; LEITÃO, A.M.; PEREIRA, E.; LUVIELMO, M.M. Produção de suco de abacaxi obtido a partir dos resíduos da indústria conserveira. *B.CEPPA*, v.22, n. 1, p. 25-34, 2004.
- BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey protein as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clin. Invest. Med.*; v. 16, p. 204-209, 1993.
- BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.O.B. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- BRANDTS, J.F.; KAPLAN, L.J. Derivate spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem.*, v. 12, n. 10, p. 2011-2024, 1973.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Fundamentos Técnicos à Reorientação da Triticultura Nacional. Brasília, 1993. 74 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 822 de 06 de junho de 2001. Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal/PNTN. *Diário Oficial*, Brasília, 10 jun. 2001.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isenta de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 nov. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.8, de 3 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12214>. Acesso em 10 de jun. de 2008.
- BURNS, D.T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p. 2201-2205, 2002.
- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz - Fundamentos de química clínica*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 836p.
- CABRERA-PADILLA, R.Y.; PINTO, G.A.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. *Process Biochem.*, v. 44, p. 269-276, 2009.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivative analysis of UV/visible spectra. *A. Laboratory*, v. 12, p. 101-112, 1980.
- CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998. 207 p. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de alimentos).
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.*, v. 3, p. 1-19, 2007.
- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 3, p. 229-232, 2002.
- CARREIRA, R.L.; MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.
- CÉSAR, A. C. *Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, 2005.111p. (Tese, Doutorado em Engenharia Química).
- CHANG, J.C.M. ; CHAIMOVITZ, C.; MA, R.S.W. Acidity, osmolality, electrolyte and amino acid concentration of casein hydrolysates and synthetic amino acid solutions. *Clin. Biochem.*, v.6,1973.
- CHATAUD, J. ; DESREUMEUX, S. ; CARTWRIGHT, T. Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988.
- CHEFTEL, J-D.; CUQ, J-L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias-bioquímica-propiedades funcionales-valor nutricional-modificaciones químicas*. Acribia, 345 p, 1989.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocoll.*, v. 23, p. 593-599, 2009.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras: ESAL/ Faepe, 1990. 320 p.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Sci. Techn.*, v.11, 2000.

- COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *B.CEPPA*, v. 19, n. 1, p. 3342, 2001.
- COLLE, C.A. *A cadeia produtiva do trigo no Brasil: contribuição para a geração de emprego e renda*. Porto Alegre: Faculdade de Ciências Econômicas da UFRGS. 1998. 160p. (Dissertação, Mestrado em Economia Rural da UFRGS).
- CONAB. Safras. Safras 1990-1991 a 2004-2005 - séries Históricas. Trigo. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2007.
- DAVIS, M.; LEE, T.D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: a practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci.*, v. 1, 935 - 944, 1992.
- DE HOLANDA E VASCONCELLOS, A. M.; SANTOS NETO, A.L.C.; GRASSIANO, D. M.; OLIVEIRA, C.P.H. Method for removing phenylalanine from acid hydrolysate of casein. *Biotechnology and Bioengineering.*, v. 56, p. 1324-1329, 1989.
- DENG, C.; DENG, Y.; WANG, B; YAHG, X. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots. *J. Chromatog. B*, v. 780, p. 407-413, 2002.
- DIZDAROGLU, M. Weak anion-exchange high-performance liquid chromatography of peptides. *J. Chromatogr.*, v. 334, p. 49-69, 1985.
- DUARTE, A.J., CARREIRA, R.L., JUNQUEIRA, R.G., COELHO, J.V., SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: 1. Efeito do pH e do tempo de hidrólise. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 18, n. 3, p. 295-302, 1998.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.
- EDWARDS, N.M.; GIANIBELLI, M.C.; MCCAIG, T.N.; CLARKE, J.M.; AMES, N.P; LARROQUE, O.R.; DEXTER, J.E. Relationships between dough strength, polymeric protein quantity and composition for diverse durum wheat genotypes. *J. Cereal Science*, v. 45, p. 140-149, 2007.
- EMBRAPA, 2009. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=41&cod_pai=55>. Acesso em: 04 mar. 2009.
- EUBER, J.R.; PUSKI, G.; HARTMAN JR., G.H. Method for making soluble rice protein concentrate and the product produced therefrom. *Bristol-Myers Company, New York, NY, Patent US 4990344*, Feb. 5. 1991.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 1998. 61 p.
- FAGEER, A.S.M.; TINAY, A.H.E. Effect of genotype, malt pretreatment and cooking on in vitro protein digestibility and protein fractions of corn. *Food Chem.*, v.84, p. 613-619, 2004.
- FAO - Food and Agriculture Organization; *Maize in Human Nutrition*, FAO: Rome, 1992
- FARONI, L.R.D.; BERBERT, P.A.; MARTINAZZO, A.P.; COELHO, E.M. Qualidade da farinha obtida de grãos de trigo fumigados com dióxido de carbono e fosfina. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.*, v. 6, n. 2, p. 354-357, 2002.
- FISCHER, M.; KOFOD, L.V.; SCHOLS, H.A.S.; PIERSMA, S.R.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, n.9, p.4463-4469, 2001.
- FREIMAN, L.O.; SABAA SRUR, A.U.O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, (L.) Merrill). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.19, n.2, p. 170-173, 1999.

- FREITAS, S.P.; COURI, S.; VIEIRA, C.R.; PONTES, S.M.; CABRAL, L.M.C.; HARTMAN, L. Recuperação e caracterização dos peptídeos da soja resultantes da hidrólise enzimática do grão extrusado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v.3, p.1975-1978.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arq Gastroenterol*, v. 36, n. 4, p. 227-236, 1999.
- FU, B.X.; SAPIRSTEIN, H.D. Procedure for isolating monomeric proteins and polymeric glutenin of wheat flour. *Cereal Chemistry*, v.73, p.143-152, 1996.
- FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. *Rev. Ciênc. Tecnol.*, v.10, n.19, p.79-89, 2002.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, p. 343-359, 1990.
- GALERA, J.S. *Substituição parcial da farinha de trigo por farinha de arroz (Oryza sativa L.) na produção de "sonho" – estudo modelo*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2006. 86p. (Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos: Área de Bromatologia).
- GALVÃO, C.M.A.; PINTO, G.A.; JESUS, C.D.F.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolysates of cheese whey. *J. Food Engineer.*, v. 91, n. 1, p. 109-117, 2009.
- GIANIBELLI, M.C.; MASCI, S.; LARROQUE, O.R.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Biochemical Characterisation of a Novel Polymeric Protein Subunit from Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. of Cereal Science*, v. 35, p. 265–276, 2002.
- GOLOVCHENKO, N, KATAEVA, I. A, AKIMENKO, V. K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr, Amsterdam*, v.591, n.4, p.121-128, 1992.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hidrolisis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, p. 529-532, 1994.
- GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chromatog. A*, v.347, p.219-235, 1985.
- GRAZINA, K. Argentina suspende exportações de trigo e de farinha. *International Business Times*, Buenos Aires, 2007. Disponível em: <<http://br.ibtimes.com/articles/20070308/trigo-e-de-farinha.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2007.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSK Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65-69, 1986.
- GRISWOLD, R.M. Estudo experimental dos alimentos. 1972. 345p.
- GUARIENTI, E.M.; CIACCO, C. F.; DA CUNHA, G.R.; DEL DUCA, L.J.A.; CAMARGO, C.M.O. Avaliação do efeito de variáveis meteorológicas na qualidade industrial e no rendimento de grãos de trigo pelo emprego de análise de componentes principais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.23, n.3, p.500-510, 2003.
- GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.Y.; CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, v. 41, n.1, p.79-89, 2000.
- GUPTA, P.; KHAN, R.H.; SALEEMUDDIN, M. Binding of antibromelain monomeric Fab improves the stability of stem bromelain against inactivation. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1646, p. 131– 135, 2003.

- GUTKOSKI, L.C.; ANTUNES, E.; ROMAN, I.T. Avaliação do grau de extração de farinhas de trigo e de milho em moinho tipo colonial. *B.CEPPA*, v. 17, n. 2, p. 153-166, 1999.
- GUTKOSKI, L.C.; KLEIN, B.; PAGNUSSATT, F.A.; PEDÓ, I. Características tecnológicas de genótipos de trigo (*triticum aestivum* L.) cultivados no cerrado. *Ciênc. agrotec.*, v. 31, n. 3, p. 786-792, 2007.
- HALE, L.P.; GREER, P.K.; TRINH, C.T.; JAMES, C.L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunopharmacol.*, v. 5, p. 783-793, 2005.
- HAQ, S.G.; RASHEEDI, S.; SHARMA, P.; AHMAD, B.; KHAN, R.H. Influence of salts and alcohols on the conformation of partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. *The Inter. J. of Biochem. & Cell Biology*, v.37, p.361-374, 2005.
- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v. 5, p. 559-571, 1992.
- HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURES, H.R.; MACHLEIDT, I.; MACHLEIDT, W.; NUCK, R. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. *Journal of Protein Chemistry*, v.17, n.4, p. 351-361, 1998.
- HEBBAR, H.U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 4896-4902, 2008.
- HENDRIKSZ, C.J.; WALTER, J.H. Update on phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 14, p. 400-406, 2004.
- HERNANDEZ, R.; ASENJO, J.A. Production and characterization of an enzymatic hydrolysate of skim milk lactose and proteins. *J. Food Sci.*, v.47, p.1895-1898, 1982.
- HOJILLA-EVANGELISTA, M.P.; JOHNSON, L.A.; MYERS, D.J. Sequential extraction processing of flaked whole corn: alternative corn fractionation technology for ethanol production. *Cereal Chem.*, v. 69, p. 643-647, 1992.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- HUNT, M.M.; BERRY, H.K.; WHITE, P.P. Phenylketonuria, adolescence, and diet. *J. Nutr.*, v. 85, p.1 328 - 1334, 1985.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 494, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.2, p.438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.671, n.1, p.33-37, 1981b.
- ILIEV, I.; TCHORBANOV, B. Determination of tryptophan in protein hydrolysates and fermentation media using gel chromatography. *Biotechnol. Applied Biochem.*, v.16, p.29-33, 1992.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQCGCRE- 008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 24 p.

- ISO (International Standards Organization). *ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Parts 1, 2, 3, 4 and 6*. Geneva: ISO, 1994.
- ISO (International Standards Organization). *ISO 5725-5. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 5*. Geneva: ISO, 1998. 56 p.
- ITO, S.; YOSHIOKA, S.; OGATA, I.; YAMASHITA, E.; NAGAI, S.; OKUMOTO, T.; ISHII, K.; ITO, M.; KAJI, H.; TAKAO, K.; DEGUCHI, K. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J. Chromatogr. A*, v. 1090, p. 178-183, 2005.
- KAJISHIMA, S.; PUMAR, M.; GERMANI, R. Efeito de adição de diferentes sais de cálcio nas características da massa e na elaboração de pão francês. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 2, p. 222-225, 2003.
- KAMPEN, W.H. Recovery of protein isolate and/or starch from cereal grains. United States Patent 5.410.021, 1995.
- KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S.; SOARES, R.D.L.; STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B. Abordagem dietética para fenilcetonúria. *Rev. Med. Minas Gerais*, v. 11, n. 2, p. 129-134, 2001.
- KANUFRE, V.C. *A Utilização do aleitamento materno no tratamento da fenilcetonúria*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG. 2006. 122p. (Dissertação, Mestrado em Ciências da Saúde da Criança e do adolescente).
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut*, v. 26, p. 907-913, 1985.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients, *Proc. Biochem.* p.149-157, 1985.
- KING, B. In-house method validation. A guide for chemical laboratories. *LGC Limited*. 2003.
- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low-phenylalanine peptide. *Enz.*, v. 38, p. 321-327, 1987.
- KREIS, M.; SHEWRY, P.R.; FORDE, B.G.; FORDE, J.; MIFLIN, B.J. *Structure and evolution of seed storage proteins and their genes with particular references to those of wheat, barley and rye*. in: Oxford Surveys of Plant and Molecular Cell Biology. B. J. Mifflin, ed. Oxford University Press: London. P. 253-317 1985.
- KOPACIEWICZ, W.; REGNIER, F.E. Nonideal size exclusion chromatography of food proteins: effects of pH at low ionic strength. *Anal. Biochem.*, v.126, p. 8-16, 1982.
- LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM. *Quim. Nova*, v.31, n.7, p.1860-1864, 2008.
- LAHL, W.J. ; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, v. 48, p. 68-67, 1994.
- LANDRY, J.; DELHAYE, S.; VIROGBEN, G. Tryptophan content of feedstuffs as determined from three procedures using chromatography of barytic hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, p. 51 - 52, 1988.
- LEMELIN, E.; BRANLARD, G.; SALVO, L.; LEIN, V.; AUSSENAC, T.; DAYDE, J. Breadmaking stability of wheat flours: Relation between mixing properties and molecular weight distribution of polymeric glutenins. *J. Cereal Science*, v. 42, p. 317-326, 2005.
- LEMIEUX, L., PIOT, J.M., GUILLOCHON, D.; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J.Chromatogr.*, v. 32, p. 499-504, 1991.

- LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZENNEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and massa spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chrom. A*, v. 881, p. 1-21, 2000.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod. Proc.*, v. 86, n. 1, p. 1-6, 2008.
- LIMA, J.D.; MORAES, W.S.; MENDONÇA, J.C.; NOMURA, E.S. Resíduos da agroindústria de chá preto como substrato para produção de mudas de hortaliças. *Ciênc. Rural*, v. 37, n. 6, p. 1609-1613, 2007.
- LOOKHART, G.L.; MARTIN, M.L.; MOSLETH, E.; UHLEN, A. K.; HOSENEY, R. C. Comparison of high-molecular-weight subunits of glutenin and baking performance of flours varying in bread-making quality. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, v. 26, p. 301-306, 1993.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P.R.; JULIEEN, A.R.; PEJOAN, C.H.; VERNEUIL, B. Procède pour preparer um hydrolysate enzymatique. Tessengerlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessengerlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- LOPES, F.L.G.; JÚNIOR, J.B.S.; SANTANA, J.C.C.; SOUZA, R.R.; TAMBOURGI, E.B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.). *Rev. Bras. de Prod. Agroind.*, v. 7, n.1, p. 33-38, 2005.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr. Food Sci.*, v. 36, n. 2, p. 96-104, 2006.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; SILVESTRE, M.P.C. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J. Food Technol.*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPES Jr., C.O. *Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2008. 81 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- LOPES, T.J.; CANZI, C.; MACHADO, M.I.R.; FARIA, G.U.; PINTO, L.A.A.; FURLONG, E.B. Utilização de plasma bovino na formulação de pó para sorvete. *Braz. J. Food Technol.*, v. 11, n. 3, p. 175-181, 2008.
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 938-942, 1991.
- MACDONALD, A.; FERGUSON, C.; RYLANCE, G.; MORRIS, A.A.M.; ASPLIN, D.; HALL, S.K.; BOOTH, I.W. Are tablets a practical source of protein substitute in phenylketonuria? *Arch. Dis. Child.*, v. 88, p. 327-329, 2003.
- MACDONALD, M.J.; D'CUNHA, G.B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* 85, p. 273-282, 2007.
- MACEDO, D. Brasil discute alternativas para substituir importações de trigo argentino. Disponível em: <<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2009/02/18/materia.2009-02-18.7580611508/view>>. Acesso em: 18 Fev. 2009.

- MACRITCHIE, F.; LAFIANDRA, D. Structure-function relationships of wheat proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed.) *Food proteins and their applications*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., p.293-322, 1997.
- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem.Soc.*, v. 69, p. 1163-1169, 1992.
- MARCO, D.; WAITZBERG, D.L.. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: WAITZBERG, D.L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 449-457.
- MARIN, C.M.; SUTTINI, P.A.; SANCHES, J.P.F.; BERGAMASCHINE, A.F. Potencial produtivo e econômico da cultura do abacaxi e o aproveitamento de seus subprodutos na alimentação animal. *Ciêñ. Agr. Saúde*, v. 2, n. 1, p 79 – 82, 2002.
- MARTINS, A.M.; FISBERG, R.M.; SCHMIDT, B.J. *Fenilcetonúria: abordagem terapêutica*. NESTLÉ, São Paulo, n.54, 1993.
- MARTINS, S.R.R. Incidência de fenilcetonúria e outras hiperfenilalaninemias no estado de Minas Gerais: *dados do Programa Estadual de Triagem Neonatal*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG, 2005. 98 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências da Saúde da Criança e do adolescente).
- MARTINS, I. Validação. In: MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; *Toxicologia Analítica*. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2008. p. 20-39.
- MASSARO, A.F.; PINTO, L.A.A. Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado, com sangue bovino, utilizando a técnica de leite de jorro. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 61, n. 2, p. 77-84, 2002.
- MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA, K. Derivate absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal. Biochem.*, v.65, n.3, p.362-368, 1975.
- MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 58, p. 1234-1245, 2001.
- MAYADUNNE, R.; NGUYEN, T.; MARRIOTT, P.J. Amino acid analysis by using comprehensive two-dimensional gás chromatography. *Anal. Bioanal. Chem*, v. 382, p. 836-847, 2005.
- MCCABE, E.R.; NORD, A.M.; ERNEST, A.; MCCABE, L. Evaluation of a phenylalanine-free product for treatment of phenylketonuria. *Am. J. Dis. Child*, v. 141, p. 1327 - 1329, 1987.
- MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. *Br. Nutr. Found. Nutr. Bull.*, v. 29, p. 111-142, 2004.
- MEDINA, J.C., BLEINTROTH, W.E., HASHIZUME, T.; *ABACAXI - da cultura ao processamento e comercialização*_ITAL, 1987.
- MEINIG, G.E. Bromelain. *Phytomedicine*, v.2, p.1-2, 1999.
- MICLO, L., PERRIN, E.; DRIEU, A.; MELLET, M.; LINDEN, G. Determination of the ratios of the aromatic amino acids residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides. *Int. J. Pep. Prot. Res. Haguenau*, v. 46, n.2, p.186-192, 1995.
- MIFLIN, B.J.; FIELD, J.M.; SHEWRY, P.R. Cereal storage proteins and their effects on technological properties. In: *Seed proteins* (J.Daussant, J.Mosse and J.vaughan, eds), Academic press, London, p.255-319, 1983.
- MILUPA. Protein substitutes for the dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia, 1995.
- MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, v.54, p.1225-1229, 1989.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Publ.*, v. 34, p. 86-96, 2000.

- MIRANDA, M.Z.; EL-DASH, A. farinha integral de trigo germinado. Características nutricionais e estabilidade ao armazenamento. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 3, p. 216-223, 2002.
- MIRANDA, M.Z. Trigo: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 12p, 2006. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 74). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74.htm3>.
- MOHAMED, A.A.; RAYAS-DUARTE, P. The effect of mixing and wheat protein/gluten on the gelatinization of wheat starch. *Food Chem.*, v. 81, p. 533–545, 2003.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.*, v. 19, p. 381-387, 2006.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 35, n. 1, p. 179-189, 2000.
- MOORE, D.J.; CAYGILL, J.C. Proteolytic activity of malaysian pineapples. *Tropical Science.*, v. 21, n. 2, p. 97-102, 1979.
- MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S. ; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. *J. Food Biochem.*, v. 28, n. 6, p. 1-8, 2004.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v.34, n.1, p.59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hidrolizates of casein depleted in phenilalanine. *App. Biochem.Microbiol.*, v. 29, n. 3, p. 302-306, 1993.
- MURACHI, T.; NEURATH, H. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *J.Biol. Chem.*, v.235, p.99-107, 1960.
- MYNOTT, T.L., LADHAM, S.A., SCARMATO, P. Bromelain, from pineapple steams, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase – 2 in T cells. *J. Immunology*, p.2568 – 2575,1999.
- NAKAMURA, T.; SYUKUNOBE, Y.; SAKURAI, T.; IDOTA, T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwiss.*, v. 48, p. 11-14, 1993.
- NATA (National Association of Testing Authorities - Australia). *Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods*. Sydney: NATA, 1997. 8
- NETTO, F.M.; REIS, C. Influência do método de extração no rendimento:perfil protéico e solubilidade de concentrados protéicos de amaranto. *B.CEPPA.*, v.24, n.2, p.289-302, 2006.
- NOGUEIRA, R.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, v. 1089, p. 158-169, 2005.
- NUPAD – Núcleo de ações e pesquisas em apoio diagnóstico. Disponível em: <<http://www.nupad.medicina.ufmg.br/>>. Acesso em: 15 de outubro de 2008
- O´HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength.-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, p. 1548-1553, 1979.
- ORTOLAN, F. *Genótipos de trigo do Paraná- Safra 2004: caracterização e fatores relacionados à alteração de cor de farinha*. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais

- da Universidade Federal de Santa Maria. 2006. 140p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos).
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. Valio Oy, Helsink, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.
- PALLAS, M.C. Importancia de la nutrición en la persona de edad avanzada. Barcelona. *Novartis Consumer Health S.A*, 2002.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.50, n.1, p.15-23, 1995.
- PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Tech.*, v. 48, n. 10, p. 96-8, 1994.
- PIECYK, M.; SRAMA, A.; BZDUCHA, A.; OBIEDZINSKI, M. Application of HPLC and GC/MS to quantification of phenylalanine in chosen kinds of food for particular nutritional uses. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, v. 6, n. 2, p. 5-18, 2007.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.*, v.11, p.347-356, 2001.
- PIMENTA, F.M.V.; ABECIA-SORIA, M.I.; AULER, F.; AMAYA-FARFAN, J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. *Int. Dairy J.*, v. 16, p. 984-991, 2006.
- PIZA, I.M.T. *Poliaminas e micropropagação do abacaxizeiro (Ananás comosus L.) cv. Smooth Cayenne*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 1997. 107p. Dissertação (Mestrado).
- PRATA, A.S.; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional in vitro das proteínas do soro de sangue bovino. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.25, n.2, p. 327-332, 2005.
- PY, C.; LACOEUVILHE, J.J.; TEISSON, C. L'ananas as culture, sés produits. Paris: Maisonneuve & Larose,. 562p. 1984.
- RAGONE, R.; COLONNA, G.; BALESTRIERI, C.; SERVILLO, L.; IRACE, G.; Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivative spectroscopy. *Biochem.*, v. 23, p. 1871-1875, 1984.
- RAMASWAMI, U.; SMITH, I. Phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 7, p. 251-255, 1997.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol*, p. 597-635, 1998.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 1975, 573 p.
- RÉRAT, A.A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism, *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*. v.31, n.1, p.164-171, 2008.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, p.753-761, 1988.
- ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.*v.266, p.869-875, 1990.
- SALMONA, M., MUSSINI, E., POCCHIARI, F.; BEGGOLIN, G. Determination of dipeptides in protein hydrolysates for total parenteral nutrition. *J. Chromatogr.*, v. 246, p. 334 – 339, 1982.

- SANTOS, S.A. *Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro Ananás comosus (L.) Merr. cv. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração*. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 1985. 51p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- SANTOS, M.F.; SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H. Hidrolisado enzimático para dietoterapia de fenilcetonúricos. *Biotechnol. Ciên. Desenv.*, v. 29, p.152-157, 2003.
- SANTOS, L.S. *Perfil protéico e qualidade de panificação em linhagens de trigo desenvolvidas para a região do cerrado brasileiro*. Viçosa: UFV. 2008. 65p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.
- SEIBEL, N.F.; BELÉIA, A.D.P. Carboidratos das fibras de cotilédones e proteínas de produtos derivados de soja (*Glycine max* (L.) Merril). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.28, n.3, p.607-613, 2008.
- SENA, R.F.; NUNES, M.L. Utilização de resíduos agroindustriais no processamento de rações para carcinicultura. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.7, n. 2, p. 94-102, 2006.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em Alimentos Protéicos*. São Paulo: Varela, 1996. 520p.
- SHEHATA, A.A.; THANNOUN, M.M. Extractability of nitrogenous constituents from iraq mung bean as affected by pH, salt type, and others factors. *J. Agric. Food Chem.*, v. 29, p. 53-57, 1981.
- SHEWRY, P.R.; TATHAM, A.S. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science.* v.25, n.3, p.207-227, 1997 apud SANTOS, L.S. *Perfil protéico e qualidade de panificação em linhagens de trigo desenvolvidas para a região do cerrado brasileiro*. Viçosa: UFV. 2008. 65p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, J.G.; ORNELLAS, C.B.D.; CARVALHO, M.G.; JUNQUEIRA, R.G.; OLIVEIRA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização química e funcional do caseinato de sódio e da globina bovina. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.20, n.2, p. 212-219, 2000.
- SILVA, R.C. *Qualidade Tecnológica e estabilidade oxidativa da farinha de trigo e fubá irradiados*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" da USP. 2003. 89 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SILVA, J.G.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. *Food Resear. Inter.*, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2003a.
- SILVA, J.G.; MORAIS, H.A.; OLIVEIRA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. . Evaluating the incorporation of globin bovine and sodium caseinate on the raw batter quality and on the stability of ham pâté. *Meat Sci.*, v. 63, n. 2, p. 177-184, 2003b.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O., LOPES, D.C.F, JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING. A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am.J. Food Technol.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- SILVA, R.N. ; DUARTE, G.L. ; LOPES, N.F. ; MORAES, D.M.; PEREIRA, A.L.A. Composição química de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a estresse salino na germinação. *Rev. Bras. Sementes*, v. 30, n. 1, p.215-220, 2008.

- SILVA, M. C. *Hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro do leite: remoção de fenilalanina, grau de hidrólise e perfil peptídico*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2009. 112p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- SILVESTRE, M.P.C., DAUPHIN, C., HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta.*, v. 282, p.603-612, 1993.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994b.
- SILVESTRE, M.P.C. ; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R. ; SILVA, M.C; LOPES Jr., C.O.; SILVA, V.D.M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Engineer.*, v. 5, n. 1, p.1-13, 2009.
- SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technol.*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- SOARES, R.P. Avaliação Econômica da Política Triticola de 1967 a 1977. Brasília: Comissão de Financiamento da Produção, 1980. 140 p. (Coleção Análise e Pesquisa, 20).
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac. Bonaer.*, v. 25, p. 325-332, 2006.
- SOARES, R.D.L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R; SILVESTRE, M.P.C. Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol.*, v. 21, n. 1, p. 45-56, 2007.
- SOUZA, C.F.M, SCHWARTZ, I.V., GIUGLIANI, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciê. Saud. Colet.*, v. 7, p. 129-137, 2002.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- SOUZA, M.W.S.; BIASUTTI, E.A.R.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatic. *Am. J. Food Tecnol.*, v. 3, p. 315-324, 2008.
- SOUZA, M.W.S.; LIMA, L.G.; SILVA; V.D.M.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de leite com teor reduzido de fenilalanina pela ação da protease do *Aspergillus sojae* e uso do carvão ativado. *E-xacta*, v. 2, n. 1, p. 23-33, 2009.
- SREENATH, H. K.; SUDARSHANAKISHNA, K.; SANTHANAM, K. Improvement of juice recovery from pineapple pulp/residue using cellulases and pectinases. *J. Ferment. Bioeng*, v. 78, n.61, p. 486 - 488, 1994.
- STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. *Rev. Méd. Minas Gerais*, v. 9, p. 106 - 110, 1999.
- STEVENSON, D.E.; MORGAN, K.R.; FENTON, G.A.; MORAES, G. Use of NMR and mass spectrometry to detect and quantify protease catalysed peptide bond formation in complex mixtures. *Enzy. Microb. Tech.*, v. 25, p. 357-63, 1999.
- SVENNING, C.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: IDF (International Dairy Federation) *Sem. Protein Fat glob. Mod.*, p. 96-106, 1993.

- TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA – UNICAMP, versão II, 2 ed., Campinas: NEPA – UNICAMP, 2007. 113p.
- TANAKA, K.; HILARY, Z. D.; ISHIZAKI, A. Investigation of utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *J. biosci. bioeng.*, v. 87, p. 642 - 646, 1999.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, N.S.; SHELLHAMMER, T.H. Protein extraction from heat-stabilized rice bran 1 – Physical processing and enzyme treatments. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, n.25, p.7444-7448, 2002.
- TESMER, E.; VETTER, M.; RAFFLER, G.; SCHWEIKHARDT, F. Process of making phenylalanine-free food for infants and small children. Milupa GmbH & Co. KG, Friedrichsdorf, Germany, Patents US 1996000682627, A23L 1/305, A23L 1/304; 09/10/1996; 07/04/1998.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst.*, v. 125, p. 385-386, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p. 835-855, 2002.
- TRAHMS, C.M. Cuidado nutricional nos distúrbios metabólicos. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 745-775.
- USP (Universidade do Estado de São Paulo). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, v.4.1, 2005. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em: 22 jun. 2006.
- VAN DER BORGHT, A.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *J. Cereal Sci.*, v. 41, p. 221-237, 2005.
- VAN DER VEN, C.; GRUPEN, H.; BONT, D.B.A.; VORAGEN, A.G.J. Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *Int. Dairy J.*, v. 12, p. 813, 2002.
- VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 159-171, 1999.
- VERMEYLENA, R.; GODERISB, B.; REYNAERSB, H.; DELCOURA, J. A. Gelatinisation related structural aspects of small and large wheat starch granules. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 170–181, 2005.
- VERNEUIL, B.; BRESSOLIER, P. H.; JULIEN, R. Quantification of amino acids, and di- and tripeptides in nutritional interest protein hydrolysates by ligand exchange chromatography in combination with Edman degradation. *4th Symposium on purification technologies*, p. 253-258, 1990.
- VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; VAN STADEN, J.E.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*, v. 73, p. 1381-1386, 2001.
- VIANA, F.R.; DELVIVO, F.M. ; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Quality of ham pâté incorporated of bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat. Sci.*, v. 70, n. 1, p. 153-160, 2005.
- VIEIRA, C.R., BIASUTTI, E.A.R, CAPOBIANGO, M., AFONSO, W.O., SILVESTRE, M.P.C. Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its triptic hydrolysates. *Ars Pharmaceutica*, v. 47, n. 3, p. 281-292, 2006.
- VIEIRA, C.R. *Extração, hidrólise e remoção de fenilalanina das proteínas da farinha de arroz*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 94 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.
- VISSER, S., SLAGEN, C. J., ROBBEN, A.J.P.M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.
- WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 42, p. 353 - 375, 2002.
- WANG, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, v.47, n.2, p.411-416, 1999.
- WANG, L.; WANG, Y.-J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *J. Cereal Sci.*, v.39, n.2, p.291-296, 2004.
- WINTER, H.L. On the pharmacology of bromelain: an updat with special regard to animal studies on dose dependent-effects. *Planta Med.*v.56, 249-253, 1990.
- WHITAKER, J.R. *Principles of enzymology for the food sciences*. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1994. 625p.
- WRIGLEY, C.W.; BIETZ, J.A. Proteins and amino acids. In: Y. Pomeranz, Ed. *Wheat-Chem. and Technol.* , v. 1, St. Paul American Association of Cereal Chemistry, p. 159-275, 1988.
- ZEZZA, F.; KERNER, J.; PASCALE, M.R.; GIANNINI, R.; R.; MARTELLI, E.A. Rapid determination of amino acids by high-performance liquid chromatography; release of amino acids by perfused rat liver. *J. Chromatography*, v.593, n.2, p.99-101, 1992.
- ZHANG, Y.; DORJPALAM, B; HO, C.T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p. 2467 - 2471, 1992.
- ZIEGLER, F.; OLLIVIER, J.M.; CYNOBER, L. MASINI, J.P.; COUDRAYLUCAS, C.; LEVIS, E.; GIBOUDEAU, J. Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides vs. non-degraded proteins. *Gut.*, v. 31, p. 1277-1283, 1990.

TRABALHO EXPERIMENTAL

APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho está apresentada na forma de capítulos independentes, compreendendo um total de sete, cujo fluxograma está apresentado na Figura 1.

No primeiro capítulo, foi conduzido um estudo visando o aproveitamento de resíduos da agroindústria do abacaxizeiro, especificamente a casca, para a obtenção do extrato enzimático bruto e a sua precipitação, por meio do emprego de três diferentes metodologias (etanolólica, sulfato de amônio e isoelétrica). Seguiu-se a posterior caracterização destes extratos, tendo sido determinados os teores de proteína, os valores de atividades proteolítica e específica, assim como avaliado o efeito do pH e da temperatura, na atividade específica e na estabilidade dos extratos bruto e precipitados.

No segundo capítulo, foi realizada a validação de um método quantitativo para a determinação de fenilalanina (Phe) em farinha de trigo, baseada na espectrofotometria derivada segunda (EDS). Para tal, após a definição das condições ideais a serem empregadas no preparo da amostra, os parâmetros linearidade, efeito matriz, seletividade, recuperação, precisão, limites de detecção e quantificação foram determinados.

No terceiro capítulo, uma amostra de farinha de trigo comercial (tipo I) foi, inicialmente, caracterizada quanto a sua composição centesimal. Em seguida, foi realizada a extração das proteínas desta farinha, empregando-se uma protease alcalina – cepa do *Bacillus licheniformis*. No intuito de otimizar o rendimento deste processo, o efeito de alguns parâmetros foram estudados, tais como o tempo, a temperatura, o tratamento físico da amostra, a relação enzima:substrato e a concentração inicial de matéria-prima.

O quarto capítulo refere-se à utilização de diferentes proteases e do carvão ativado (CA), na obtenção de hidrolisados protéicos de farinha de trigo com teor reduzido de Phe. Algumas variáveis foram testadas, tais como o tipo de enzima e de associação enzimática; a ordem de adição das enzimas; o tempo, a temperatura e o pH

da reação; o tratamento físico do extrato protéico; a relação enzima:substrato (ES) e a associação de três diferentes tipos de CA. No total, foram estudadas 30 condições de hidrólise protéica e de remoção de Phe. A eficiência desta remoção foi avaliada por espectrofotometria EDS, determinando-se o teor de Phe livre na farinha de trigo, assim como nas suas proteínas hidrolisadas, antes e após o tratamento com CA.

No quinto capítulo, foi realizado um estudo da caracterização do perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo, preparados pela associação sucessiva do EB com uma pancreatina comercial, que apresentaram maior remoção de Phe no capítulo anterior. A análise do perfil peptídico envolveu o fracionamento dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da área corrigida da fração (ACF).

No sexto capítulo, foi estudado o perfil peptídico dos mesmos hidrolisados protéicos de farinha de trigo, analisados no capítulo anterior, após a remoção de Phe. A análise do perfil peptídico foi realizada empregando-se a metodologia utilizada no capítulo V.

No sétimo capítulo, foi avaliado o efeito da remoção de Phe pelo CA sobre o perfil peptídico dos mesmos hidrolisados protéicos de farinha de trigo, analisados nos capítulos 5 e 6. Para tal, comparou-se os perfis peptídicos obtidos antes e após o procedimento de retirada deste aminoácido pelo meio adsorvente (CA).

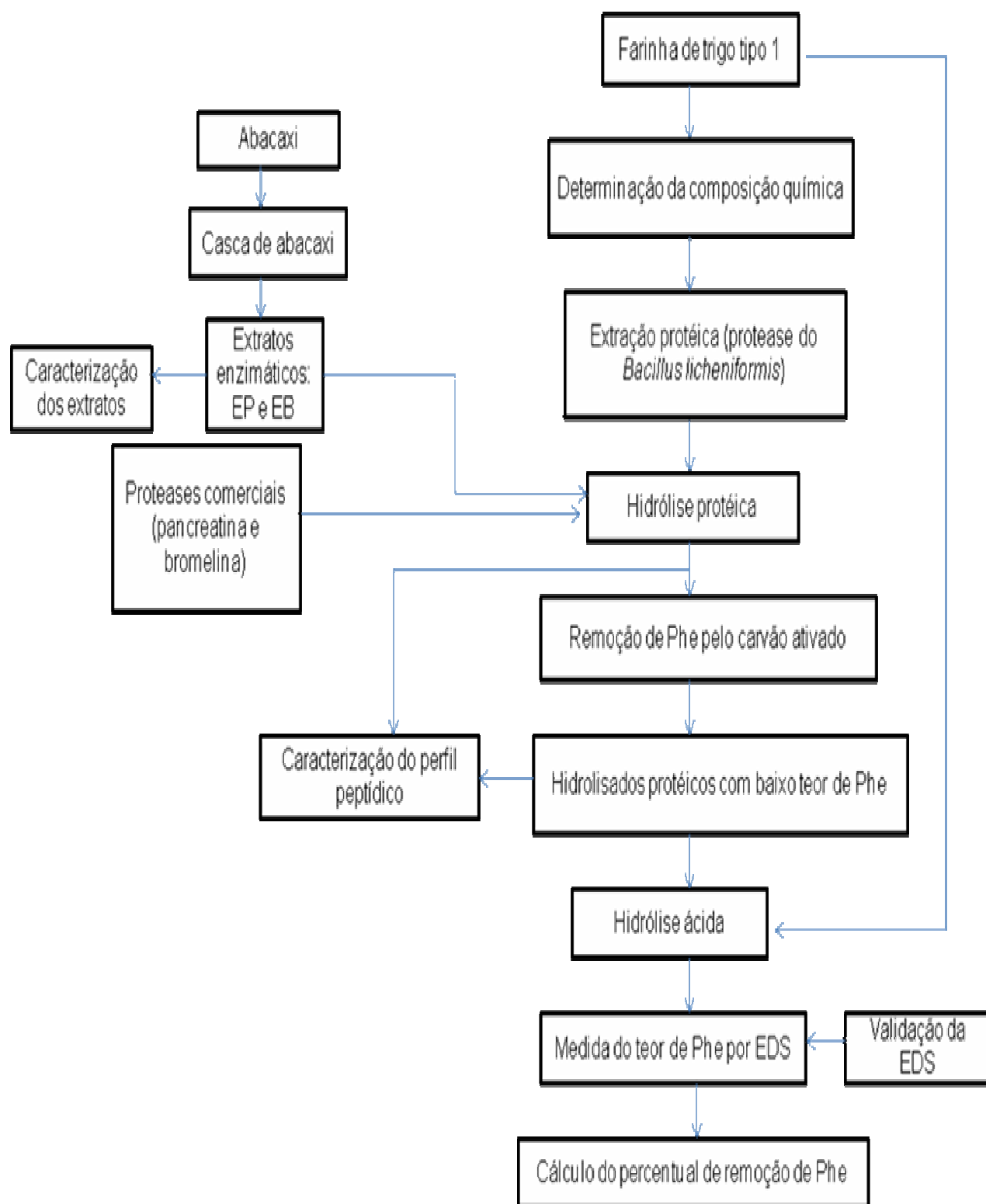


Figura 1 – Fluxograma da parte experimental desenvolvida neste trabalho. Phe: fenilalanina; EDS: Espectrofotometria Derivada Segunda; EB: extrato enzimático bruto da casca de abacaxi; EP: extrato enzimático precipitado da casca de abacaxi.

CAPÍTULO I

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS DA CASCA DE ABACAXI

RESUMO

Visando o aproveitamento de resíduos da agroindústria do abacaxizeiro, foi realizado um estudo para a obtenção do extrato bruto da casca de abacaxi e a sua precipitação, através do emprego de três diferentes metodologias (etanolólica, sulfato de amônio e isoeletrica). Seguiu-se a posterior caracterização destes extratos, tendo sido determinados os teores de proteína, os valores de atividades proteolítica e específica, assim como avaliado o efeito do pH e da temperatura na atividade específica e na estabilidade dos extratos bruto e precipitados. Os resultados obtidos indicaram que para o extrato enzimático bruto da casca do abacaxi foram encontrados valores ótimos de pH de 6,0 e 7,0 e temperatura de 70 °C. O extrato enzimático precipitado com etanol apresentou o valor mais elevado de atividade específica (10,7 U/mg proteína) dentre os três procedimentos de precipitação empregados, tendo apresentado valores ótimos de ação semelhantes ao extrato bruto, como o pH de 7,0 e a temperatura de 70 °C. Além disso, este extrato apresentou-se mais estável do que o extrato bruto, mantendo, em média, 60,9 % e 53,7 % da atividade específica inicial, ao se avaliar a estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura, respectivamente. Já para o extrato bruto, foram encontrados os valores médios de atividade específica residual de 17,4 % após incubação na faixa de pH de 3,0 a 9,0 e 42,7 %, quando avaliou-se a estabilidade à temperatura de 30 °C, 50 °C e 70 °C.

Palavras-chave: abacaxi, resíduo industrial, extratos enzimáticos, atividade enzimática, estabilidade.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais (ALEXANDRINO et al., 2007), provenientes da indústria de alimentos e que envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros. Esses materiais servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (COELHO et al., 2001).

O mercado mundial da tecnologia enzimática movimenta, anualmente, cerca de 1,4 bilhões de dólares (CASTRO et al., 2004). Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e que utiliza matérias primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria (COELHO et al., 2001).

O aproveitamento de resíduos industriais com a finalidade de obter extratos enzimáticos é importante, pois pode auxiliar na redução do seu acúmulo no ambiente além de garantir a obtenção de um material alternativo, de baixo custo, de fácil disponibilidade, viabilizando economicamente o uso de enzimas em escala industrial (MARIN et al., 2002; ALEXANDRINO et al., 2007; LIMA et al., 2007). Ressalta-se, que, no campo da comercialização de enzimas, o Brasil é ainda, basicamente consumidor de produtos importados, apesar de todo o seu potencial (COELHO et al., 2001).

O abacaxi é fonte da enzima proteolítica bromelina, um produto de alto valor comercial, que não é produzido no Brasil (LOPES et al., 2005) e que constitui uma extraordinária mistura de diferentes cisteína-endopeptidases (SILVA, 2008). A bromelina não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta, rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Esta é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais (LOPES et al., 2005).

No presente trabalho, a casca de abacaxi foi escolhida para atingir tal objetivo, uma vez que poucos trabalhos foram encontrados sobre esta parte do abacaxi, que representa um resíduo volumoso das indústrias beneficiadoras do abacaxizeiro (CÉSAR, 2005).

Para se utilizar a casca de abacaxi como fonte de enzimas proteolíticas, deve-se, inicialmente, proceder à extração destas enzimas, seguida da precipitação e caracterização do extrato, quanto ao estabelecimento dos valores ótimos de pH e

temperatura de ação, bem como estudar o efeito destes parâmetros na estabilidade da enzima.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Apesar de existirem métodos mais modernos para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas, as que empregam a precipitação ainda são muito utilizadas por apresentarem alto poder de concentração, serem de fácil aplicação de escala e apresentarem viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes (CÉSAR, 2005)

Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura abordando a purificação e a determinação da atividade da bromelina, empregando a precipitação com diferentes solventes (SILVA, 2008; HALE et al., 2005; CÉSAR, 2005).

Este trabalho teve como objetivos utilizar a casca de abacaxi para obtenção e purificação de extratos enzimáticos, por meio de técnicas de precipitação protéica, e caracterizá-los, quanto aos valores ótimos de pH e temperatura, além de avaliar o efeito destes parâmetros na estabilidade enzimática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O abacaxi (*Ananás comosus*), variedade Pérola, foi adquirido de plantações da cidade de Presidente Olegário localizada na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais, cerca de 3 a 5 dias após a colheita. O ácido tricloroacético (TCA) e o álcool etílico foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil). O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi adquirido da Lafan (São Paulo, Brasil). Os aminoácidos L-cisteína e L-tirosina e a hemoglobina foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, EUA). O sulfato de amônio foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A membrana de diálise de corte molecular de 12.000-14.000 Da foi adquirida da Spectrum (Compton, EUA). Utilizou-se o cutter (Sire, modelo Super Cutter, São Paulo, Brasil), o espectrofotômetro UV-VIS (CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra), o Centrivap (78100-00, Labconco, EUA) a Centrífuga (BR 4i, Jouan, França). Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo do Extrato Enzimático da casca de abacaxi

Para o preparo do extrato enzimático bruto da casca de abacaxi, as amostras foram, inicialmente, lavadas, descascadas e as porções de casca foram processadas no cutter e filtradas em gaze. Posteriormente, foram centrifugadas a $6.000 \times g$ por 15 min, em centrífuga refrigerada a 4°C . O sobrenadante foi adicionado de solução de ativadores EDTA a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e Cys a 10^{-2} mol/L , e armazenado em freezer, até o momento da análise.

2.2.2 Precipitação Protéica

O sobrenadante do extrato enzimático bruto da casca de abacaxi foi submetido a três técnicas de precipitação protéica, descritas a seguir, e os produtos obtidos foram denominados de extratos precipitados.

2.2.2.1 Precipitação com sulfato de amônio

O extrato enzimático bruto da casca de abacaxi foi submetido à precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizando diferentes frações de saturação (40, 50, 60, 70 e 80 %) (SCOPES, 1994), mantendo sempre a temperatura de 4°C . Os precipitados resultantes foram separados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 15 min, a 4°C , ressuspendidos em 4 volumes de tampão Na_2HPO_4 a $0,2 \text{ mol/L}$ e ácido cítrico a $0,1 \text{ mol/L}$, pH 5,0, dialisados, empregando-se membranas com corte molecular de 12.000-14.000 Da e, finalmente, armazenados a -18°C até o momento da análise.

2.2.2.2 Precipitação Isoelétrica

O extrato enzimático bruto foi submetido à precipitação isoeletrica, ajustando-se o pH para valores de 3 a 9, empregando-se uma solução de NaOH a 3mol/L. Os precipitados obtidos foram separados por centrifugação a 1.500 x *g* por 30 min, a 4°C, sendo armazenados a -18°C até o momento da análise.

2.2.2.3 Precipitação com etanol

As enzimas proteolíticas presentes no extrato enzimático bruto da casca do abacaxi foram concentradas por precipitação com etanol, segundo SANTOS (2005). A um volume conhecido (50 mL) do extrato bruto, adicionou-se dois volumes equivalentes de etanol a 4°C, sob agitação constante em banho de gelo, mantendo a temperatura de 4 °C, por 40 min, antes de ser centrifugado a 2.660 x *g* por 35 min, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspenso em água destilada, dialisado em membranas de diálise com corte molecular de 12.000-14.000 Da contra água destilada, por 24 h, a 4 °C. O precipitado obtido foi armazenado a -18 °C até o momento da análise.

2.2.3 Determinação do teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas do extrato enzimático bruto e dos extratos precipitados foi realizada pelo método do micro-kjeldahl (AOAC, 1995). O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,25 (SGARBIERI,1996).

2.2.4 Determinação da atividade específica dos extratos enzimáticos da casca de abacaxi

A determinação da atividade específica dos extratos bruto e precipitados foi realizada segundo a metodologia descrita por KUMAR (2002) e TREMACOLDI & CARMONA (2005), com algumas modificações referentes ao tampão (uso do McIlvaine pH 5,0 ao invés do TRIS-HCl, pH 8,0) e substrato (uso da hemoglobina ao invés da caseína). Inicialmente, determinou-se a atividade proteolítica e, posteriormente, empregando-se os valores obtidos para esta análise e o teor de proteína presente nos

extratos, determinou-se a atividade específica. Para tal, construiu-se uma curva analítica de tirosina, a partir de uma solução de L-tirosina (Tyr) a 100 µg/mL em HCl 0,1mol/L, contendo 6 valores de concentração que variaram de 20 a 100 µg Tyr/mL, sendo realizada as leituras de absorbância (ABS) a 275nm, em espectrofotômetro UV-VIS. Os valores obtidos foram utilizados para traçar a curva em função da concentração de Tyr. Em seguida, a 1.500 µl de uma solução de hemoglobina 0,5 % preparada no tampão McIlvaine (Na₂HPO₄ a 0,2 mol/L e ácido cítrico a 0,1mol/L, pH 5,0), adicionou-se 750 µl do extrato enzimático e 150 µl de solução dos ativadores EDTA a 4,0 x 10⁻³ mol/L e Cys a 10⁻² mol/L, segundo IEVLEVA (1990), levando-se ao banho-maria a 37 °C, por 30 min. Após interrupção da reação com a adição de 1500 µl de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % (p/v), a mistura foi centrifugada a 15.000 × g por 15 min, a 4 °C e, então, submetida às leituras de absorbância a 275 nm. A atividade proteolítica foi calculada pela equação (1) e a unidade expressa em µg × mL⁻¹ min⁻¹, sendo definida como a quantidade de enzima que produz o equivalente a 1 µg of tirosina por minuto, em pH 5,0 a 37 °C e a 275 nm.

$$U/mL = \frac{\mu g \text{ Tyr} \times V_f}{V_a \times t \times V_e} \quad (1)$$

sendo,

µg Tyr= valor obtido a partir da Abs da amostra;

V_f = volume total (em mL) de todas as soluções empregadas;

V_a = volume total (em mL) de extrato enzimático;

t = tempo (em minutos) de incubação;

V_e = volume utilizado (em mL) na cubeta, para a leitura da ABS.

A atividade específica foi, então, calculada empregando-se a equação (2), sendo expressa em U/mg proteína.

$$U/mg \text{ proteína} = \frac{U/mL}{Pt \text{ (mg/mL)}} \quad (2)$$

na qual,

U/mL = valor encontrado na equação anterior

Pt = proteínas totais, em mg/mL, no extrato enzimático.

A recuperação da atividade, obtida após o emprego dos processos de precipitação do extrato enzimático, foi calculada empregando-se a equação (3), sendo expressa em porcentagem:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Atividade específica do EP}}{\text{Atividade específica do EB}} \times 100 \quad (3)$$

2.2.5 Avaliação do efeito do pH e da temperatura na atividade específica e na estabilidade da enzima

No intuito de definir os valores ótimos de pH e de temperatura para a ação enzimática, seguiu-se a metodologia descrita por KUMAR (2002) e TREMACOLDI E CARMONA (2005), com as modificações citadas no item 2.2.4.

Para a avaliação do pH ótimo de ação enzimática, uma solução de hemoglobina a 0,5 % (p/v) foi preparada em diferentes valores de pH (3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) e incubada a 37 °C, seguindo-se a determinação da atividade específica (AE), como descrito acima.

A temperatura ótima foi determinada, incubando-se uma solução de hemoglobina a 0,5 % (p/v), no pH ótimo estabelecido acima e em diferentes valores de temperatura, ou seja, 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C, seguindo-se a determinação da atividade específica.

A estabilidade, em diferentes valores de pH, foi avaliada incubando-se os extratos enzimáticos na ausência do substrato por 24h a 4 °C, seguindo-se a determinação da atividade específica no pH ótimo (6,0) como descrito acima, cujo resultado representa a atividade específica residual, e é dado em porcentagem da AE inicial que foi mantida após este tratamento (24h – 4 °C). No estudo da termoestabilidade, os extratos enzimáticos foram incubados, na ausência do substrato, às temperaturas de 30 °C, 50 °C e 70 °C, por 120 min, sendo recolhidas amostras nos tempos 30, 60, 90 e 120 min para a determinação da atividade específica residual sobre a hemoglobina, cujo resultado representará a AE residual, e é dado em porcentagem da AE inicial mantida após este tratamento (diferentes temperaturas e tempos de incubação).

2.2.6 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan a 5 % de probabilidade para comparar os valores de atividade proteolítica e atividade específica determinados dos extratos bruto e purificado. A curva padrão de L-Tyr foi obtida por análise de regressão, empregando-se seis concentrações (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTO E PRECIPITADOS

Observa-se na Tabela I.1, que o extrato bruto apresentou valores bem mais elevados de atividade proteolítica (AP) (21,4 U/mL) e de proteínas (6,1 mg/mL) do que a maioria dos extratos precipitados (EP). Ressalta-se, ainda, que com relação à AP, apenas dois extratos purificados fugiram desta regra. Assim, o EP obtido por precipitação isoelétrica no pH 4,0 e o obtido por precipitação com etanol apresentaram valores de AP próximo ou superior ao EB, respectivamente. Dentre todos os extratos analisados, o precipitado com etanol foi o que apresentou o maior valor para a atividade específica (10,7 U/mg proteína), seguido pelo EP obtido por precipitação isoelétrica no pH 4,0 (7,7 U/mg proteína), sendo estes resultados bem superiores aos encontrados para os demais extratos.

Pode-se observar, ainda, na Tabela I.1 que, para os extratos precipitados com sulfato de amônio, os teores de proteína foram semelhantes para as diferentes concentrações testadas (média de 2,7 mg/mL), sendo que apenas o que utilizou 80 % apresentou valor inferior aos demais (2,2 mg/mL). Com relação à AP, os resultados obtidos foram praticamente iguais para as concentrações de 50 % (10,6 U/ml) e 80 % (10,4 U/mL), tendo sido superiores aos demais extratos (média de 8,1 U/mL). Sendo

assim, o EP obtido com uma concentração de 80 % apresentou a maior atividade específica (4,7U/mg proteína).

Tabela I.1 – Caracterização dos extratos enzimáticos da casca de abacaxi

Extratos enzimáticos	Teor proteínas (mg/mL)	Atividade proteolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)	R (%)
EB	6,1	21,4	3,5	100
EP – 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	2,8	9,6	3,4	97
EP - 50% (NH ₄) ₂ SO ₄	2,7	10,6	2,8	80
EP - 60% (NH ₄) ₂ SO ₄	2,7	7,9	3,1	89
EP - 70% (NH ₄) ₂ SO ₄	2,9	6,7	2,3	66
EP - 80% (NH ₄) ₂ SO ₄	2,2	10,4	4,7	134
EP - PI pH 4,0	3,2	20,8	7,7	220
EP - PI pH 5,0	3,4	10,5	1,5	43
EP - PI pH 6,0	3,0	9,0	1,6	46
EP - PI pH 7,0	2,2	8,7	1,1	31
EP - PI pH 8,0	3,4	15,4	3,4	97
EP - PI pH 9,0	1,9	4,6	2,4	69
EP - EtOH 2V	3,1	30,9	10,7	306

EB: extrato bruto; EP: extrato purificado; PI: precipitação isoelétrica; EtOH 2V: etanol 2 volumes; 40 %, 50 %, 60 %, 70 % e 80 %: frações de saturação de (NH₄)₂SO₄; R: recuperação.

Para os extratos obtidos pela precipitação isoelétrica, os teores de proteína foram semelhantes nos valores de pH 4 (3,2 mg/mL), 5 (3,4 mg/mL), 6 (3,0 mg/mL) e 8 (3,4 mg/mL), sendo que a precipitação em pH 7,0 e 9,0 levou à obtenção dos menores teores deste nutriente (2,2 e 1,9 mg/mL, respectivamente). Com relação à AP, os resultados variaram de 4,6 a 20,8 U/mL, para os extratos obtidos após precipitação em

pH 9,0 e 4,0, respectivamente. Assim, o EP obtido após a precipitação no menor valor de pH (4,0), apresentou a maior AE (7,7 U/mg proteína).

A variabilidade dos resultados descritos acima pode estar relacionada ao relato de SANTOS (1985), que observou que podem existir diferenças entre os valores de AP e AE dos extratos obtidos de cultivares diferentes e mesmo dentro de uma mesma cultivar, devido ao manejo agrícola empregado nas distintas plantações, além das influências do solo, clima, luminosidade que interferem diretamente no metabolismo do vegetal. Além disso, segundo PIZA (1997), as atividades proteolítica e específica de enzimas dependem de vários fatores, como variedade, parte e idade da planta da qual são extraídas.

Com relação ao extrato bruto, 2 trabalhos foram encontrados na literatura, sendo que 2 foram realizados com casca e um terceiro com caule de abacaxi. Assim, HEBBAR et al. (2008), determinaram a AE do extrato bruto de casca de abacaxi, obtendo um valor de 10,2 U/mg proteína, sendo este 3 vezes superior ao encontrado neste trabalho. Por outro lado, CÉSAR (2005) também utilizando a casca de abacaxi obtiveram um valor de 0,0011 U/mg proteína de AE para o EB, valor este muito inferior ao encontrado no presente estudo.

No que se refere aos extratos precipitados, o valor mais elevado de recuperação da atividade específica foi obtido para o EP preparado por precipitação com etanol (306 %), sendo este valor muito superior aos encontrados na literatura empregando-se a polpa de abacaxi. Assim, CÉSAR (2005) e SILVA (2008), relataram recuperação próxima a 100 % e de 266 %, para os extratos obtidos após precipitação com 80 % de etanol e 80 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente.

Assim, considerando os resultados apresentados, dentre todos os extratos obtidos, apenas o precipitado pelo etanol será utilizado neste trabalho, para a análise dos resultados assim como para a comparação com os dados de outros autores.

3.2 EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTO E PRECIPITADO

O efeito do pH na atividade específica dos extratos bruto e precipitado pode ser analisado na Figura I.1. Inicialmente, observa-se que os valores mais elevados de atividade específica para o EB foram obtidos em pH 6,0 (5,76 U/mL) e 7,0 (5,71 U/mL),

para os quais não houve diferença significativa, enquanto que para o EP a maior AE foi encontrada no pH 7,0 (16 %), a qual foi bem superior aos resultados máximos obtidos para o EB. Além disso, os dados da Figura I.1 indicam que os resultados de AE para o EP foram superiores aos de EB, em toda a faixa de pH estudada. Acrescenta-se, ainda, que houve uma maior variabilidade nos resultados encontrados para AE do EP do que do EB, na faixa de pH estudada, indo de 4,9 a 15,6 U/mL e de 2,9 a 5,8 U/mL, respectivamente. No caso do EP, após uma queda inicial ao se passar do pH 3 para 4, a AE aumentou com a elevação do pH até atingir o valor máximo no pH 7,0. A partir deste ponto, então, a AE voltou a decrescer, com o aumento do pH. Já para o EB, a AE manteve-se praticamente inalterada do pH 3,0 ao 5,0, quando, então, cresceu para atingir o máximo em pH 6,0 e 7,0, decrescendo a partir daí até pH 8,0, e ficando constante até pH 9,0.

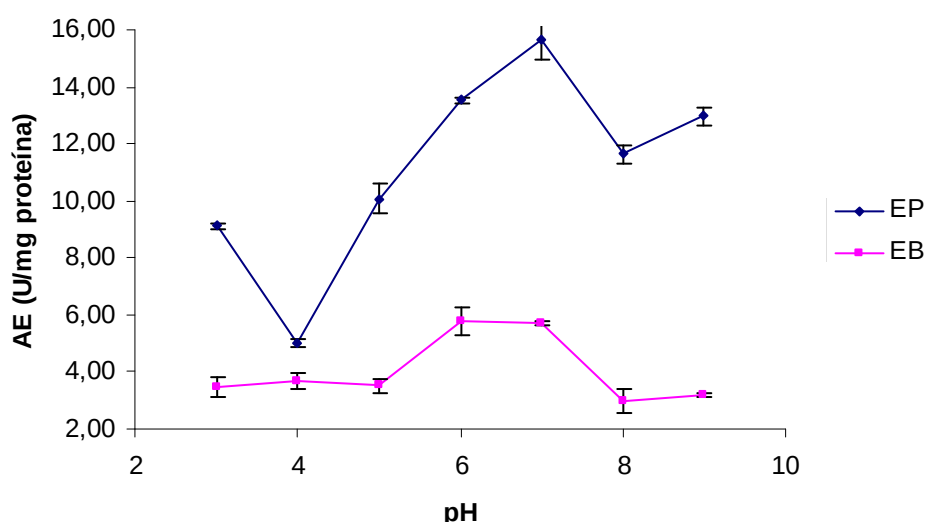


Figura I.1 – Efeito do pH na atividade específica dos extratos enzimáticos bruto e precipitado da casca de abacaxi. EB = extrato bruto; EP = extrato precipitado.

Em um único estudo encontrado na literatura envolvendo o EB da casca de abacaxi, LIANG et al. (1999) empregaram processamento semelhante ao do presente trabalho e relataram que o pH ótimo, ao contrário do aqui obtido, não foi encontrado apenas em um valor, mas sim dentro de uma faixa que foi de 6,8 a 9,0.

Alguns autores realizaram estudos empregando outras partes do abacaxi. Quanto aos relatos abordando o extrato bruto, 4 trabalhos foram encontrados na literatura, sendo que em todos eles, o método de preparo de EB foi diferente ao do presente trabalho, pois empregaram a prensagem hidráulica. Apenas no estudo de SUH et al. (1992), trabalhando com o caule, foi obtido o mesmo valor para o pH ótimo (pH 7,0), como o do presente trabalho. Estes mesmos autores encontraram para o EB do fruto do abacaxi valor mais elevado para o pH ótimo (pH 8,0). Trabalhando com o EB do pedúnculo do abacaxi, dois estudos encontraram valores inferiores aos do presente trabalho para o pH ótimo, estando, por outro lado, próximos entre si. Assim, HEINICKE e GORTNER (1957) citaram a faixa de pH ótimo de 4,6 a 5,4, enquanto que para GOLGHER (1977), a faixa foi de 4,0 a 5,0. No caso de se utilizar a polpa de abacaxi, SILVA (2008) obteve para o EB valor mais elevado para o pH ótimo (pH = 8,5), que o obtido no presente trabalho

No que se refere aos estudos realizados com o extrato precipitado, 2 trabalhos foram encontrados na literatura e, apesar de terem empregado métodos de precipitação e partes do abacaxi diferentes do presente trabalho, os resultados obtidos foram próximos. Assim, GOLGHER (1977) utilizou a acetona numa concentração de 20 % para obter o EP do pedúnculo de abacaxi e obteve o pH ótimo entre 6,9 e 7,2. Já, SILVA (2008) empregou o sulfato de amônio a 80 % e encontrou um pH ótimo de 7,2 para o EP da polpa de abacaxi.

Os resultados da influência da temperatura na atividade específica dos extratos enzimáticos bruto e precipitado estão apresentados na Figura I.2. Observa-se que, tanto para o EB como para o EP, a maior AE foi obtida à temperatura de 70 °C, sendo de 8,25 U/mL e 13,9 U/mL, respectivamente. Além disso, os resultados de AE para EP foram superiores aos do EB, em toda a faixa de temperatura estudada, tendo variado de 4,33 a 13,90 U/mL e de 3,1 a 8,25 U/mL, respectivamente.

Apesar de terem ocorrido algumas oscilações nos resultados, pode-se dizer que, de modo geral, a AE dos dois extratos aumentou com a elevação da temperatura, até atingir 70 °C, quando, então, houve uma queda acentuada até 80 °C, o que pode estar provavelmente associado a uma desnaturação térmica das enzimas, uma vez que, segundo SILVA (2008) o grupo sulfidríla do centro ativo da enzima pode ser facilmente oxidado a elevadas temperaturas.

Em relação ao extrato bruto, foram encontrados 2 trabalhos na literatura que avaliaram o efeito da temperatura sobre a AE, sendo 1 realizado com a casca e outro com a polpa de abacaxi. Assim, LIANG et al. (1999) observaram uma elevação da AE

com o aumento da temperatura, até atingir o valor máximo a 55 °C. Acima desta temperatura, houve um decréscimo da AE até atingir a inativação total à 80 °C. Apesar da temperatura ótima (55 °C) encontrada neste estudo ter sido inferior à determinada no presente trabalho (70 °C), foi, igualmente, observada por estes autores, a queda da atividade enzimática após ter atingido o valor máximo da temperatura. O resultado obtido por SILVA (2008) com a polpa de abacaxi para a temperatura na qual se obteve a AE máxima foi de 50 °C, portanto, muito próxima do relatado por LIANG et al (1999). Entretanto, a temperatura de inativação enzimática de 90 °C foi superior, tanto em relação ao estudo de LIANG como ao do presente trabalho.

Quanto aos trabalhos da literatura que abordaram o efeito da temperatura sobre a AE de extratos precipitados, nenhum relato foi encontrado utilizando a casca de abacaxi. No total, apenas 2 estudos e, assim mesmo bem antigos, envolveram o efeito da temperatura sobre a AE de extratos precipitados com acetona, provenientes do pedúnculo, caule e fruto do abacaxi, tendo sido obtidos valores de temperatura ótima inferiores aos do presente trabalho. Assim, OTA et al. (1964) relataram que a temperatura ótima de ação proteolítica dos extratos provenientes tanto do caule como do fruto de abacaxi, após a adição de 2 volumes de acetona foi de 50 °C, não tendo sido mencionada a temperatura de inativação enzimática. O mesmo valor para a temperatura ótima (50 °C) foi encontrado por GOLGHER (1977), ao estudar a atividade específica do EP de pedúnculo de abacaxi, precipitado com 20 % de acetona. Da mesma maneira, este autor não citou a temperatura de inativação enzimática.

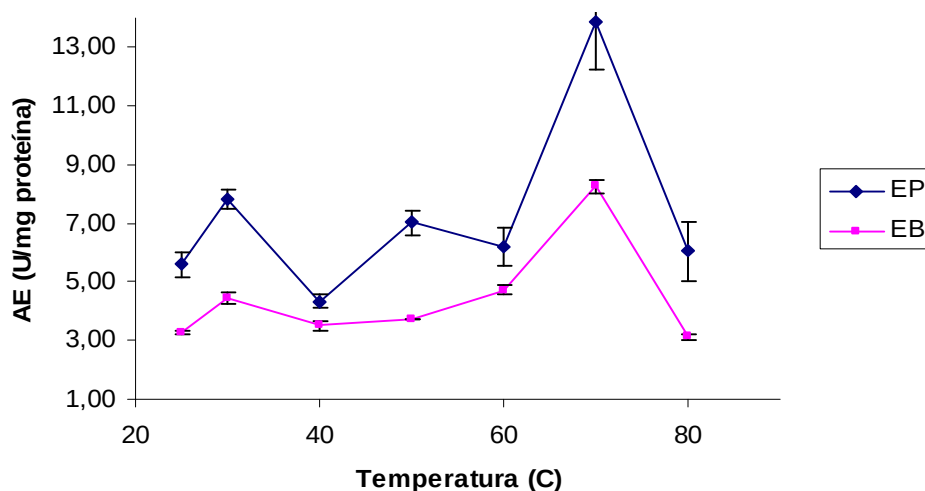


Figura I.2 – Efeito da temperatura na atividade específica dos extratos enzimáticos bruto e precipitado da casca de abacaxi. EB =extrato bruto; EP = extrato precipitado.

3.3 EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTO E PRECIPITADO

A análise do efeito do pH sobre a estabilidade dos extratos bruto e precipitado da casca de abacaxi pode ser feita pelos dados apresentados na Figura I.3. Inicialmente, com relação ao efeito do pH, observa-se para o EB que a porcentagem da atividade específica residual foi semelhante em toda a faixa de pH estudada. Ressalta-se, ainda que, o EB não foi estável em toda esta faixa (pH de 3,0 a 9,0), tendo apresentado valores reduzidos de porcentagem de atividade residual (de 14 % a 20 %). Acrescenta-se, ainda que nos valores de pH de 6,0 e 8,0 a estabilidade foi ligeiramente maior, uma vez que foram mantidas 20 % e 19 %, respectivamente, da AE inicial, não sendo observada diferença significativa entre estes dois valores.

No caso do EP, observa-se na Figura I.3 que a porcentagem da atividade residual variou de 40 % a 90 % ao longo da faixa de pH estudada (3,0 a 9,0), sendo que o maior valor foi apresentado no pH 7,0. Ressalta-se, ainda, que o EP foi mais estável que o EB, em toda a faixa de pH estudada.

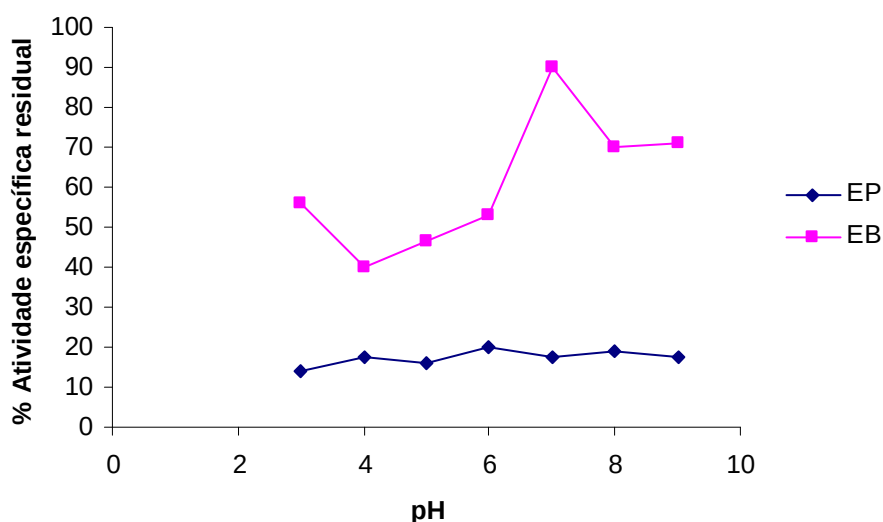


Figura I.3 – Efeito do pH na estabilidade dos extratos enzimáticos bruto e precipitado da casca de abacaxi

Considerando que, para a avaliação do efeito do pH na estabilidade, os extratos enzimáticos foram incubados por um período de 24h, poderia se atribuir, à princípio, a perda da atividade à oxidação do grupamento sulfidril situado no centro ativo de

enzimas, tais como a bromelina. Porém, o emprego da cisteína neste ensaio, com a função de regenerar o grupamento SH do centro ativo, reduz a possibilidade da influência deste fator.

Dessa forma, uma explicação mais plausível para esta perda da estabilidade poderia estar associada à ocorrência de uma autólise enzimática durante o período de 24h de incubação, em diferentes valores de pH (OTA et al., 1964; GOLGHER, 1977).

No que se refere à maior estabilidade do EP que a do EB, observada em toda a faixa de pH estudada, uma possível explicação para este fato pode estar associada à eliminação de alguns componentes do extrato enzimático, através do tratamento com etanol, que poderiam estar interferindo negativamente na estabilidade do EB, tornando-se mais susceptível à um processo de degradação.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram a estabilidade dos extratos bruto e precipitado de casca de abacaxi com a variação do pH. Um único estudo encontrado foi realizado com a polpa de abacaxi no qual foi demonstrado que, ao contrário do presente trabalho, o EB foi muito estável em ampla faixa de pH (5,0 a 9,0) (SILVA, 2008).

No que se refere ao efeito da temperatura, em diferentes tempos de incubação, pode-se observar na Figura I.4 que houve perda da estabilidade para o EB e o EP em todos os valores testados, confirmada pela queda na porcentagem da AE residual. No caso do EB, nota-se que este apresentou maior estabilidade à temperatura de 70 °C do que a 30 °C e 50 °C, para os tempos de 60 min e 90 min, tendo revelado valores médios de porcentagem de AE residual de 52 %; 40 % e 38 %, respectivamente. Por outro lado, para os tempos de 30 min e 120 min, sua estabilidade a 70 °C foi igual ou inferior às demais temperaturas, respectivamente. Observa-se, ainda, uma queda pronunciada na estabilidade do EB ao se passar de 90 min para 120 min de incubação a 70 °C, tendo sido reduzida de 53 % para 35 % da AE inicial.

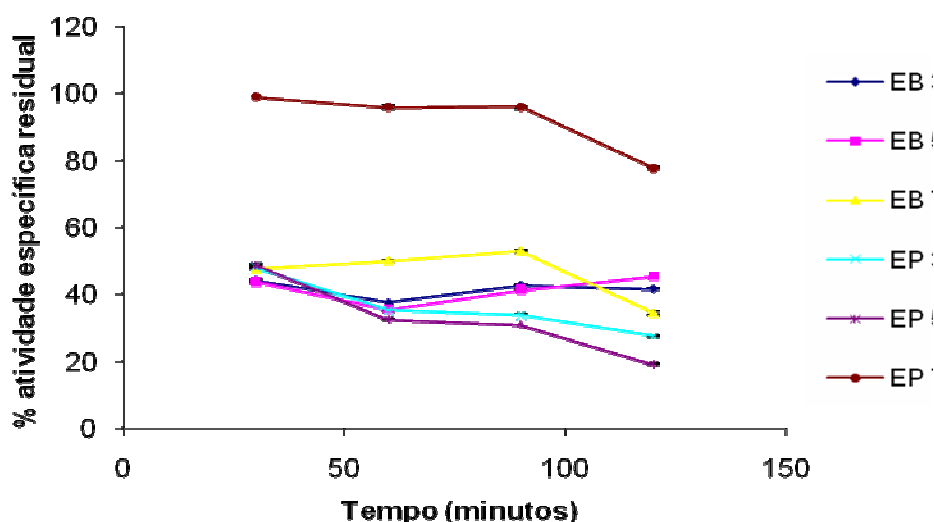


Figura 1.4 – Efeito da temperatura na estabilidade dos extratos enzimáticos bruto e precipitado da casca de abacaxi.

Em relação ao extrato precipitado, nota-se na Figura 1.4 que a sua estabilidade foi muito superior à temperatura de 70 °C, do que a 30 °C e 50 °C, para os 4 intervalos de tempo estudados, apresentando valores médios de porcentagem de AE residual de 92 %; 36 % e 33 %, respectivamente. Acrescenta-se, ainda que, de forma semelhante ao observado para o EB, houve redução importante da estabilidade quando o tempo de incubação foi elevado de 90 para 120 min, passando de 96 % para 78 % da AE inicial. Comparando-se os resultados obtidos para os dois extratos (EB e EP), observa-se na Figura 1.4 que a 70 °C o EP apresentou maior estabilidade do que o EB em todos os tempos estudados. Entretanto, para as demais temperaturas (30 °C e 50 °C), o EP foi mais estável do que o EB apenas após 60 min de incubação.

A perda da atividade enzimática durante a incubação, observada mesmo a temperaturas amenas, poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela composição dos extratos enzimáticos, pois estes contém, além da bromelina, outras enzimas e diversos componentes ativos de tamanhos variados (LEE et al., 1969). Sendo assim, esta perda se constitui num processo de alta complexidade, uma vez que existem vários compostos envolvidos que poderiam sofrer processos de autólise ou proteólise, gerando peptídeos capazes de promover a inativação do sítio ativo da enzima, nestas temperaturas (BICKERSTAFF et al., 1993).

Quanto à perda da atividade enzimática observada a temperaturas de incubação mais elevadas, uma explicação plausível para este fato está associada à afirmação de ARROYO-REYNA & HERNANDEZ-ARANA (1995), segundo a qual a elevação da temperatura ocasiona a formação de estados de transição de energia, sendo este processo acompanhado de uma pequena, mas significativa desordem no sítio ativo da enzima, além da ruptura das principais ligações que estabilizavam a estrutura nativa da proteína, comprometendo sua capacidade hidrolítica.

Acrescenta-se ainda, que a maior estabilidade do EP comparada à do EB, na maioria das condições de tempo e temperatura estudadas pode, também, ser explicada, pelos mesmos fatores que interferiram na estabilidade em relação ao pH, e que foram descritos acima.

Somente um trabalho foi encontrado na literatura relatando a influência da temperatura na estabilidade do extrato bruto proveniente da casca de abacaxi. Assim, os resultados aqui encontrados foram comparados, também, com os obtidos de diferentes partes do abacaxi.

Dessa forma, no único estudo que foi realizado com a casca de abacaxi, LIANG et al. (1999) observaram que, após 60 min de incubação a 60 °C, o EB manteve 50 % de sua atividade específica inicial, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho, incubando-se o EB por um mesmo período de tempo, porém à temperatura de 70 °C (50 % da AE inicial).

Envolvendo outras partes do fruto, três estudos foram realizados sobre a estabilidade do extrato bruto da polpa de abacaxi, sendo que em 2 deles os extratos foram incubados à temperatura de 60 °C, durante 30 min (SINGH et al., 2003) e 120 min (SILVA, 2008), tendo sido observado a manutenção de 87 % e 80 % da AE inicial, respectivamente, valores estes superiores aos obtidos no presente trabalho, quando o EB da casca de abacaxi foi incubado pelos mesmos períodos de tempo (30 e 120 min) à temperatura de 50 °C (44 % e 40 %, respectivamente). Entretanto, quando o EB foi incubado a 70 °C (SILVA, 2008) durante 30 min, obteve-se apenas 8 % da AE inicial, valor muito inferior ao encontrado no presente trabalho nesta mesma temperatura (48 % da AE inicial). No terceiro estudo, SRIWATANAPONGSE et al. (2000) estudaram a estabilidade térmica do extrato enzimático bruto obtido a partir da polpa de abacaxi e relataram que, quando o aquecimento foi conduzido a 55 °C, por 2 h, encontrou-se apenas 30 % da atividade específica residual, sendo este valor inferior ao observado no

presente trabalho após o aquecimento a 50 °C, por 2h do extrato da casca do abacaxi (40 % de atividade específica residual).

Empregando-se o caule de abacaxi, incubado a 60 °C, por 60 min e 90 min, GUPTA et al. (2003) observaram a manutenção de apenas 25% da AE inicial, para os dois casos, valor este inferior ao obtido no presente estudo, quando o EB foi incubado a 70 °C por 60 min (50 %) e 90 min (53 %).

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram o efeito da estabilidade térmica sobre o EP proveniente de casca de abacaxi ou de outras partes do fruto.

4 CONCLUSÃO

O extrato enzimático bruto (EB) obtido da casca do abacaxi apresentou o pH de 6,0 e 7,0 e a temperatura de 70 °C como sendo os valores ótimos de atividade enzimática. Dentre os três procedimentos de precipitação testados o que empregou o etanol levou ao extrato que apresentou o valor mais elevado de atividade específica (10,7 U/mg proteína), com pH ótimo de 7,0 e temperatura ótima de 70 °C. A avaliação da estabilidade térmica dos extratos enzimáticos e também em diferentes valores de pH demonstrou maior estabilidade para o EP do que para o EB, sendo que este primeiro extrato manteve, em média, 61 % e 54 % da AE inicial, comparando-se com 17 % e 43 %, do EB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.
- ARROYO-REYNA, A.; HERNÁNDEZ-ARANA, A. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochim. biophys. acta.*, v. 1248, p. 123-128, 1995.
- BICKERSTAFF, G.F.; ZHOUT, H. Protease activity and autodigestion (autolysis) assays using coomassie blue dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 210, p. 155-158, 1993.
- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p.146-156, 2004.
- CÉSAR, A.C. *Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, 2005.111p. (Tese, Doutorado em Engenharia Química).

- COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F., FURTADO, A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *B.Ceppa*, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.
- DEVAKATE, R.V.; PATIL, V.V.; WAJE, S.S.; THORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technol*, v. 64, p.259–264, 2009.
- GOLGHER, M. *Otimização do processo de obtenção da bromelina em escala de laboratório*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 1977. 70p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas).
- GUPTA, P.; KHAN, R.H.; SALEEMUDDIN, M. Binding of antibromelain monomeric Fab improves the stability of stem bromelain against inactivation. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1646, p. 131– 135, 2003.
- HALE, L.P.; GREER, P.K.; TRINH, C.T.; JAMES, C.L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunopharmacol.*, v. 5, p. 783–793, 2005.
- HEBBAR, H.U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol*, v. 99, p. 4896–4902, 2008.
- HEINICKE, R.M.; GORTNER, W.H. Stem Bromeline.:New protease from pineapple plant. *Econ. Bot.*, New York, v.11, n.3, p.225-254, 1957.
- IEVLEVA, E.V.; ZIMACHEVA, A.V.; HUAN, P.H.; NHAN, V.H.; MOSOLOV, V.V. Proteinases from proliferous tops of pineapple fruits. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, v.27, n.5, p.639-645, 1990.
- KUMAR, C.G. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett Appl Microbiol*, v. 34, p.13-17, 2002.
- LIANG, H.H.; HUANG, H.H.; KWOK, K.C. Properties of tea-polyphenol-complexed bromelain. *Food Res. Int.*, v. 32, p. 545-551, 1999.
- LIMA, J.D.; MORAES, W.S.; MENDONÇA, J.C.; NOMURA, E.S. Resíduos da agroindústria de chá preto como substrato para produção de mudas de hortaliças. *Cienc. Rural*, v.37, n.6, p.1609-1613, 2007.
- LOPES, F.L.G.; JÚNIOR, J.B.S.; SANTANA, J.C.C.; SOUZA, R.R.; TAMBOURGI, E.B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.). *Rev. Bras. de Prod. Agroind.*, v. 7, n.1, p. 33-38, 2005.
- MARIN, C.M.; SUTTINI, P.A.; SANCHES, J.P.F.; BERGAMASCHINE, A.F. Potencial produtivo e econômico da cultura do abacaxi e o aproveitamento de seus subprodutos na alimentação animal. *Ciênc. Agr. Saúde*, v. 2, n. 1, p 79 – 82, 2002.
- OTA, S.; MOORE, S.; STEIN, W.H. Preparation and Chemical Properties of Purified Stem and Fruit Bromelains. *Biochem.*, v.3, n. 2, p.180-185, 1964.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- PIZA, I.M.T. *Poliaminas e micropropagação do abacaxizeiro (Ananás comosus L.) cv. Smooth Cayenne*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista (UNESP).1997.107p. (Dissertação, Mestrado).
- SANTOS, S.A. *Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro Ananás comosus (L.) Merr.cv.Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração*. Lavras: Universidade Federal de Lavras.1985. 51p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- SANTOS, R C. *Obtenção de proteases de Penicilium candidum e seu emprego no preparo de hidrolisados protéicos de soro de leite com baixo teor de fenilalanina*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2005. 99p. Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos),
- SCOPES, R. Protein purification: principles and practice, 3ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380p.

- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em Alimentos Protéicos*. São Paulo: Varela, 1996. 520p.
- SILVA, R.A. *Caracterização físico-química e purificação da bromelina do Ananas comosus (L.) merrill (Abacaxi-bromeliaceae)*. Recife: Centro de Ciências Biológicas da UFPE. 2008. 83p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica e Fisiologia).
- SINGH, L.R.; DEVI, Y.R.; DEVI, S.K. Enzymological characterization of pineapple extract for potential application in oak tasar (*Antheraea proylei* J.) silk cocoon cooking and reeling. *Elect. J. Biotechnol.*, v.6, n.3, 2003.
- SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice. *American Society of Agricultural Engineers*, v.43, n.6, p.1703-1708, 2000.
- SUBRAMANIAN, N.; CARTAXO, M.E.Q.; SUBRAMANIAN, S.; FARIAS, J.L. Study of Bromelain present in the pineapple plant of Paraíba. *Ciênc. Cult.*, v. 30, n.11, p.1327-1333, 1978.
- TREMACOLDI, C.R.; CARMONA, E.C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. *World J Microbiol. Biotechnol.*, v.21, p.169–172, 2005.

CAPÍTULO II

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO QUANTITATIVO PARA DETERMINAÇÃO DE FENILALANINA EM FARINHA DE TRIGO POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA SEGUNDA

RESUMO

A introdução de farinha de trigo na alimentação de fenilcetonúricos é proibida e depende do nível de fenilalanina (Phe) no soro destes pacientes, obedecendo-se os limites determinados na legislação. Assim, a confiabilidade das determinações dos teores de Phe neste alimento é determinante para sua utilização nas dietas de fenilcetonúricos. O presente trabalho teve como objetivo validar um método quantitativo para determinação de Phe em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda (EDS). Assim, foi pesada uma quantidade de 0,525 g de farinha de trigo comercial tipo I, que foi submetida à hidrólise ácida com HCl a 5,7 mol/L, a 110 °C, por 24 h e, posteriormente, reconstituído em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0. As soluções preparadas, a partir desta amostra, foram submetidas às leituras de absorvância, entre 230 nm e 280 nm, em espectrofotômetro UV/VIS. Traçou-se os espectros de derivada segunda, sendo os valores das áreas dos picos negativos utilizados para estimativa dos teores de Phe. A linearidade do método foi obtida na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL (correspondente a 251 mg/100g a 877 mg/100g de Phe em farinha de trigo). Efeitos de matriz significativos foram observados, demonstrando a necessidade do emprego do método de adição para determinação da Phe em amostras de farinha de trigo. A análise de Phe não sofreu interferência de compostos como L-tirosina e L-triptofano. As porcentagens de recuperação variaram de 81,34 % a 117,83 %, e os desvios padrão

relativos de repetitividade e reprodutibilidade parcial foram de 10,95 % e 14,52 %, respectivamente, para amostras no nível de 354mg Phe/100g. Tais resultados sugeriram adequada recuperação e precisão do método neste nível. Os limites de detecção e quantificação foram de 63mg/100g e 175mg/100g, respectivamente. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram a adequação do método para o monitoramento e controle de teores de Phe em farinha de trigo

Palavras-chave: farinha de trigo, fenilalanina, espectrofotometria derivada segunda, validação de métodos.

1 INTRODUÇÃO

A Fenilcetonúria (PKU) é uma desordem autossomal recessiva, causada pela deficiência ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), resultando em redução ou ausência da conversão da L-fenilalanina (Phe) em L-tirosina (L-Tyr) e, conseqüentemente, no aumento da produção de metabólitos, tais como, fenilactato, piruvato, ortohidroxi-fenilacetato e feniletilamina (RAMASWAMI & SMITH, 1997; STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000). O acúmulo desses metabólitos anormais e de Phe no plasma podem ocasionar graves conseqüências no sistema nervoso central, ainda durante a infância, assim como falhas no andar ou falar, tremor, microcefalia, falhas no crescimento e retardo mental, progressivo e irreversível (STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000).

O tratamento da PKU é basicamente dietético e consiste na redução dos níveis plasmáticos elevados de Phe para concentrações consideradas não lesivas ao sistema nervoso, de acordo com a faixa etária do paciente (STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000; HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MARCO & WAITZBERG, 2004). Esta dieta pobre em Phe deve ser iniciada até o 21º dia de vida do recém-nascido, e mantida por toda a vida (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS et al., 1993; SHIMAMURA et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000).

Os produtos designados para grupos especiais de consumidores, como os fenilcetonúricos, devem apresentar, de forma bem especificada, o teor dos componentes cuja ingestão deve ser controlada. Para isto, a dosagem de Phe nos alimentos deve ser realizada empregando-se métodos analíticos confiáveis (PIECYK et al., 2007).

Várias técnicas podem ser utilizadas para dosar o teor de Phe nos alimentos, tais como analisador de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1986; PIECYK et al., 2007), pelo emprego de um sensor enzimático de membrana, “enzyme membrane sensor” (SHIMAMURA et al., 1999), HPLC hidrofílica (CARREIRA et al., 2002) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (PIECYK et al., 2007).

A espectrofotometria derivada segunda (EDS) é uma técnica analítica simples, rápida e de custo baixo, considerada, por vários autores, como um método quantitativo e qualitativo vantajoso, de grande utilidade. Baseia-se na derivação do espectro de absorção normal dos compostos analisados (O’HARVER, 1979; RAGONE, et al., 1984; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988).

ICHIKAWA & TERADA (1977, 1979, 1981a,b) relataram a eficiência da EDS para medir Phe em proteínas ou em hidrolisados protéicos. Estes autores, primeiramente, examinaram resíduos de Phe em proteínas e demonstraram que, entre 245 nm e 270 nm, os resíduos de aminoácidos de L-Tyr e Triptofano (L-Trp) não interferiram significativamente nas propriedades da Phe. Dois anos mais tarde, determinaram a Phe, por esta técnica, em proteínas desnaturadas, encontrando resultados que concordavam com os descritos na literatura. Vários autores têm relatado a grande confiabilidade do uso da EDS, nesta faixa de comprimento de onda, para quantificar os resíduos de Phe em proteínas, desde que variáveis como o pH e a adição de outras substâncias sejam controladas (BRANDTS & KAPLAN, 1973; MATSUSHIMA et al., 1975; ICHIKAWA & TERADA, 1977; ; ICHIKAWA & TERADA 1979; O'HARVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; ICHIKAWA & TERADA, 1981a,b; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988).

Ressalta-se, ainda, que no laboratório onde o presente trabalho foi desenvolvido, a EDS foi utilizada, com êxito, para a avaliação da taxa de encapsulamento de hidrolisados protéicos e do grau de exposição de Phe (BARBOSA et al., 2004; MORAIS et al., 2005), assim como para a quantificação de Phe em diversos hidrolisados enzimáticos de diferentes fontes protéicas, tais como o leite em pó desnatado (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), o soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), o fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), o arroz em grãos (LOPES et al., 2008), o feijão (LOPES Jr., 2008), a farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009), o concentrado protéico de soro de leite (SILVA, 2009) e o leite integral (SOUZA et al., 2009).

A farinha de trigo ocupa um lugar relevante na alimentação do brasileiro, com grande utilização no preparo de alimentos, tanto em nível doméstico quanto industrial. Entretanto, sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos é proibida, e depende do nível de Phe no soro destes pacientes, pois faz parte dos alimentos de uso proibido para fenilcetonúricos (NUPAD, 2008). Neste sentido, a confiabilidade dos resultados das determinações dos teores de Phe em farinhas é determinante para que este alimento seja utilizado de maneira segura nas dietas de fenilcetonúricos.

Apesar de fundamentais para a garantia da confiabilidade dos resultados de ensaios, as validações de métodos ainda têm sido reconhecidas como um dos pontos críticos em sistemas de gestão da qualidade laboratoriais (KING, 2003). Processos de validação que fornecem parâmetros de desempenho, indicando adequação para uso de um determinado método, têm dominado as aplicações práticas. Todavia, sabendo-se que os estudos de validação são fundamentalmente baseados em testes de hipóteses

estatísticas, os procedimentos de validação também devem fornecer uma verificação básica de que as premissas feitas, com relação aos princípios destes testes, não sejam violadas (THOMPSON et al., 2002).

Considerando que não existem relatos na literatura sobre o emprego da EDS para a quantificação de Phe em farinha de trigo, bem como sobre a validação de métodos quantitativos para a análise de Phe em outros alimentos por EDS ou por diferentes técnicas, este trabalho objetivou a validação intralaboratorial de um método de ensaio com propósito de quantificação de Phe em farinha de trigo por EDS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Foram utilizados 5 pacotes de farinha de trigo tipo I, contendo 1 kg cada, amostrados aleatoriamente e adquiridos em um único comércio de Belo Horizonte, MG, Brasil. Estas amostras, da mesma marca e lote, foram homogeneizadas por quarteamento, e armazenadas em frascos de vidros, devidamente identificados e hermeticamente fechados, sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C.

2.1.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.1.2.1 Soluções estoque de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano a 0,001 mol/L

As soluções estoque de aminoácidos foram preparadas por pesagem (balança analítica eletrônica, Hangping, FA 2004, Shanghai, China) e dissolução de 0,0041 g; 0,0045 g e 0,0051 g dos respectivos padrões de Phe, L-Tyr e L- Trp (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para 25 mL de tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, em balão volumétrico. Estas soluções foram preparadas no mesmo dia dos ensaios, sendo mantidas armazenadas sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C, até o momento do uso.

2.1.2.2 Soluções da curva de calibração de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano

Soluções de 0; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL foram preparadas pela diluição de alíquotas de 0, 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 μ L (Pipetman, P100 e P1000) das respectivas soluções estoque para 5 mL de tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, em balão volumétrico. Estas soluções foram preparadas no momento dos ensaios.

2.1.2.3 Solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0

O fosfato de sódio monobásico (solução A) (Synth, Diadema, SP, Brasil) na quantidade de 24,01 g e 28,40 g de fosfato de sódio bibásico (solução B) (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram pesados (balança analítica eletrônica, Hangping, FA 2004, Shanghai, China) e diluídos, separadamente, para 1000 mL de água destilada e deionizada, em balão volumétrico. Estas soluções foram utilizadas no ajuste do pH para 7,0 (Potenciômetro, Quimis, Q 400 A, Diadema, SP, Brasil). Esta solução tampão foi preparada no mesmo dia dos ensaios, sendo armazenada sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C, até o momento do uso.

2.1.2.4 Solução de ácido clorídrico a 5,7 mol/L

O ácido clorídrico concentrado a 37 % (Synth, Diadema, SP, Brasil) (48 mL) foi diluído com 52 mL de água destilada e deionizada. Esta solução foi preparada semanalmente e armazenada a 25 °C $\pm$ 5 °C.

2.1.2.5 Solução de hidróxido de sódio a 3 mol/L

O hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) na quantidade de 120,00 g foi pesado (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China) e dissolvido em água destilada e deionizada, em banho de gelo, e transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada e deionizada. Essa solução foi preparada semanalmente e armazenada a 25 °C $\pm$ 5 °C.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Hidrólise ácida

A farinha de trigo tipo I foi submetida à hidrólise sob vapor ácido (HCl a 5,7 mol/L, 110 °C, 24 h) para liberação da Phe. Assim, pesou-se 0,525 g de farinha de trigo (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China), quantidade esta que foi uniformemente distribuída em 12 tubos de borossilicato de 0,5 cm de diâmetro (Hialoquímica, Belo Horizonte, MG, Brasil). Estes tubos foram agrupados em um frasco maior, ao qual foi adicionado 0,75 mL de HCl a 5,7 mol/L. Este frasco foi fechado, mantido sob vácuo por 30 min e levado para hidrólise a 110 °C em estufa (Quimis, Q-317 B-12, Diadema, SP, Brasil), por 24 h. O material presente nos tubos foi reconstituído em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0. Seguiu-se o ajuste do pH para 7,0 com solução de hidróxido de sódio a 3 mol/L e a transferência para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com a solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0. A amostra hidrolisada foi filtrada (papel de filtro qualitativo, J.Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e armazenada sob refrigeração, até o momento do uso. Desta solução de farinha hidrolisada, foram retirados 1,9 mL completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico, com solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0.

2.2.2 Determinação espectrofotométrica da L-fenilalanina

As soluções foram submetidas às leituras de absorvância entre 230 nm e 280 nm em espectrofotômetro CECIL (modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra), para cobrir a faixa de absorção da Phe que varia de 245 nm a 270 nm (ROJAS et al., 1988). Os espectros de derivada segunda foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro. Neste intervalo, a Phe apresentou picos negativos na derivada. A área do pico de maior amplitude, situado entre 255nm e 260nm, foi escolhida para ser integrada. Os valores das áreas correspondentes foram utilizados, na análise de regressão, para o cálculo do teor de Phe na farinha de trigo.

2.3 PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros linearidade, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão, assim como limites de detecção e de quantificação do equipamento foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão e materiais de referência. A adequação para uso do método foi avaliada, em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos. O procedimento de validação adotado foi baseado em um delineamento experimental simples e testes estatísticos robustos, incluindo verificações das premissas relacionadas a cada teste (SOUZA et al., 2005, SOUZA et al., 2007a, SOUZA et al., 2007b) O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

2.3.1 Linearidade

A avaliação da linearidade foi conduzida conforme procedimentos propostos por SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Uma curva de calibração foi preparada, nos níveis de concentração 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0 (correspondentes a 251, 376, 501, 627, 752 e 877 mg/100g de Phe em farinha de trigo), sendo três replicatas independentes de cada nível. As soluções foram analisadas em ordem aleatória. Brancos foram preparados em triplicata para avaliação do ruído, mas não foram incluídos nos cálculos da regressão. Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Em seguida, gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e examinados para investigação de perfis óbvios, sendo indicados como *outliers* (valores dispersos) os pontos fora do intervalo $\pm t_{(0,975;n-2)} S_{res}$, sendo S_{res} o desvio padrão dos resíduos da regressão (MEYER & ZUND, 1993). Os *outliers* foram formalmente diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife (BELSLEY, KUH & WELSCH, 1980). Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados, ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados (HORWITZ, 1995). As premissas relativas à análise de regressão foram verificadas sendo: normalidade (RYAN & JOINER, 1976), homoscedasticidade (LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974) e independência dos resíduos da regressão (DURBIN & WATSON, 1951). Testes de F foram conduzidos para verificar o

ajuste ao modelo linear, por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade (DRAPER & SMITH, 1998).

2.3.2 Efeitos de matriz

Para verificação dos efeitos de matriz, duas curvas de calibração foram estudadas nos níveis de 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL, sendo cada nível em três replicatas independentes, e analisadas em ordem aleatória, na mesma bateria analítica. A curva usual do analito foi preparada conforme descrito nos experimentos de avaliação da linearidade. Para a curva do analito na matriz utilizou-se 1,9 mL de amostras hidrolisadas de farinha de trigo adicionados de 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 µL da solução estoque de Phe, completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico, com solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0. Brancos foram preparados para cada curva, mas não foram incluídos nos cálculos.

Os parâmetros da regressão foram estimados, e as premissas relativas ao MMQO também foram verificadas para estas curvas. Uma vez comprovadas as premissas e o ajuste ao modelo linear, a inclinação e a interseção obtidas para a curva usual foram comparadas com aquelas calculadas para a curva em matriz. A premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas foi avaliada pelo teste de F (SNEDECOR & COCHRAN, 1989), para verificar se inclinações e interseções seriam comparadas pelo teste de t com as variâncias combinadas ou distintas (ARMITAGE & BERRY, 1994).

2.3.3 Seletividade

Para complementar os estudos de efeitos de matriz, nos quais foram considerados interferentes oriundos das amostras, reagentes e materiais envolvidos nos ensaios, a seletividade também foi investigada por meio de experimentos com Phe na presença e ausência de outros aminoácidos aromáticos.

Três curvas de calibração foram construídas, sendo de L-Tyr, L-Trp e Phe, cada uma com 3 pontos (0,010, 0,020 e 0,035 mg/mL), em triplicata. Em seguida, três outras curvas de calibração foram preparadas, sendo a primeira contendo um *pool* dos três aminoácidos, a segunda com Phe associada à L-Tyr e a terceira composta de Phe e L-Trp, todas nas concentrações de 0,010, 0,020 e 0,035 mg/mL, em triplicata.

2.3.4 Exatidão, precisão e limites

Devido a inexistência de materiais de referência certificados devidamente caracterizados para Phe em farinha de trigo, os parâmetros recuperação e precisão (sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial) foram pesquisados em ensaios com materiais de referência (amostras previamente caracterizadas por HPLC no nível de 354 mg/100g, representativas dos níveis reportados para Phe em farinha de trigo em tabelas de composição centesimal, com valores médios de 400mg de Phe/100g de farinha de trigo) (USDA, 2006). Doze replicatas independentes destas amostras foram divididas em quatro lotes, em triplicata, analisadas em quatro baterias analíticas diferentes, por dois analistas. As concentrações de Phe foram preditas por meio de equações obtidas pelo método de adição de padrão de Phe nas amostras, devido aos resultados dos estudos de efeitos de matriz.

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs (GRUBBS, 1969; BARRET & LEWIS, 1994; BURKE, 2001). As estatísticas de Grubbs para um *outlier* (G_1), dois *outliers* vicinais (G_2) e dois *outliers* polares (G_3), foram calculadas simultaneamente para os resultados obtidos no nível de concentração estudado. A indicação de *outlier* por, pelo menos, uma destas estatísticas seria suficiente para excluir o dado. Após um primeiro ciclo, o teste de Grubbs foi sucessivamente aplicado até que novos *outliers* não fossem detectados, ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados de recuperação aparente (HORWITZ, 1995).

A inexatidão foi investigada por meio da média de recuperação obtida para as replicatas de amostras adicionadas no nível de concentração estudado, após o diagnóstico de *outliers*. O critério de aceitabilidade adotado foi de média de recuperação entre 80 % a 110 % (EC, 2002).

As precisões, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, foram expressas em termos de desvios padrão relativos (DPR_r) e (DPR_R), respectivamente, e estimadas por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos para as doze replicatas de amostras adicionadas no nível de concentração estudado (ISO, 1994; ISO, 1998, KUTTATHARMMAKUL et al., 1999; MAROTO et al., 1999). As premissas de normalidade (RYAN & JOINER, 1976) e homoscedasticidade dos resíduos dos resultados de recuperação (LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974), relativas à análise de variância, foram previamente testadas. Devido à indisponibilidade de farinha de trigo sem o analito Phe, os limites de detecção e de quantificação teóricos foram

estabelecidos como a média das leituras obtidas para branco de solvente mais três e dez desvios padrão, respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 LINEARIDADE

Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação da linearidade estão demonstrados nas Figuras II.1, II.2, II.3, II.4, II.5 e na Tabela II.1. As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são homoscedásticos e independentes foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego adequado do MMQO sem ponderações.

A Figura II.1 ilustra o gráfico exploratório dos resíduos da regressão com indicação dos *outliers* tratados.

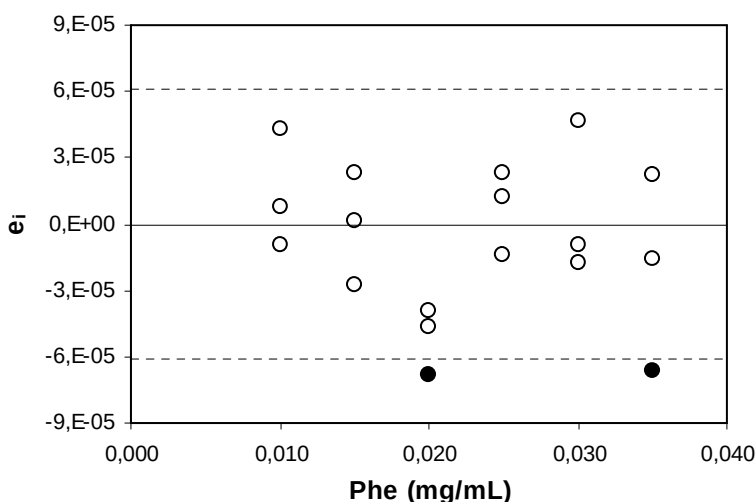


Figura II.1 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com indicação dos respectivos *outliers* diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

e_i = resíduo da regressão, • = *outlier*, - - - = $\pm t_{(0,975;n-2)} s_{res}$.

O perfil destes gráfico de resíduo demonstrou que não houve tendências óbvias que demonstrassem heteroscedasticidade ou desvio de linearidade. Os intervalos de confiança dos resíduos ($\pm t_{(0,975;n-2)} S_{res}$) sugeriram a presença de dois *outliers*, sendo um no nível 0,020 mg/mL e outro no nível 0,035 mg/mL, os quais foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

O gráfico de Ryan-Joiner, ilustrado na Figura II.2, indicou correlação significativa entre os resíduos da regressão obtidos para cada curva e os valores normais teoricamente esperados. O coeficiente de correlação foi de 0,9895, com valor crítico de 0,9529, demonstrando que o desvio da distribuição normal não foi significativo ($p > 0,10$).

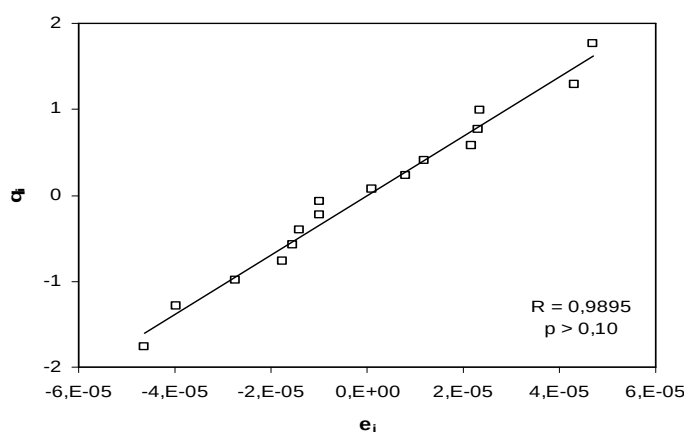


Figura II.2 - Gráfico de probabilidade normal da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL. e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância do desvio da distribuição normal.

A premissa de homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi confirmada. A variabilidade dos resíduos ao longo das concentrações estudadas foi constante, uma vez que a estatística t de Levene, estimada em 0,676, não foi significativa ($p > 0,05$) (Figura II.3).

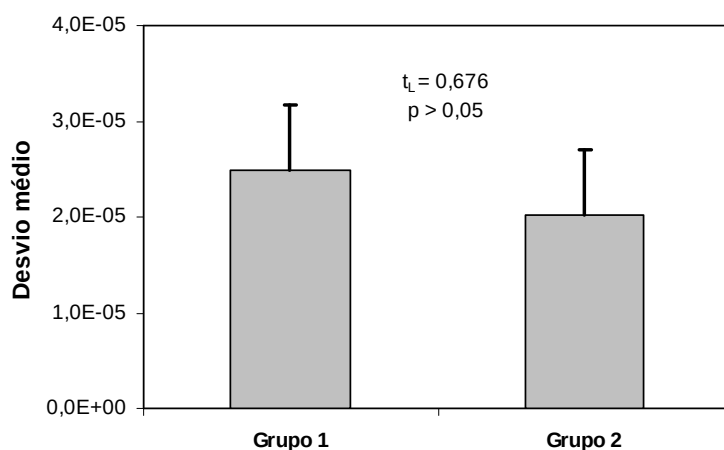


Figura II.3 - Representação da homogeneidade das variâncias da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, pelo teste de Levene modificado. t_L = estatística t de Levene, p = significância, Grupo 1 = 0,010; 0,015 e 0,020 mg/mL, Grupo 2 = 0,025; 0,030 e 0,030 mg/mL.

Houve independência dos resíduos da regressão. A estatística de Durbin-Watson calculada foi de 1,592 ($p > 0,10$), sugerindo que não houve autocorrelação (Figura II.4).

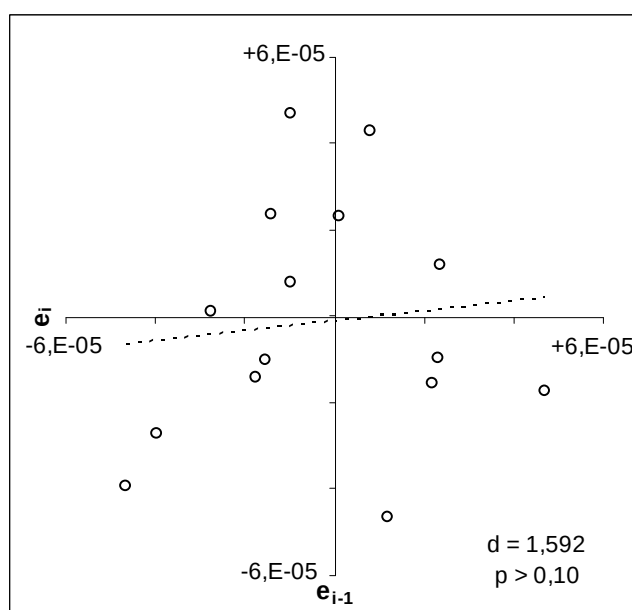


Figura II.4 - Gráfico de Durbin-Watson da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL. e_i = resíduo da regressão, d = estatística de Durbin-Watson, p = significância.

A regressão apresentou-se altamente significativa ($p < 0,001$), enquanto que o desvio de linearidade não foi significativo ($p > 0,05$) (Tabela II.1), indicando linearidade na faixa estudada de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL.

Tabela II.1 - Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio da linearidade, para curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1mol/L, pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL.

Estatística	Curva Usual
Regressão	
F	$1,146 \times 10^{+3}$
$F_{critico}$	4,600
p	$p < 0,001$
Desvio da linearidade	
F	1,711
$F_{critico}$	3,478
p	$p > 0,05$

F = razão entre variâncias, $F_{critico}$ = valor crítico tabelado, p = significância.

A curva de calibração, com respectiva equação e coeficiente de determinação, está ilustrada na Figura II.5.

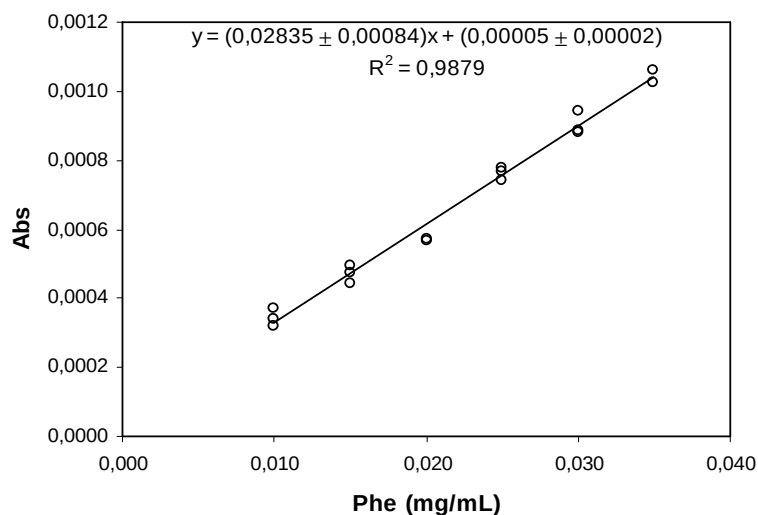


Figura II.5 - Curva de calibração da curva de Phe em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com respectiva equação e coeficiente de determinação. Abs = leitura de absorvância, y = resposta, x = concentração de Phe em mg/mL, R^2 = coeficiente de determinação.

3.2 EFEITOS DE MATRIZ

As curvas de calibração usual e em matriz, com respectivas equações e coeficientes de determinação, obtidas nos estudos de efeitos de matriz estão apresentadas na Figura II.6.

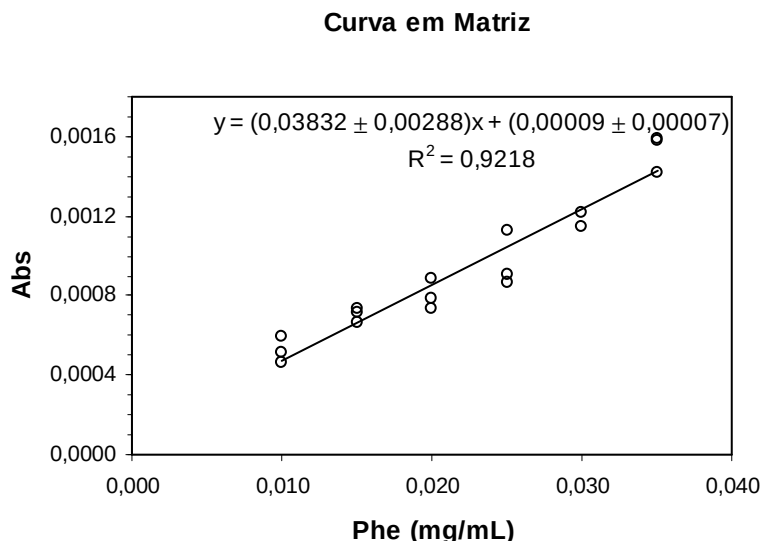


Figura II.6 - Curvas de calibração de Phe usual e em matriz, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com respectivas equações e coeficientes de determinação.

Abs = leitura de absorvância, y = resposta, x = concentração de Phe em mg/mL, R^2 = coeficiente de determinação

Pelo teste de resíduos padronizados Jackknife foram detectados dois *outliers*, sendo um na curva usual e outro na curva de matriz, ambos no nível 0,035 mg/mL. Todas as premissas relativas ao MMQO foram confirmadas para as curvas de calibração usual e em matriz. Distribuição normal dos resíduos da regressão foi observada pelos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner ($p > 0,10$). Homoscedasticidade foi obtida com estatísticas t de Levene não significativas ($p > 0,05$). Independência dos resíduos da regressão foi indicada pelas estatísticas de Durbin-Watson ($p > 0,10$). Regressões significativas ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) foram diagnosticados pelos testes de F da análise de variância. Estes resultados (Tabela II.2)

permitiram a comparação das inclinações e interseções pelo teste de t para avaliação dos efeitos de matriz.

O teste de F indicou heterogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas usual e em matriz ($F = 5,882$, com $p = 0,001$) e o uso do teste de t com variâncias distintas para avaliação dos efeitos de matriz. Assim, não houve diferença significativa quando as interseções da curva usual e em matriz foram comparadas entre si ($p > 0,05$). Contudo, as inclinações diferiram significativamente ($p > 0,05$), indicando efeitos de matriz (Tabela II.3). Com base nestes resultados, foi possível inferir que curvas usuais de Phe não forneceram as mesmas respostas que amostras de farinha de trigo contendo Phe nas mesmas concentrações. Diferença significativa entre os interceptos era esperada, pois não havia disponibilidade de amostras de farinha de trigo isentas de Phe. Esta diferença corresponderia ao teor prévio do aminoácido presente nas amostras de farinha hidrolisadas utilizados para o preparo de cada ponto da curva de calibração em matriz. A ausência de diferença significativa entre os interceptos, provavelmente ocorreu devido a efeitos de compostos presentes na amostra com ação supressora sobre a Phe. Houve ainda a diferença significativa entre as inclinações, o que reiterou a indicação da presença de interferentes oriundos da matriz. Para que tais interferências fossem consideradas de maneira a não afetarem os resultados de Phe nas amostras de farinha, o método de adição foi adotado. Ou seja, para quantificação de Phe em amostras, sete alíquotas de 1,9 mL foram retiradas de cada solução de amostra hidrolisada, adicionadas de 0, 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 μL da solução estoque de Phe, completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico, com solução tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0.

Tabela II.2 - Avaliação da linearidade das curvas de calibração de Phe usual e em matriz, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, nos experimentos de efeitos de matriz

Estatística	Curva Usual	Curva em Matriz
<i>Número de observações</i>		
<i>n</i>	17	17
<i>Normalidade</i>		
<i>R</i>	0,9770	0,9922
<i>R_{crítico}</i>	0,9549	0,9549
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Homoscedasticidade</i>		
<i>t_L</i>	0,766	-1,681
<i>t_{crítico}</i>	2,131	2,131
<i>p</i>	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<i>Independência</i>		
<i>d</i>	1,775	1,616
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>		
<i>F</i>	$5,540 \times 10^{+2}$	$1,767 \times 10^{+2}$
<i>F_{crítico}</i>	4,543	4,543
<i>p</i>	$p < 0,001$	$p < 0,001$
<i>Desvio da linearidade</i>		
<i>F</i>	3,268	2,522
<i>F_{crítico}</i>	3,357	3,357
<i>p</i>	$p > 0,05$	$p > 0,05$

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *t_L* = estatística t de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias, estatísticas críticas= valores críticos tabelados.

Tabela II.3 - Comparações entre as interseções e inclinações das curvas usual e em matriz para Phe

Estatística	Comparação entre Curva Usual e Curva em Matriz
Interseção	
t_a	1,714
$t_{critico}$	2,093
p	$p > 0,05$
Inclinação	
t_b	3,237
$t_{critico}$	2,093
p	$p < 0,05$

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, $t_{critico}$ = valor crítico tabelado, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, p = significância.

3.3 SELETIVIDADE

Quando as curvas de calibração de L-Tyr e L-Trp foram lidas nas condições experimentais para determinação de Phe, não houve detecção. Além disto, evidenciou-se que os espectros de Phe não foram afetados pela presença dos outros aminoácidos aromáticos estudados. As respostas obtidas para as curvas de Phe associada à L-Tyr e ao L-Trp isoladamente, e para a preparada com uma mistura destes três aminoácidos, não diferiram daquelas observadas para Phe na ausência destes compostos (Figura II.7).

Tais resultados indicaram a seletividade do método, confirmando a capacidade de determinar o analito em estudo na presença de outros compostos de comportamento similar.

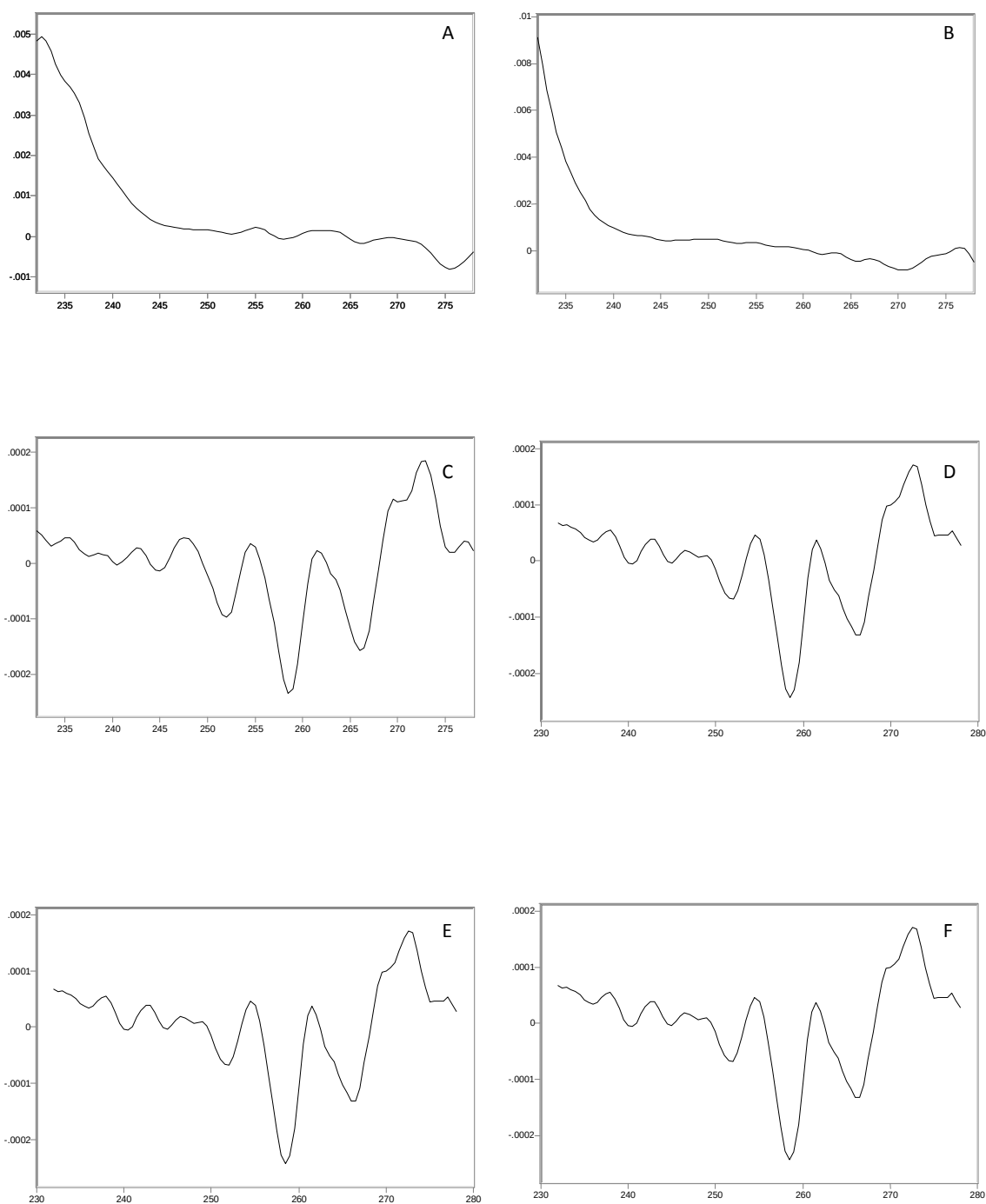


Figura II.7 – Espectros de derivada segunda obtidos para as soluções de 0,035 mg/mL utilizadas no estudo de seletividade. Sendo: A = solução de L-Tyr, B = solução de L-Trp, C = solução combinada de Phe e L-Tyr, D = solução combinada de Phe e L-Trp, E = solução *pool* de Phe, L-Tyr e L-Trp, e F = solução de Phe.

3.4 EXATIDÃO, PRECISÃO E LIMITES

O teste de Grubbs não indicou presença de *outliers* ($p > 0,05$) entre os resultados de recuperação obtidos para as doze replicatas de amostra analisadas no nível de concentração estudado. Os valores estimados para G_1 foram 0,945 e 1,848, para a menor e maior recuperação, respectivamente, com valor crítico de 2,285. O valor estimado para G_2 foi de 2,79, com valor tabelado de 3,91. Para G_3 os valores estimados para as duas menores e para as duas maiores recuperações, respectivamente de 0,1933 e 0,5910, também foram inferiores ao valor tabelado de 0,7004.

Os valores individuais de recuperação variaram de 81,34 % a 117,83 %. O perfil destes resultados de recuperação individuais nos quatro diferentes ensaios pode ser observado na Figura II.8.

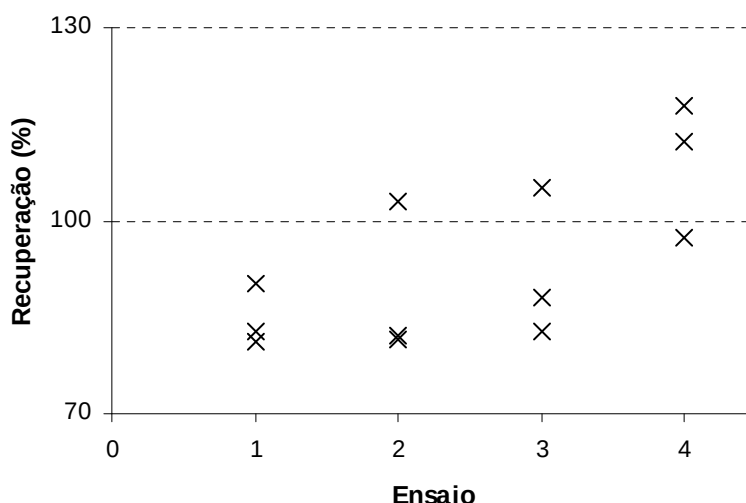


Figura II.8 – Porcentagens de recuperação individuais obtidas para as doze replicatas de amostra (contendo 354 mg/100g de Phe em farinha de trigo), analisadas em quatro ensaios, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial.

A média de recuperação alcançada para as doze replicatas de amostra contendo 354 mg/100g de Phe em farinha de trigo foi de 93,69 %, atendendo aos critérios estabelecidos de 80 % a 110 % (EC, 2002). Estes resultados indicaram que a recuperação do método é adequada e que o mesmo não é inexato no nível estudado.

Os resíduos, obtidos pela diferença entre a recuperação média e os valores individuais de recuperação obtidos em cada dia, apresentaram distribuição normal ($p > 0,10$) e homoscedasticidade ($p > 0,05$), permitindo a estimativa de DPR_r e DPR_R por análise de variância (Tabela II.4).

Tabela II.4 – Verificação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos para análise de variância.

Estatística	Premissa
Normalidade	
R	0,9742
$R_{critico}$	0,9422
p	$p > 0,10$
Homoscedasticidade	
F_L	0,183
$F_{critico}$	4,066
p	$p > 0,05$

R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância, F_L = estatística F de Levene, estatísticas críticas= valores críticos tabelados.

Os valores de DPR_r e DPR_R , estimados por análise de variância, foram de 10,95 % e 14,52 %, respectivamente, sinalizando a precisão do método.

O limite de detecção teórico foi de 63mg/100g, enquanto que o de quantificação foi de 175mg/100g. Estes limites foram, provavelmente, subestimados, uma vez que os experimentos foram conduzidos com branco de reagentes. De qualquer forma, a faixa de validação do método encontra-se acima destes valores, ou seja, de 251mg/100g a 877mg/100g de Phe em farinha de trigo.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que validaram a quantificação da Phe presente na farinha de trigo, ou em outros alimentos, empregando-se a EDS ou outra técnica de análise quantitativa.

Dessa forma, a adequação deste método para a quantificação do teor de Phe presente nos hidrolisados protéicos de farinha de trigo pode ser empregada, desde que seja realizada a diluição destes hidrolisados, a fim de se trabalhar dentro da faixa linear validada.

4 CONCLUSÃO

Linearidade foi determinada, com efeitos de matriz significativos, em uma faixa de concentração compatível com os níveis usualmente reportados para Phe em farinha de trigo. Comprovou-se seletividade, recuperação e precisão do método, com limites de detecção e quantificação teóricos suficientes para determinação do analito. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram adequação para uso do método nas atividades de monitoramento de teores de Phe em farinha de trigo tipo I, com extensão para os hidrolisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARMITAGE, P.; BERRY, G. *Statistical methods in medical research*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1994. 620 p.
- BARBOSA, C.M.S; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BARRET, V.; LEWIS, T. *Outliers in statistical data*. 3 ed. New York: John Wiley, 1994. 604 p.
- BELSLEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 1980. 292 p.
- BRANDTS, J.F.; KAPLAN, L.J. Derivate spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem.*, v. 12, n. 10, p. 2011-2024, 1973.
- BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. *J. Am. Stat. Assoc.*, v. 69, p. 364-367, 1974.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. *LC GC*, p. 19-24, 2001.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivative analysis of UV/visible spectra. *Am. Labor.*, v. 12, p. 101-112, 1980.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.* v. 3, p. 1-19, 2007.

- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 3, p. 229-232, 2002.
- DRAPER, N.; SMITH, H. *Applied regression analysis*. New York: Wiley. 1998. 706 p.
- DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*, v. 38, p. 159-178, 1951.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.
- GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chromatog. A*, v.347, p.219-235, 1985.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSK Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65-69, 1986.
- GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technom.*, v. 11, p. 1-21, 1969.
- HENDRIKSZ, C.J.; WALTER, J.H. Update on phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 14, p. 400-406, 2004.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 494, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.2, p.438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.671, n.1, p.33-37, 1981b.
- ISO (International Standards Organization). *ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Parts 1, 2, 3, 4 and 6*. Geneva: ISO, 1994.
- ISO (International Standards Organization). *ISO 5725-5. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 5*. Geneva: ISO, 1998. 56 p.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut*, v. 26, p. 907 - 913, 1985.
- KING, B. In-house method validation. A guide for chemical laboratories. *LGC Limited*. 2003.
- KUTTATHARMMAKUL, S.; MASSART, D.L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Comparison of alternative measurement methods. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 203-225, 1999.
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) *Contributions to probability and statistics*. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr. & Food Sci.*, v. 36 n. 2, p. 96-104, 2006.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; SILVESTRE, M. P. C. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J. Food Technol.*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPES, Jr., C. O. *Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. 81p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 938-942, 1991.
- MARCO, D.; WAITZBERG, D.L.. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: WAITZBERG, D.L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 449-457.
- MAROTO, A.; RIU, J.; BOQUÉ, R.; RIUS, F.X. Estimating uncertainties of *Acta*, v. 391, p. 173-185, 1999.
- MARTINS, A.M.; FISBERG, R.M.; SCHMIDT, B.J. *Fenilcetonúria: abordagem terapêutica*. NESTLÉ, São Paulo, n.54, 1993.
- MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA, K. Derivate absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal. Biochem.*, v.65, n.3, p.362-368, 1975.
- MEYER, P.C.; ZUND, R.E. *Statistical methods in analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pub.*, v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v.34, n.1, p.59-69, 2005.
- NUPAD – Núcleo de ações e pesquisas em apoio diagnóstico. Disponível em: < <http://www.nupad.medicina.ufmg.br/>>. Acesso em: 15 de outubro de 2008
- O'HAVER, T. C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin. Chem.* 25/9, p.1548-1553, 1979.
- PIECYK, M.; SRAMA, A.; BZDUCHA, A.; OBIEDZINSKI, M. Application of HPLC and GC/MS to quantification of phenylalanine in chosen kinds of food for particular nutritional uses. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, v. 6, n. 2, p. 5-18, 2007.
- RAGONE, R.; COLONNA, G.; BALESTRIERI, C.; SEVILLO, L.; IRACE, G. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy. *Biochem.*, 1984.
- RAMASWAMI, U.; SMITH, I. Phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 7, p. 251-255, 1997
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, p.753-761, 1988
- RYAN, T.A.; JOINER, B.L. *Normal probability plots and tests for normality*. The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15 p.
- SCHILLER, G.W. Bakery flour specifications. *Cereal Foods World*, v.29, n.10, p.647-651, 1984.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US

- 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O., LOPES, D.C.F, JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am.J. Food Technol.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- SILVA, M. C. *Hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro do leite: remoção de fenilalanina, grau de hidrólise e perfil peptídico*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2009. 112p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- SILVESTRE, M.P.C. ; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R. ; SILVA, M.C; LOPES Jr, C.O.; SILVA, V.D.M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Engineer.*, v. 5, n. 1, 2009.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SOUZA, S.V.C., JUNQUEIRA, R.G., GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) - In-house method validation. *Journal of Chromatography A*, v. 1077, p. 151-158, 2005.
- SOUZA, S.V.C.; LIMA, J.A.; TEODORO, J.C.; JUNQUEIRA, R.G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 4, p. 787-792, 2007.(a)
- SOUZA, S.V.C., PINTO, C.T.; JUNQUEIRA, R.G. In-house method validation: application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 241-247, 2007. (b)
- SOUZA, M.W.S.; LIMA, L.G.; SILVA, V.D.M.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de leite com teor reduzido de fenilalanina pela ação da protease do *Aspergillus sojae* e uso do carvão ativado. *E-xacta*, v. 2, n. 1, p. 23-33, 2009.
- STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. *Rev. Méd. Minas Gerais*, v. 9, p. 106 - 110, 1999.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p. 835-855, 2002
- USDA (United States Department of Agriculture). Human Nutrition Information Service. Agriculture Handbook. Composition of Foods: Cereal Grains and Pasta. Number 8-20, 1989. Modified From Drake, D.L., S.E. Gebhardt, R.H. Matthews. Updated: Friday, May 26, 2006. Disponível em: <<http://food.oregonstate.edu/g/comp/compa.html>>. Acesso em: 08 jun. 2008.

}CAPÍTULO III**EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA FARINHA DE TRIGO****RESUMO**

O presente trabalho teve como objetivo extrair enzimaticamente as proteínas da farinha de trigo utilizando-se uma protease alcalina – cepa do *Bacillus licheniformis*. Visando aumentar o rendimento de extração protéica (REP), os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo (2 e 5h), temperatura (40 °C e 50 °C), tratamento físico da amostra (sem tratamento, ultraturrax a 1800 x g por 5 min e ultrassom a 120V por 10 min), relação enzima:substrato (E:S) de 5:100 e 10:100 e concentração inicial de matéria prima (1:3, 1:5 e 1:10 p/v). Os teores de proteínas da farinha de trigo tipo I e dos resíduos foram determinados para se calcular o REP. Os resultados mostraram que a condição de extração protéica que levou ao maior REP e também, mais vantajosa economicamente, foi a que empregou a concentração inicial de matéria prima a 1:3 (p/v), com tratamento físico ultraturrax 1800 x g, relação E:S de 10:100, a 40 °C, durante 2 h, tendo atingido um REP de 89 %.

Palavras-chave: cereal, farinha de trigo, proteínas, extração, método enzimático.

1 INTRODUÇÃO

O trigo, juntamente com o arroz e o milho, é um dos mais importantes grãos de cereais no mundo, fornecendo nutrientes para seres humanos e animais e servindo como material básico à produção de amido, óleo e proteína, bebidas alcoólicas, adoçantes e, mais recentemente, como combustível (FAO, 1992). Este cereal é amplamente utilizado na alimentação humana sob a forma de farinha, facilitando o seu consumo e possibilitando a adequada utilização de suas propriedades tecnológicas e nutricionais (MIRANDA & EL-DASH., 2002; ORTOLAN, 2006). No Brasil, consomem-se cerca de 8,5 milhões de toneladas de trigo ao ano e destas, 25 % tornam-se farelo que, em parte, abastece a indústria de ração. Os 75 % restantes (cerca de 6,3 milhões de toneladas) são destinados a atender os mercados de massas, pães, bolos, doces e biscoitos (MIRANDA & EL-DASH., 2002; MIRANDA, 2006).

As proteínas presentes na farinha de trigo são divididas em dois grupos, um deles formado pelas albuminas (solúveis em água) e globulinas (solúveis em solução salina), representando 15 % das proteínas totais, chamadas de proteínas solúveis e, o outro, formado pela gliadina (solúveis em álcool) e glutenina (solúveis em álcalis) que compreendem os restantes 85 % deste nutriente (JULIANO, 1993; SGARBIERI, 1996; HAMADA, 1997; JU et al., 2001). As proteínas solúveis (albuminas e globulinas), também chamadas de não formadoras do glúten, são, principalmente, monoméricas, apresentando massa molecular inferior a 25.000 Da, e menor importância tecnológica (MACRITCHIE & LAFIANDRA., 1997; GIANIBELLI et al., 2002; GALERA, 2006). Já, as proteínas formadoras do glúten (gliadina e glutenina), são insolúveis em água, apresentam estrutura polimérica, formadas por dois grupos de subunidades, os de alto peso molecular (HMW) – 80.000 a 120.000 Da e os de baixo peso molecular (LMW) – 30.000 a 55.000 Da, ligadas entre si através de pontes dissulfeto, o que as torna capazes de formar uma rede viscoelástica, que permite a retenção de gases produzidos durante a fermentação microbiana da massa (LOOKHART et al., 1993; MACRITCHIE & LAFIANDRA., 1997; GIANIBELLI et al., 2002; VAN DER BORGHT et al., 2005).

O método usado para extrair as proteínas dos cereais, exerce efeitos importantes nas suas propriedades (AGBOOLA, 2005). O tratamento químico, utilizando-se soluções alcalinas, apresenta inúmeros inconvenientes, tais como, desnaturação protéica, formação de compostos tóxicos (lisinoalanina), escurecimento da amostra e extração de compostos não-protéicos (WANG et al., 1999). Da mesma forma, o emprego de

soluções salinas ocasiona a perda da qualidade do extrato obtido, devido à cristalização dos sais empregados (MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, 2000) e a necessidade de técnicas de diálise ou ultrafiltração para a retirada do sal (PRATA & SGARBIERI, 2005).

Uma alternativa a estes inconvenientes, consiste na utilização de enzimas para extrair as proteínas dos cereais, a partir de seus produtos como a farinha e o farelo. Na literatura, foram encontrados alguns trabalhos relatando a extração enzimática das proteínas do arroz, empregando-se a pancreatina e outras proteases alcalina, fúngica e bacteriana, obtendo-se um rendimento médio de 75 % de extração (EUBER et al., 1991) e, também, endoproteases e amilases, porém, apresentando rendimentos em torno de 58 % (TANG et al., 2002). Em outras pesquisas, a utilização do método de extração estava associada à separação do amido de arroz, empregando-se a associação de uma α -amilase (BAN 240 L) com uma protease (Promozyme 400 L), recuperando dessa forma, 75 % de proteínas (AGBOOLA, 2005).

Não foram encontrados na literatura trabalhos abordando a extração enzimática de proteínas do trigo e derivados. Por outro lado, em estudos realizados, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, onde foi desenvolvido o presente trabalho, aplicou-se o método enzimático para a extração das proteínas de outros alimentos, como o fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), o arroz em grãos (LOPES et al., 2008), o feijão (LOPES Jr., 2008) e uma farinha de arroz comercial (SILVESTRE et al., 2009), tendo sido encontrados rendimentos que variaram de 63 % a 93 %, dependendo das condições empregadas. O efeito do tratamento físico da amostra (ultraturrax, ultrassom e outros) foi, igualmente, avaliado neste mesmo laboratório (SILVESTRE et al., 2009), assim como por outros autores (WANG et al., 2001; TANG et al., 2002). Os resultados obtidos foram variados, dependendo da matéria-prima e dos parâmetros utilizados.

O presente trabalho envolveu a determinação da composição química e a otimização da extração protéica da farinha de trigo, empregando-se um método enzimático e testando-se diferentes condições de extração e tratamento da amostra.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A farinha de trigo tipo I foi adquirida no comércio de Belo Horizonte, MG. A protease Protemax® 580 L (EC 3.4.21.14, uma serino-endopeptidase de origem bacteriana – cepa do *Bacillus licheniformis*, atividade 580 KDU/g, estável em pH entre 7 e 10 com pH ótimo em 9,5, temperatura ótima de 60 °C e temperatura de inativação acima de 85 °C por 10min) foi adquirida da Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). Empregou-se o ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) e o ultrassom (Thornton, T14, Vinhedo, São Paulo, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação da composição química da farinha de trigo

A farinha de trigo tipo I foi cuidadosamente homogeneizada, por quarteamento e acondicionada em potes de vidro, identificados e hermeticamente fechados, mantidos sob refrigeração, até o momento de uso.

Todas as análises da composição química da matéria-prima foram realizadas em triplicata, segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP) a 105 °C até peso constante; as cinzas ou minerais, por incineração, em mufla a 550 °C; os lípidos, por extração com éter etílico, Soxhlet modificado (Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-kjeldahl, as fibras alimentares pelo método enzimático; os carboidratos, por diferença. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 5,70, para cereais em geral (NIELSEN, 1998).

2.2.2 Extração enzimática das proteínas da farinha de trigo

Empregou-se o método de extração enzimática das proteínas da farinha de trigo, descrito por WANG & WANG (2001), com algumas modificações introduzidas no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, relacionadas à concentração da matéria-prima, pH, tempo de centrifugação e relação E:S (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al, 2009).

A farinha de trigo foi suspensa em água destilada na proporção de 1:5 (p/v) e o benzoato de sódio foi adicionado em quantidade necessária para uma concentração final de 0,1 % (p/v). A suspensão foi agitada no ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 1800 x *g* por 5 min, e a enzima, uma protease alcalina de *Bacillus licheniformis*, adicionada na relação E:S de 10:100 em sua condição ótima de pH (9,5) e na temperatura de 55 °C. O ajuste do pH foi realizado com solução de NaOH a 3 mol/L e a temperatura controlada em banho de vaselina líquida, sobre agitador magnético.

A extração enzimática foi realizada por 5h com agitação constante. Após este tempo, a suspensão foi resfriada até 25 °C e centrifugada por 15 min a 1700 x *g*. O EPFT foi recolhido, separadamente, em um recipiente e o resíduo foi, então, lavado duas vezes com água destilada, repetindo-se a etapa de centrifugação entre as lavagens e recolhendo sempre o EPFT no mesmo recipiente. O resíduo foi pesado e submetido à determinação do teor de proteína. Partindo-se deste procedimento padrão, os seguintes parâmetros foram avaliados: a temperatura (40 °C e 55 °C), o tempo de hidrólise (2h e 5h), o tratamento físico (sem tratamento físico, ultraturrax e ultrassom), a concentração da matéria-prima (1:3; 1:5 e 1:10 p/v) e a relação enzima:substrato (E:S: 10:100 e 5:100).

2.2.2.1 Avaliação do efeito da temperatura

Para avaliar esse parâmetro, dois valores foram testados: 40 °C e 55 °C, usando a protease alcalina, por 5h, na relação E:S 10:100. Os valores de temperatura empregados foram baseados em estudo realizado por EUBER et al. (1991), que trabalharam na faixa de 35 °C a 60 °C, para verificar o efeito deste parâmetro na solubilização de proteínas do arroz empregando-se a pancreatina. Após este tempo, a suspensão foi resfriada até 25 °C e centrifugada por 15 min a 1700 x *g*. O EPFT foi recolhido, separadamente, em um recipiente e o resíduo foi, então, lavado duas vezes

com água destilada, repetindo-se a etapa de centrifugação entre as lavagens e recolhendo sempre o EPFT no mesmo recipiente. O resíduo foi pesado e submetido às determinações dos teores de proteína e de umidade.

2.2.2.2 Avaliação do efeito do tempo de extração

Utilizando a condição em que se obteve o maior REP no item 2.2.2.1, dois tempos de extração enzimática foram testados: 2h e 5h, valores que estão dentro da faixa usada anteriormente no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009).

2.2.2.3 Avaliação do efeito do tratamento físico

Os tratamentos físicos avaliados foram baseados em estudos realizados por TANG et al. (2002) e SILVESTRE et al. (2009): ultraturrax a 1800 x g, 5 min e ultrassom a 120 W, durante 10 min. Uma amostra controle, sem tratamento físico, foi também preparada. Os outros parâmetros utilizados nessa etapa foram aqueles que proporcionaram um maior REP obtido nos itens anteriormente descritos (2.2.2.1 e 2.2.2.2).

2.2.2.4 Avaliação do efeito da relação enzima:substrato e da concentração da matéria-prima

Neste caso, três valores foram testados para a relação matéria-prima:água (MP:H₂O), de acordo com aqueles utilizados em outros estudos por diversos autores. Os valores empregados foram de 1:3 p/v (WANG & WANG, 2001), 1:5 p/v (CAPOBIANGO et al., 2007) e 1:10 p/v (SHAW & SHEU, 1992). O efeito da relação E:S foi investigado no valor utilizado por CAPOBIANGO et al. (2007) igual a 10:100 e em um inferior, E:S de 5:100, para todas as três concentrações da matéria-prima, conforme descrito por SILVESTRE et al. (2009).

2.2.3 Determinação do rendimento da extração protéica

Para cada parâmetro estudado, o rendimento da extração protéica (REP) foi calculado, conforme a Equação 1:

$$REP = \frac{[(A \times B) - (C \times D)]}{(A \times B)} \times 100 \quad (1)$$

A = Teor de proteína na farinha de trigo tipo I (g/100g ou %);

B = Quantidade de farinha de trigo tipo I utilizada na extração (g);

C = Peso de resíduo obtido na extração (g);

D = Teor de proteína no resíduo (g/100g ou %).

2.2.4 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em três repetições, no mesmo dia, e as análises foram realizadas em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan a 5 % de probabilidade, para comparar o REP em relação ao efeito dos parâmetros empregados na extração enzimática das proteínas de farinha de trigo tipo I (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA PRIMA

Encontram-se na Tabela III.1 os resultados obtidos para os teores dos componentes da farinha de trigo. De uma maneira geral, os valores encontrados no presente trabalho estão próximos dos citados na literatura, e assemelham-se aos do rótulo da matéria-prima. Apesar do teor de umidade da amostra estudada estar um pouco mais elevado, em relação às outras fontes, o valor máximo permitido pela legislação (BRASIL, 2005) é de 15 % estando, portanto, abaixo deste limite. Este fato é importante, uma vez que a umidade é um dos principais fatores de aceleração das reações químicas e enzimáticas.

Tabela III.1 - Composição química da farinha de trigo tipo I

Componentes	Valores encontrados ¹	TACO ²	FAO ³	Rótulo ⁴
Umidade	13,68	13	12	-
Proteína	8,57	9,8	8,6	10
Lípides	1,29	1,4	1,0	1
Cinzas totais	0,75	0,8	0,4	-
Fibra Alimentar Total	2,4	2,3	2,1	2,0
Carboidratos	86,96	75	73,9	76

¹ Valores obtidos no presente trabalho, em matéria úmida ¹; TACO (2007) ²; FAO (2002) ³; Produto adquirido no comércio em Belo Horizonte ⁴.

O teor protéico da farinha de trigo analisada neste trabalho (8,57 %), apresentou-se inferior ao encontrado na literatura (9,8 %) (TACO, 2007), sendo este um importante parâmetro indicador de qualidade de uso final da farinha (SCHILLER, 1984). De fato, a quantidade de proteínas está relacionada à capacidade de formação da massa, ou seja, ao se misturar farinha de trigo e água, tem-se como resultado a formação de uma massa constituída da rede protéica do glúten ligado aos grânulos de amido, que retêm o gás carbônico produzido durante o processo fermentativo, e faz com que o pão retenha o gás formado e aumente de volume (BENASSI, 1997).

O teor de cinzas encontrado (0,75 %), apresentou-se dentro da especificação de farinha de trigo tipo I, cujo limite máximo permitido é de 0,8 % (BRASIL, 2005), mas, por outro lado, este valor foi cerca de duas vezes superior ao relatado na tabela da FAO (2002) (0,4 %). Entretanto, nesta referida tabela não havia menção sobre a classificação da farinha descrita.

Variações na composição química de um alimento podem estar relacionadas às condições de cultivo, clima, solo e adubação, além das diferenças relacionadas às

metodologias. No Brasil, instituições de pesquisa sobre o trigo têm desenvolvido trabalhos para verificar a multiplicidade de fatores climáticos que afetam a produção, a produtividade e a composição deste cereal. Sabe-se que a elevada umidade relativa do ar e o excesso hídrico do solo, associados à baixa temperatura durante o desenvolvimento de trigo, propicia menor teor de proteínas nos grãos e, conseqüentemente, maiores taxas de carboidratos (GUARIENTTI et al., 2003).

Os demais componentes analisados encontraram-se de acordo com os valores descritos nas tabelas especificadas (FAO, 2002; TACO, 2007), bem como com os valores indicados no rótulo do produto.

3.2 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS

Na Tabela III.2, estão apresentados os resultados do rendimento da extração enzimática das proteínas da farinha de trigo encontrados no presente trabalho. Como se pode observar, os maiores valores de REP foram obtidos para os extratos 3, 4, 8 e 9, cujo valor médio atingiu 91 %, empregando-se condições diferentes de extração, especialmente no que refere ao tipo de tratamento físico da amostra e a concentração da matéria-prima.

Levando-se em conta que o extrato protéico será utilizado em uma etapa posterior, para a reconstituição de uma farinha de trigo destinada à alimentação de fenilcetonúricos, deve-se considerar, também, a adaptação do processo em larga escala. Dessa forma, a melhor condição de extração empregada foi a que produziu o EPFT 9, pois, apesar de ter apresentado REP inferior ao EPFT 8, no seu preparo empregou-se a maior relação MP: água (1:3), sendo que o uso de uma suspensão menos diluída, é economicamente mais vantajosa, pois reduz o tempo e a energia necessários para a secagem industrial destes extratos.

Não foram encontrados na literatura relatos referentes à extração enzimática das proteínas do trigo ou de seus derivados. Assim, sabendo-se que este método foi utilizado para a extração protéica de outros alimentos, os dados aqui obtidos foram comparados com estes trabalhos.

Tabela III.2 Rendimento da extração enzimática das proteínas da farinha de trigo.

Amostras	Parâmetros da extração	Rendimento de Extração (%)
EPFT 1	40 °C, 2h, UT, E:S 10:100, MP 1:5 p/v	85 ^c
EPFT 2	40 ° C, 5h, UT, E:S 10:100, MP 1:5 p/v	85 ^c
EPFT 3	40 °C, 2h, STF, E:S 10:100, MP 1:5 p/v	89 ^b
EPFT 4	40 °C, 2h, US, E:S 10:100, MP 1:5 p/v	92 ^{a,b}
EPFT 5	40 °C, 2h, UT, E:S 5:100, MP 1:10 p/v	85 ^c
EPFT 6	40 °C, 2h, UT, E:S 5:100, MP 1:5 p/v	85 ^c
EPFT 7	40 °C, 2h, UT, E:S 5:100, MP 1:3 p/v	80 ^d
EPFT 8	40 °C, 2h, UT, E:S 10:100, MP 1:10 p/v	95 ^a
EPFT 9	40 °C, 2h, UT, E:S 10:100, MP 1:3 p/v	89 ^b
EPFT 10	55 °C, 5h, UT, E:S 10:100, MP 1:5 p/v	77 ^e

EPFT = Extrato protéico da farinha de trigo. STF = sem tratamento físico, UT = Ultraturrax 5 min, US = Ultrassom 10 min, MP = relação matéria-prima:água. Os resultados representam médias de triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância.

Assim, em estudos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, CAPOBIANGO et al. (2007), empregaram, como no presente trabalho, a protease alcalina de *B. Licheniformis* para extrair as proteínas do fubá de milho, obtendo um REP de 87 %. Para a extração das proteínas de uma farinha de arroz comercial, SILVESTRE et al. (2009) testaram duas enzimas, sendo a mesma do presente estudo (protease alcalina de *B. Licheniformis*) e outra neutra (de *Bacillus*

subtilis), e o maior REP de 63 % foi obtido com a primeira enzima. Já, LOPES Jr. (2008) testaram as duas metodologias citadas acima (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009), na extração das proteínas do feijão, e alcançaram valores de REP de 88 % e 93 %, respectivamente. Observa-se, assim, que a média dos resultados de REP encontrados no presente trabalho (87 %), assemelha-se aos obtidos por CAPOBIANGO et al. (2007) e LOPES Jr. (2008), sendo, ainda, superiores ao valor de REP apresentado para a farinha de arroz.

Acrescenta-se que os resultados de REP citados no presente estudo, foram superiores ao valor de 58 % de rendimento apresentado por TANG et al. (2002), ao extraírem as proteínas do farelo de arroz, empregando-se a associação de uma amilase com uma endoprotease e o uso do ultrassom. Por outro lado, EUBER et al. (1991), ao usarem a pancreatina como enzima no processo de extração de proteínas do arroz, obtiveram 75 % de rendimento, valor semelhante ao obtido para o extrato 10, no presente trabalho (77 %). Em um estudo abordando a extração das proteínas da farinha de soja, através da combinação de proteases (Alcalase e Flavourzima), FISCHER et al. (2001), obtiveram um rendimento de 89-94 %, valor este próximo à média de REP entre os extratos 3, 4, 8 e 9 (91 %), considerados os 4 resultados mais elevados alcançados no presente trabalho.

A análise do conjunto destes resultados demonstra que a extração incompleta das proteínas, e a consequente redução de REP, variam de acordo com o tipo do alimento, o que deve estar, provavelmente, associado à interferência da matriz, causada pelas interações com outros constituintes da amostra, tais como lípidos e carboidratos (FISCHER et al., 2001).

3.3 EFEITO DOS PARÂMETROS NA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS

Todos os testes foram realizados empregando-se a protease alcalina, atuando no pH 9,5 como descrito por CAPOBIANGO et al. (2007) e SILVESTRE et al. (2009). Inicialmente, utilizou-se uma suspensão de farinha de trigo na concentração da matéria-prima 1:5 p/v, agitada com ultraturrax e E:S 10:100, de acordo com as melhores condições enzimáticas obtidas por CAPOBIANGO et al (2007), e a partir deste estudo,

variou-se a temperatura (40 °C e 55°C), tempo de extração (2h e 5h), ausência ou presença de tratamento físico (ultraturrax, ultrassom), relação E:S (5:100 e 10:100) e concentração da matéria-prima (1:3, 1:5 e 1:10 p/v), sendo estes três últimos parâmetros de acordo com SILVESTRE et al. (2009).

3.3.1 Temperatura de reação

Para verificar o efeito da temperatura no rendimento da extração das proteínas de farinha de trigo, deve-se comparar o extrato 2 com o 10 (40 °C e 55 °C, respectivamente). Pode-se observar na Tabela III. 2 que a temperatura afetou o rendimento da extração, uma vez que houve diferença significativa entre os resultados.

Além disso, o efeito desejável associando o emprego de uma menor temperatura com um maior rendimento, relacionado à redução de custos do processo, foi observado, pois o REP a 40 °C (85 %) foi superior ao obtido a 55 °C (77 %). Este resultado poderia ser explicado pelo fato de que este valor mais elevado de temperatura está dentro da faixa de gelatinização do amido do trigo (55 °C – 65 °C), na qual parte das proteínas ligadas às moléculas de amido poderia estar inacessível à ação da enzima o que reduziria a eficiência da extração enzimática (SGARBIERI, 1996). Além disso, a dificuldade de se remover Phe da farinha de trigo poderia estar associada, pelo menos em parte, à complexidade estrutural das gluteninas. Assim, segundo MACRITCHIE e LAFIANDRA (1997), a ação do calor é capaz de transformar subunidades poliméricas de gluteninas do trigo em grandes polímeros. Nesta forma, o acesso da enzima ficaria prejudicado, o que levaria a uma menor exposição ou liberação de Phe e, conseqüentemente, a uma remoção inferior deste aminoácido.

Em trabalhos anteriores, realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, empregando a mesma protease alcalina de origem microbiana do presente trabalho, CAPOBIANGO et al. (2007) utilizando fubá de milho e SILVESTRE et al. (2009) a farinha de arroz comercial, também obtiveram valores superiores de REP com o emprego de uma menor temperatura, sendo de 84 % a 55 °C, de 81 % a 60 °C, de 54 % a 50 °C e de 51 % a 60 °C, respectivamente. De forma semelhante, LOPES Jr. (2008) empregando uma protease alcalina de *Bacillus licheniformis* na extração das proteínas do feijão, alcançou um REP de 93 %, quando este processo foi realizado à temperatura de 50 °C, sendo que a utilização de uma maior temperatura (55 °C) levou à redução do rendimento para 88 %.

EUBER et al. (1991), estudando o efeito da temperatura no REP, utilizaram uma pancreatina para solubilizar as proteínas do resíduo de arroz, obtido após a extração do amido pela ação de alfa-amilase. Neste estudo, contrariamente aos resultados aqui obtidos, quanto maior a temperatura utilizada, maior foi o REP, ou seja, a 35 °C foi de 72 % e a 45 °C foi de 75 %. Por outro lado, ao se comparar os resultados obtidos a 50 °C (76 %) com 60 °C (71 %), o efeito desejado, tal como descrito acima, foi também observado, tendo sido obtido um maior REP para um menor valor de temperatura.

3.3.2 Tempo de reação

Para avaliar o efeito do tempo no rendimento de extração das proteínas, foram comparados entre si os extratos 1 (2h) e o 2 (5h). Observa-se na Tabela III.2 que não houve diferenças significativas entre estes dois tratamentos empregados, sendo o REP de 85 % e 83 %, para 2h e 5h de reação, respectivamente. Este resultado não está de acordo com o esperado teoricamente, uma vez que o emprego de um maior tempo de ação da enzima não foi suficiente para elevar o rendimento de extração. Provavelmente, o tempo de 5h não promoveu uma hidrólise mais acentuada da molécula protéica com a formação de peptídeos de cadeias mais curtas, que são mais solúveis (FISCHER et al., 2001). Além disso, é possível que a fração protéica não extraída, após 2h de reação, estivesse constituída de proteínas que não são hidrolisadas pela protease aqui utilizada, seja pela ausência de um sítio de atuação para a enzima ou por impedimento estérico, devido à presença do resíduo de carboidrato na molécula. Portanto, mesmo aumentando-se o tempo de reação, o rendimento de extração não se eleva. Além disso, a vantagem da utilização de 2h, em vez de 5h, para a extração protéica, está associada a um menor risco de contaminação microbiana, e, ainda, contribui para redução de custos, especialmente, no caso da aplicação do processo em larga escala.

Em trabalhos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, CAPOBIANGO et al. (2007), empregando a mesma protease do presente trabalho (*Bacillus licheniformis*), avaliaram o efeito do tempo de reação sobre a extração das proteínas do fubá de milho. Foi observada uma elevação do REP ao aumentar o tempo de reação de 1h para 5h (72 % e 84 % respectivamente), não sendo percebida diferença significativa ao passar de 5h para 15h e de 15h para 24h, mostrando que também não houve aumento linear do REP com o aumento dos tempos de reação estudados. O mesmo foi relatado por LOPES Jr. (2008), empregando esta mesma protease, para a extração das proteínas do feijão. O maior rendimento foi obtido após 3h e 5h de reação

(93 % e 92 %, respectivamente), para os quais não houve diferença significativa, seguidos pelos obtidos após 6h (89 %) e 2h (87 %), dados estatisticamente semelhantes.

3.3.3 Tratamento físico da amostra

Para avaliar este parâmetro, foram comparados os extratos 1 (ultraturrax), 4 (ultrassom) e 3 (sem tratamento físico). Observa-se na Tabela III. 2, que não houve diferenças significativas entre os valores de REP dos extratos obtidos com ultrassom (92 %) e sem tratamento físico (89 %). Por outro lado, o extrato obtido com o emprego de ultraturrax apresentou valor inferior de REP (85 %).

Este resultado está de acordo com o observado por LOPES Jr. (2008), trabalho realizado, anteriormente no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG. A extração proteica do feijão sem a aplicação do ultraturrax levou à obtenção de 93 % de REP, ao passo que a extração realizada após o tratamento físico da amostra possibilitou um rendimento de 88 %. Por outro lado, neste mesmo grupo de pesquisa, SILVESTRE et al. (2009) observaram que o tipo de tratamento empregado no processo de extração enzimática das proteínas da farinha de arroz, pela ação da mesma protease alcalina de origem microbiana utilizada neste estudo, não influenciou o REP, ao se comparar diferentes tempos de ação do ultraturrax cujo valor médio foi de 58 % com os extratos para os quais empregou-se o ultrassom com tempos diferentes de ação, tendo obtido o valor médio de 55 %.

TANG et al. (2002) também investigaram o efeito do tipo de tratamento físico sobre o rendimento de extração protéica do farelo desengordurado de arroz, empregando-se uma mistura de proteases e amilases. Neste caso, as diferenças observadas foram mais acentuadas do que as do presente estudo, uma vez que o REP para o ultrassom foi de 26 %, enquanto que para o liquidificador de alta velocidade foi de 53 %.

3.3.4 Relação enzima:substrato e concentração da matéria-prima

Pode-se avaliar o efeito da relação E:S comparando-se os extratos com valores de E:S de 5:100 com os de 10:100 (7 com 9; 6 com 1; 5 com 8). Verifica-se na Tabela III.2 que, para as concentrações de matéria-prima de 1:3 p/v e 1:10 p/v, o emprego de

maior relação E:S foi mais vantajoso, pois levou ao maior REP, tendo os valores variado de 80 % (EPFT 7) para 89 % (EPFT 9), e 85 % (EPFT 5) para 95 % (EPFT 8). Por outro lado, a relação E:S não afetou o REP dos extratos preparados na concentração de matéria-prima de 1:5 p/v, pois não houve diferenças significativas entre os valores obtidos para E:S de 5:100 e de 10:100 (85 %).

Em trabalho anterior com farinha de arroz, realizado no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, foi obtido por SILVESTRE et al. (2009), ao contrário do presente trabalho, maior valor de REP ao se usar E:S de 5:100 quando comparado com 10:100, para todas as concentrações de matéria-prima utilizadas (1:3, 1:5 e 1:10 p/v). Assim, os valores variaram de 44 % para 48 %, de 54 % para 60 % e de 58 % para 63 % para 5:100 e 10:100, respectivamente.

ANSHARULLAH & CHESTERMAN (1997) relataram o mesmo efeito benéfico obtido no presente estudo, relacionado ao emprego de maior E:S. ao utilizar apenas uma das carboidrases testadas na obtenção do concentrado protéico de arroz. Assim, os autores utilizaram concentrações que variaram de 22,5 a 112,5 (unidades FBG), extraíndo de 16 % a 48 % de nitrogênio.

EUBER et al. (1991) obtiveram resultados semelhantes ao do presente trabalho, ao estudar o efeito da concentração da enzima no REP. Quando os autores dobraram a concentração de pancreatina (de 1 % para 2 %), sobre proteínas de arroz, houve um aumento de 71 % para 76 % no REP.

Para avaliar o efeito da concentração de matéria-prima sobre o REP, devem ser comparados, entre si, os extratos preparados com E:S de 5:100 (7, 6 e 5) e de 10:100 (9, 1 e 8). No primeiro caso, observa-se na Tabela III.2 que, ao se utilizar uma menor relação MP : água (maior diluição da amostra), obteve-se um maior REP, comparando-se 1:3 (80 % - EPFT 7) e 1:5 (85 % - EPFT 6). Por outro lado, o mesmo não ocorreu quando se diluiu, ainda mais a amostra, ao se comparar 1:5 com 1:10 (85 % e 85 %, respectivamente), pois não foi observada diferença significativa entre os valores obtidos. Para as amostras preparadas com E:S de 10:100, observou-se que, quanto maior a diluição da amostra mais elevado foi o rendimento de extração, pois, como mostrado na Tabela III. 2, os valores obtidos para o REP foram de 89 %, 85 % e 95 %, para as relações MP:água de 1:3, 1:5 e 1:10, respectivamente. Observa-se, ainda, na Tabela III. 2 que os maiores valores de REP foram obtidos com E:S de 10:100, tanto para MP : água de 1:5 quanto de 1:10 (82 % e 95 %, respectivamente).

SILVESTRE et al. (2009) realizando trabalho no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, com farinha comercial de

arroz, relataram que quanto maior a diluição da amostra mais elevado foi o rendimento de extração, para os dois valores de E:S empregados, ou seja, de 5:100 e 10:100, ao contrário do observado no presente trabalho. Por outro lado, o maior valor de REP foi obtido com a mesma E:S deste trabalho (10:100), porém com a amostra mais diluída (1:10). Em relação à extração proteica do feijão, LOPES Jr. (2008) empregou a protease de *Bacillus licheniformis* na relação E:S de 10:100 e obteve maior REP (93 %) trabalhando com uma amostra mais diluída (1:10, em comparação com 1:5).

O conjunto destes resultados poderia ser, pelo menos em parte, explicado pela maior mobilidade da enzima em um meio mais diluído, o que facilitaria a sua ação. Ressalta-se, ainda, que não foram encontrados na literatura estudos abordando o efeito deste parâmetro sobre o REP em produtos à base de trigo.

4 CONCLUSÃO

O estudo do efeito de diversos parâmetros utilizados na extração enzimática com uma protease alcalina mostrou que o emprego do tratamento físico da amostra, a ação da temperatura, do tempo de extração, da concentração da amostra e da relação E:S influenciaram de forma variada no rendimento de extração proteica (REP). Considerando-se, não apenas o valor do REP, mas a adaptação do processo em larga escala, o melhor resultado (89 %) foi obtido ao se utilizar a concentração inicial de matéria prima a 1:3 (p/v), tratamento físico com ultraturrax a 1800 x g por 5 min, relação E:S de 10:100, a 40 °C, por 2h.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. J. Cereal Sci., v. 41, p. 283-290, 2005.
- ANSHARULLAH, J.A.H.; CHESTERMAN, C.F. Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. J. Sci. Food Agric., v.74, n.2, p.141-146, 1997.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. 16. ed. 3. rev. Arlington: AOAC International, 1995. 1141p.
- BENASSI, V. T.; WATANABE, E. Fundamentos da Tecnologia de Panificação. Rio de Janeiro: Embrapa-CTAA, v. 1, p. 55, 1997.

- BRASIL. Instrução Normativa n.8, de 3 de junho de 2005. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12214>. Acesso em 10 de jun. de 2008.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.* v. 3, p. 1-19, 2007.
- EUBER, J.R.; PUSKI, G.; HARTMAN, JR., G.H. Method for making soluble rice protein concentrate and the product produced there from. United States Patent n. 4,990,344,1991.
- FAO - Food and Agriculture Organization; Maize in Human Nutrition, FAO: Rome, 1992.
- FAO - Food and Agriculture Organization; Food Balance Sheet., FAO: 2002.
- FISCHER, M.; KOFOD, L.V.; SCHOLS, H.A.S.; PIERSMA, S.R.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 4463-4469, 2001.
- GALERA, J. S. *Substituição parcial da farinha de trigo por farinha de arroz (Oryza sativa L.) na produção de "sonho" – estudo modelo*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2006. 86p. (Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Área de Bromatologia).
- GIANIBELLI, M. C.; MASCI, S.; LARROQUE, O. R.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Biochemical Characterisation of a Novel Polymeric Protein Subunit from Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. of Cereal Science*, v. 35, p. 265–276, 2002.
- GUARIENTI, E. M.; CIACCO, C. F.; CUNHA, G. R.; DEL DUCA, L. J. A.; CAMARGO, C. M. O. Avaliação do efeito de variáveis meteorológicas na qualidade industrial e no rendimento de grãos de trigo pelo emprego de análise de componentes principais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 3, p. 500-510, 2003.
- HAMADA, J.S. Characterization of protein fractions of rice bran to devise effective methods of protein solubilization. *Cereal Chem.*, v.74, n.5, p.662-668, 1997.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivate spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 494, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.2, p.438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.671, n.1, p.33-37, 1981b.
- JULIANO, B.O. Rice in human nutrition. Rome: FAO, 1993. 168 p. Disponível em:<<http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/t0567e/T0567E00.htm>>. Acesso em: 25 Jun. 2008.
- JU, Z.Y.; HETTIARACHCHY, N.S.; RATH, N. Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *J. Food Sci.*, v.66, n.2, p.229-232, 2001.
- LOOKHART, G. L.; MARTIN, M. L.; MOSLETH, E.; UHLEN, A. K.; HOSENEY, R. C. Comparison of high-molecular-weight subunits of glutenin and baking performance of flours varying in bread-making quality. *Lebensm.-Wiss. U.- Technol.*, v. 26, p. 301-306, 1993.

- LOPES, D. C. F.; BIZZOTTO, C. S.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; LOPES Jr., C. O.; SILVESTRE, M. P. C. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates prepared with rice. *J. of Food Technol.*, v. 6, n. 2, p. 57-65, 2008.
- LOPES, Jr., C. O. *Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. 81p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- MACRITCHIE, F.; LAFIANDRA, D. Structure-function relationships of wheat proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed.) *Food proteins and their applications*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., p.293-322, 1997.
- MIRANDA, M. Z.; EL-DASH, A. Farinha integral de trigo germinado.3. Características nutricionais e estabilidade ao armazenamento. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 3, p. 216-223, 2002.
- MIRANDA, M. Z. Trigo: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74.htm3>. 2006. Acesso em 24 fev. 2009.
- MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 35, n. 1, p. 179-189, 2000.
- NIELSEN, S.S.; *Food analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630p.
- ORTOLAN, F. *Genótipos de trigo do Paraná- Safra 2004: caracterização e fatores relacionados à alteração de cor de farinha*. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. 2006. 140p. (Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos).
- PIMENTEL-GOMES, F.; *Curso de estatística experimental*, 14^a ed., Oxford: Piracicaba, 2000.
- PRATA, A.S.; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional in vitro das proteínas do soro de sangue bovino. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2005, v.25, n.2, p. 327-332, 2005.
- SCHILLER, G.W. Bakery flour specifications. *Cereal Foods World*, Saint Paul, v. 29, n. 10, p. 647-651, 1984.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação*. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SHAW, J.F.; SHEU, J.R. Production of high-maltose syrup and high-protein flour from rice by enzymatic method. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.56, n.7, p.1071-1073, 1992.
- SILVESTRE, M.P.C. ; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R. ; SILVA, M.C; LOPES Jr, C.O.; SILVA, V.D.M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Engineer.*, v. 5, n. 1, p.1-13, 2009.
- TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA – UNICAMP, versão II, 2 ed., Campinas: NEPA – UNICAMP, 2007. 113p.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, S.; SHELLHAMMER, T.H. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran.1. physical processing and enzyme treatments. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 7444-7448, 2002.
- VAN DER BORGHT, A.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *J. of Cereal Sci.*, v. 41, p. 221-237, 2005.
- WANG, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, n. 2, p. 411-416, 1999.
- WANG, L., WANG, Y.-J. Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation. *Cereal Chem.*, v.78, n.6, p.690-692, 2001.

CAPÍTULO IV

OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE FARINHA DE TRIGO COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA

RESUMO

Visando o preparo de farinha de trigo com baixo teor de fenilalanina (Phe), para ser introduzido na alimentação de fenilcetonúricos, extraiu-se, enzimaticamente as proteínas, empregando-se uma protease alcalina de *Bacillus licheniformis*. Em seguida, os extratos protéicos foram hidrolisados pela ação de enzimas comerciais (pancreatina e bromelina) e dos extratos enzimáticos bruto e purificado, obtidos da casca de abacaxi, avaliando-se o efeito de alguns parâmetros, tais como o tipo de enzima e de associação enzimática, a ordem de adição das enzimas, o tempo, a temperatura e o pH da reação, o tratamento físico do extrato protéico e a relação enzima:substrato (ES). A associação de três diferentes tipos de carvão ativado (CA), variando-se a relação proteína:CA, foi empregada como meio adsorvente para remover a Phe. A eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor de Phe livre na farinha de trigo e em seus hidrolisados, após tratamento com CA. O melhor resultado foi encontrado ao se empregar a associação sucessiva EB com E:S 10:100 por 1h 30min, seguido da pancreatina E:S 3:100 por 3h 30 min, ambos no pH 7,0, 50 °C, na ausência do tratamento físico do extrato, usando o CA na relação 1:88,5, tendo atingido 67,64 % de remoção e o teor final de Phe de 503,29 mg/100 g de hidrolisado.

Palavras-chave: farinha de trigo; proteínas, hidrólise enzimática, fenilalanina, remoção, carvão ativado.

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria ou PKU, como é mundialmente conhecida, é uma doença genética, causada por uma mutação no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase, ativa no fígado e responsável pela transformação de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). A elevação de Phe no sangue, acima de 10 mg/dL, permite sua passagem em quantidade excessiva para o Sistema Nervoso Central, no qual o acúmulo tem efeito tóxico, causando o retardo mental, que é a mais importante seqüela dessa doença. O adequado aporte protéico não é conseguido pela alimentação convencional, sem que quantidades excessivas deste aminoácido sejam ingeridas por estes pacientes. Com a introdução de uma dieta reduzida em Phe na alimentação da criança no primeiro mês de vida, a deficiência mental não se manifestará (MIRA & MARQUEZ, 2000; MALLOY-DINIZ et al., 2004, HAMMAN et al., 2005; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; WASSERSTEIN et al., 2006), justificando assim, a necessidade de se produzir e disponibilizar alimentos adequados a este controle (MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006). No Brasil, são utilizadas misturas de aminoácidos livres, importadas e de elevado custo. Estes fatores, associados à baixa disponibilidade de alimentos com teores reduzidos de Phe, torna a dieta de fenilcetonúricos monótona, pouco atrativa e de difícil adesão (MIRA & MARQUEZ, 2000).

A farinha de trigo ocupa um lugar relevante na alimentação do brasileiro, com grande utilização no preparo de alimentos, tanto em nível doméstico como industrial. Entretanto, sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos é proibida e depende do nível de Phe no soro destes pacientes, obedecendo-se os limites de Phe estipulados na legislação (BRASIL, 2002). Neste sentido, seria de grande interesse desenvolver uma farinha de trigo contendo teor reduzido de Phe, para que pudesse ser incorporada, sem restrições, na dieta de fenilcetonúricos, atendendo, assim, a grande demanda que vai desde a infância até a fase adulta, item estabelecido na legislação brasileira (BRASIL, 2002).

A primeira etapa no desenvolvimento desta farinha de trigo envolve a extração protéica, que é feita enzimaticamente (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009). Faz-se, depois, a hidrólise protéica, empregando-se diferentes enzimas proteolíticas e condições de reação (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009). No preparo de hidrolisados protéicos, utiliza-se normalmente proteases comerciais, que são produtos caros e normalmente importados. Por esta razão, no

presente trabalho, testou-se a associação de uma enzima comercial com um extrato enzimático preparado no laboratório (Capítulo I), visando a redução dos custos do processo. Finalmente, considerando-se que, as proteínas constituintes da farinha de trigo, ao serem submetidas à ação de uma protease, promovem a exposição da Phe, realiza-se sua posterior remoção por um meio adsorvente como carvão ativado, resinas ou filtração em gel (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

Diversos autores estudaram a preparação destes hidrolisados em escala laboratorial (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991), alguns em escala piloto (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDZIAK, 1993). Em estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, o carvão ativado foi, também, utilizado com eficiência na remoção de Phe de diversas proteínas hidrolisadas, tais como as provenientes de leite em pó desnatado (94 % a 99 %) (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006), de soro de leite em pó (75 % a 99 %) (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), de fubá de milho (69 % a 98 %) (CAPOBIANGO et al., 2007), de arroz em grãos (85 % a 100 %) (LOPES et al., 2008), de feijão (25 % a 88 %) (LOPES Jr., 2008), de farinha de arroz (26 % a 94 %) (SILVESTRE et al., 2009), de leite integral (66% a 76 %) (SOUZA et al., 2009) e de concentrado protéico de soro de leite - WPC (19,4 % a 81 %) (SILVA, 2009). Nestes trabalhos que abordaram a remoção de Phe de cereais (milho, arroz e farinha de arroz) e leguminosa (feijão), realizou-se a extração prévia da proteína por métodos químicos (LOPES et al., 2008) e enzimáticos (CAPOBIANGO et al., 2007; LOPES et al., 2008; LOPES Jr., 2008; SILVESTRE et al., 2009).

A quantificação do teor de Phe pode ser feita por diferentes métodos, destacando-se a espectrofotometria derivada segunda (EDS) (GRANT & BATTACHARYYA, 1985; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a, b; ROJAS et al., 1988). A EDS tem sido utilizada, em diversos estudos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, para a quantificação de Phe em hidrolisados protéicos obtidos pela ação de várias proteases e fontes protéicas tais como leite em pó (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006), soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), arroz em grãos (LOPES et al., 2008), feijão (LOPES Jr., 2008), farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009), leite integral (SOUZA et al., 2009) e WPC (SILVA, 2009).

O presente trabalho representa um passo relevante no processo de obtenção de farinha de trigo com teor reduzido de Phe, para ser introduzida na alimentação de fenilcetonúricos. Neste sentido, este estudo teve como objetivos hidrolisar as proteínas

extraídas da farinha de trigo, empregando-se condições de hidrólise variadas, dentre elas, o tipo de enzima, a associação e ordem de ação, a relação enzima:substrato (E:S), o pH, o tempo e a temperatura da reação, a relação proteína: carvão ativado, além do tratamento físico do extrato protéico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A farinha de trigo tipo I (13,68 % de umidade, 8,57 % de proteína, 1,29 % de lipídeos, 0,75 % de cinzas) foi adquirida no comércio varejista de Belo Horizonte. A protease de *Bacillus licheniformis* (Protemax[®] 580 L), uma serina-endopeptidase (EC 3.4.21.14), atividade 580 KDU/g, pH ótimo de 9,5 e temperatura ótima de 60 °C¹ foi adquirida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). A pancreatina (Corolase[®] PP) (complexo enzimático obtido do pâncreas – EC 3.4.21.4, constituído pelas serina-endopeptidases tripsina e quimotripsina, e pelas metalo-exopeptidases carboxipeptidases A e B, atividade 200.000 LVE/g, pH ótimo de 9 e temperatura ótima de 50 °C)², foi adquirida da AB Enzymes Brasil Comercial Ltda (Barueri, SP, Brasil)⁴. Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O carvão ativado (granulado n° 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil). O extrato enzimático bruto (EB) e o purificado (EP) foram obtidos da casca do abacaxi (*Ananás comosus*) variedade Pérola, conforme descrito no Capítulo I. Os demais reagentes foram de grau analítico.

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

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Extração das proteínas

Nesta etapa, foi utilizado o método de extração enzimática das proteínas da farinha de trigo desenvolvido no Capítulo III, que proporcionou as melhores condições de extração. Assim, a farinha de trigo foi suspensa em água destilada na proporção de 1:3 (p/v) e benzoato de sódio foi adicionado em uma quantidade tal para se obter uma concentração final de 0,1 % (p/v). Esta mistura foi levada ao ultraturrax por 5 min a 1800 x g. Após o ajuste do pH da suspensão para 9,5, utilizando uma solução de NaOH a 3 mol/L, esta foi levada a um banho de vaselina líquida a 40 °C, sobre agitador magnético, com agitação constante. Estabilizada a temperatura da suspensão, adicionou-se a enzima Protemax[®] 580 L (*Bacillus licheniformis*) na relação enzima:substrato (E:S) de 10:100, e a extração enzimática foi realizada por 2 h. A suspensão foi, então, resfriada até 25 °C e centrifugada por 15 min a 1700 x g. O extrato protéico de farinha de trigo (EPFT) e o resíduo foram recolhidos separadamente. O resíduo foi, então, lavado duas vezes com água destilada, repetindo-se a etapa de centrifugação entre as lavagens e recolhendo sempre o EPFT no mesmo recipiente. O EPFT e o resíduo foram acondicionados em recipientes hermeticamente fechados sob refrigeração, até o momento de análise.

2.2.2 Preparo dos hidrolisados protéicos

Foram preparados 30 hidrolisados enzimáticos, tendo sido variados os seguintes parâmetros: tipo de enzima (EP, EB, bromelina e pancreatina); associação e ordem de ação enzimática (simultânea e sucessiva); temperatura (35, 40, 50 e 70 °C), tempo de hidrólise (1h 30min, 2h 30min e 3h 30min), pH (6,0; 7,0; 8,0 e 9,0), relação enzima:substrato (E:S) (1:100, 2:100, 3:100 e 4:100 para a pancreatina e 10:100, 20:100, 30:100 e 40:100 para o EB), tratamento físico (sem tratamento físico, ultraturrax e ultrassom) e a relação proteína:CA (1:8; 1:16; 1:32 e 1:88,5), mantendo-se a associação de três diferentes tipos de carvão (fino, médio e grosso) de acordo com CAPOBIANGO et al. (2007) e SILVESTRE et al. (2009) (Tabela IV.1).

Inicialmente, 50 mL do EPFT foram colocados em um erlenmeyer e o pH foi ajustado com solução de NaOH a 3mol/L ou HCl a 0,1 mol/L, obtendo-se valores de 6 a 9. O EPFT foi levado em banho de vaselina líquida sobre agitador magnético, com agitação constante, em diferentes temperaturas e as enzimas foram adicionadas variando-se relação E:S e a ordem de adição (Tabela IV.1). Após diferentes tempos, a reação foi interrompida por aquecimento em banho-maria a 80 °C, por 20 min. Os hidrolisados foram armazenados a -18 °C até o momento do uso.

2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo pela utilização do CA, como meio adsorvente. Inicialmente, para os hidrolisados H1 a H27, testou-se a associação dos três diferentes tipos de carvão (fino, médio e grosso), na relação proteína: CA de 1:88,5, de acordo com testes realizados no mesmo laboratório do presente estudo (SILVESTRE et al., 2009). Para os demais hidrolisados (H28, H29 e H30), que foram preparados de acordo com as melhores condições hidrolíticas obtidas, testou-se a relação proteína:CA de 1:8; 1:16, 1:32.

Foi empregado o procedimento de passagem por coluna, descrito por SOARES et al. (2006). Dois gramas de CA de granulometrias diferentes (granulado n°119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler) foram hidratados com água destilada por 10 min sob agitação constante e, em seguida, colocado em seringa descartável de 10 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. Em sequência, os hidrolisados foram passados pela coluna e submetidos à pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), tendo sido recolhidos os eluatos.

Tabela IV.1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo e na remoção de fenilalanina

H	Hidrólise enzimática						Remoção de Phe	
	Protease	E:S	Associação	T (°C)	Tempo(h)	pH	TF	P:CA
H1	EP	10:100	ausente	30	1h 30min	7	A	1:88,5
H2	EB	10:100	ausente	70	1h 30min	6	A	1:88,5
H3	EB	10:100	ausente	70	1h 30min	8	A	1:88,5
H4	BRO	4:100	ausente	70	2	8	A	1:88,5
H5	BRO	4:100	ausente	70	5	8	A	1:88,5
H6	P	4:100	ausente	50	5h	7	A	1:88,5
H7	EB+P	10:100+4:100	simultânea	70	1h 30 min	8	A	1:88,5
H8	EB+P	10:100+4:100	simultânea	70	5h	8	A	1:88,5
H9	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	70/50	1h 30min/3h 30min	8/7	A	1:88,5
H10	P+EB	4:100+10:100	sucessiva	50/70	3h 30min/1h 30min	7/8	A	1:88,5
H11	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	35/35	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H12	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	40/40	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H13	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H14	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	70/70	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H15	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	50/50	2h 30min/2h 30min	7	A	1:88,5
H16	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	50/50	3h 30min/1h 30min	7	A	1:88,5
H17	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	6	A	1:88,5
H18	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	8	A	1:88,5
H19	EB+P	10:100+4:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	9	A	1:88,5
H20	EB+P	10:100+1:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H21	EB+P	10:100+2:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H22	EB+P	10:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H23	EB+P	20:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H24	EB+P	30:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H25	EB+P	40:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:88,5
H26	EB+P	10:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	UT	1:88,5
H27	EB+P	10:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	US	1:88,5
H28	EB+P	10:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:8
H29	EB+P	10:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:16
H30	EB+P	10:100+3:100	sucessiva	50/50	1h 30min/3h 30min	7	A	1:32

H = hidrolisados; Phe = fenilalanina; EP = extrato purificado da casca de abacaxi; EB = extrato bruto da casca de abacaxi; BRO = bromelina; P = pancreatina; E:S = relação enzima:substrato; T = temperatura; TF = tratamento físico; A = ausente; US = ultrassom; UT = ultraturrax; CA = carvão ativado; P:CA = relação proteína: carvão ativado.

2.2.4 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina

A avaliação da eficiência de remoção de Phe pelo CA foi realizada pela medida do teor de Phe livre, na farinha de trigo e seus hidrolisados, após tratamento com CA, empregando-se a Espectrofotometria Derivada Segunda, como descrito, anteriormente, em trabalho realizado no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG (LOPES et al., 2005). As amostras foram submetidas à hidrólise ácida (HCl a 5,7 mol/L, 110 °C, 24 h) e, após ajuste do pH para 7,0, com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, foram submetidas às leituras de absorvância entre 230 nm e 280 nm em espectrofotômetro CECIL (modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra), para cobrir a faixa de absorção da Phe que varia de 245 a 275 nm (ROJAS, 1988). Os espectros de derivada segunda geraram picos negativos de Phe e foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro. As áreas do pico negativo de maior amplitude, situado entre 255 nm e 260 nm, foram as escolhidas para serem integradas e os valores correspondentes destas foram utilizados na análise de regressão para o cálculo do teor de Phe presente nos hidrolisados protéicos, conforme procedimento validado no Capítulo II, empregando-se a farinha de trigo.

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

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

sendo,

A = Teor de Phe na farinha de trigo (mg Phe/100g);

B = Teor de Phe no hidrolisado protéico, após tratamento com CA (mg Phe/100g);

C = Teor de proteína na farinha de trigo (g/100g ou %);

D = Teor de proteína no hidrolisado protéico (g/100g).

.

2.2.5 Efeito de alguns parâmetros hidrolíticos sobre a remoção de fenilalanina

O efeito do tipo de enzima foi testado empregando-se a bromelina e a pancreatina comerciais, o EP e o EB, sendo que este último foi utilizado isoladamente e em associação (simultânea e sucessiva) com a pancreatina, variando-se a ordem de adição das enzimas. Avaliou-se, também, a influência da temperatura (35, 40, 50 e 70 °C), do

tempo (1h 30min, 2h 30min e 3h 30min), do pH (6,0; 7,0; 8,0 e 9,0), do tratamento físico do extrato protéico (sem tratamento físico, ultraturrax e ultrassom) e da relação proteína: carvão ativado (1:8, 1:16, 1:32 e 1:88,5). Para o estudo da influência da relação E:S, foram testados os valores de 1:100, 2:100, 3:100 e 4:100 para a pancreatina, e de 10:100, 20:100, 30:100 e 40:100 para o EB (Tabela IV.1).

2.2.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições, no mesmo dia, e as análises realizadas em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan a 5 % de probabilidade, para comparar entre si os teores finais de Phe nos hidrolisados após tratamento com CA (PIMENTEL-GOMES, 2000). A curva analítica foi obtida de acordo com o procedimento descrito por SOUZA (2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Na Tabela IV.2, estão apresentados os resultados obtidos para a remoção de Phe dos diferentes hidrolisados protéicos da farinha de trigo. Os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg Phe/100 g de HPFT), sendo esta última forma a mais apropriada para os cálculos de adequação das prescrições dietéticas de substitutos protéicos destinados a fenilcetonúricos, além de atender a regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos (BRASIL, 2002, 2003). O teor de Phe presente na farinha de trigo, obtido conforme descrito no Capítulo II foi de 354 mg Phe/100g (com 8,57 % de proteína).

Como pode ser observado na Tabela IV.2, obteve-se um percentual de remoção de Phe variando de 2,52 a 67,64 %, e o teor final de Phe de 503,29 mg/100g a 1515,94 mg/100g de hidrolisado, dependendo dos parâmetros empregados.

Tabela IV.2 – Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg Phe/100 g de hidrolisado)
H1	2,52 ^p	1515,94 ^a
H2	37,4 ^{k,l}	973,5 ^b
H3	41,86 ^{i,j}	904,15 ^{c,d}
H4	14 ^o	1331 ^b
H5	14,4 ^o	1331,8 ^b
H6	42,52 ⁱ	893,89 ^d
H7	37,02 ^l	979,37 ^b
H8	37,91 ^{k,l}	965,63 ^b
H9	63,41 ^b	562,02 ^j
H10	54,74 ^{c,d}	703,90 ^{g,h}
H11	61,53 ^b	598,21 ^j
H12	57,49 ^c	661,03 ⁱ
H13	66,28 ^a	522,44 ^k
H14	56,93 ^c	669,74 ^{h,i}
H15	42,26 ⁱ	897,93 ^{c,d}
H16	38,76 ^{k,l}	952,41 ^b
H17	39,90 ^{j,k}	934,58 ^{b,c}
H18	46,09 ^h	838,37 ^e
H19	37,41 ^{k,l}	973,41 ^b
H20	49,90 ^{f,g}	779,07 ^f
H21	52,30 ^e	741,85 ^g
H22	67,64 ^a	503,29 ^k
H23	48,27 ^g	804,52 ^{e,f}
H24	55,83 ^c	686,90 ^{h,i}
H25	52,82 ^{d,e}	733,66 ^g
H26	66,97 ^a	513,71 ^k
H27	51,01 ^{e,f}	815,10 ^{e,f}
H28	29,57 ⁿ	1095,19 ^b
H29	32,13 ^{m,n}	1055,38 ^b
H30	34,08 ^m	1025,10 ^b

Os valores referem-se ao teor de Phe nos hidrolisados, em matéria úmida. Os resultados representam médias das repetições. Médias indicadas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan.

Ressalta-se que o menor teor final de Phe alcançado neste estudo (503,29 mg/100g) situa-se acima do limite máximo estabelecido pela Legislação Brasileira (0,1g/100g de produto) (BRASIL, 2002). Entretanto, é possível obter uma farinha de trigo com teor de Phe dentro desse limite, utilizando o hidrolisado protéico (H22) que apresentou a menor quantidade deste aminoácido. Para tal, sugere-se a utilização de 11,65g deste hidrolisado (correspondendo a um teor protéico de 4,38 % e de Phe de 58,64 mg/100 g) e de 73,49g do resíduo (amido da extração protéica, contribuindo com um valor protéico de 1,0 g/100 g e um teor de Phe de 41,36 mg Phe/100 g). Assim sendo, esta mistura resultaria em uma farinha de trigo contendo 5,38 g/100 g de proteínas e 100 mg de Phe/100 g.

Visando aumentar o teor protéico desta farinha de trigo (5,38 %) em relação ao teor original (8,57 %), propõe-se a incorporação de aminoácidos isolados ou na forma de di- e tripeptídeos isentos de Phe. Para complementar os outros constituintes da farinha de trigo, poderia, ainda, ser feita a adição de lipídeos, fibras, minerais e vitaminas em quantidades próximas às reportadas pela tabela da USP (2006), cujos valores são iguais a 1,4, 0,5, 0,8 e 0,01 %, respectivamente. Por fim, para complementar os 100 g da formulação, poderia ser adicionado o amido de trigo purificado (PYLER, 2001).

Deve-se ressaltar que a presença de uma certa quantidade de Phe no produto final para fenilcetonúricos é desejável, do ponto de vista nutricional, uma vez que, por ser um aminoácido essencial, a Phe é fundamental para o crescimento normal de crianças. Além disso, as condições operacionais necessárias para atingir cerca de 100 % de remoção de Phe, aumentariam demasiadamente os custos do processo (SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2007).

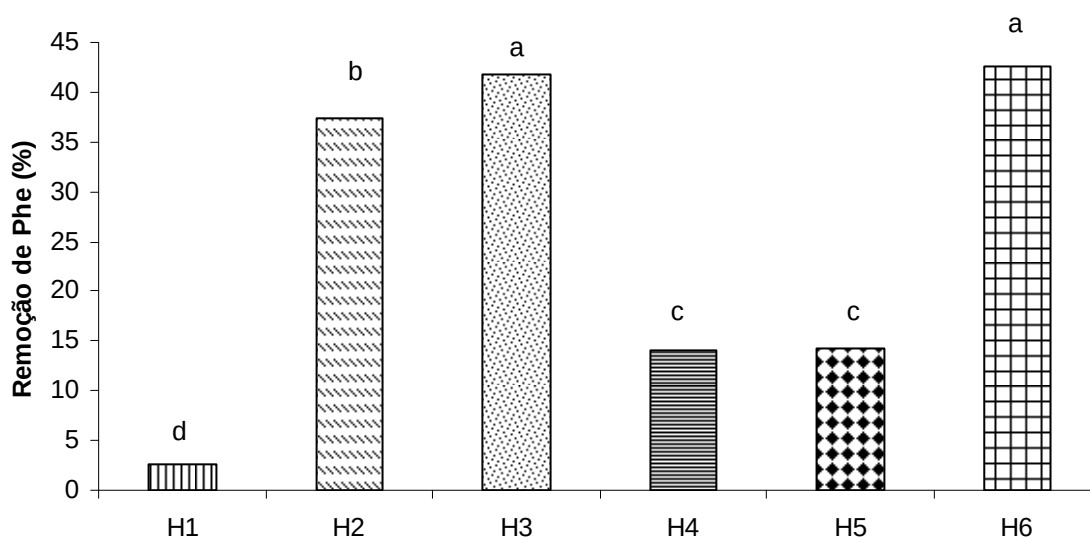
Não foram encontrados na literatura trabalhos que abordaram o estudo da remoção de Phe da farinha de trigo. Com relação a outros cereais, nenhum relato de outros autores foi encontrado na literatura. Por outro lado, alguns estudos sobre a remoção de Phe pelo CA foram realizados, pela mesma equipe do presente trabalho, com o fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), com o arroz em grãos (LOPES et al., 2008) e com a farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009), tendo sido encontrados os valores de 68,63 a 97,55 %, 85 a 100 % e 25,7 a 94,1 %, respectivamente. Observa-se, portanto, que estas faixas se aproximam da maioria dos valores encontrados no presente trabalho. Por outro lado, ao contrário da farinha de trigo, para estes cereais não foram obtidas taxas de remoção de Phe abaixo de 25 %, como foi o caso de 3 amostras (H1, H4 e H5) no presente trabalho.

3.2 EFEITO DE PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

O efeito de diversos parâmetros foi estudado e referem-se ao tipo de enzima, às ações enzimáticas isolada e em associação (simultânea e sucessiva), ao tempo de reação, à ordem de adição das enzimas, à temperatura, ao pH, à relação enzima:substrato, ao tratamento físico do extrato protéico e à relação proteína: carvão ativado.

3.2.1 Tipo de enzima e ação enzimática isolada

Para avaliar estes parâmetros, pode-se comparar os hidrolisados preparados com o EP (H1), EB (H2 e H3), bromelina (H4 e H5) e pancreatina (H6). Observa-se na Figura IV.1 que, dentre os quatro tipos de enzimas testados, o EB (pH 8,0) e a pancreatina foram as mais eficientes, não tendo apresentado diferenças significativas no percentual de remoção obtido, cujo valor médio foi de 42,19 %. A estes resultados, seguiu-se o EB (pH 6,0 – 37,4 %), a bromelina (cerca de 14 %) e, finalmente, o EP, que apresentou uma taxa de remoção de Phe de apenas 2,52 %.



H1: EP; H2: EB – pH 6,0; H3: EB pH 8,0; H4: Bromelina – 2h; H5: Bromelina 5h; H6: pancreatina.
H: hidrolisados; EP: extrato precipitado; EB: extrato bruto.

Figura IV.1 – Tipo de enzima e ação enzimática isolada

O fato do EB ter sido bem mais eficiente do que o EP e a bromelina comercial na remoção de Phe, pode estar associado, pelo menos em parte, à qualidade da atividade enzimática presente no EB e que foi removida pelos processos de precipitação empregados para obtenção do EP, assim como no preparo da bromelina. Esta qualidade refere-se à presença de outros constituintes que auxiliavam a atividade hidrolítica do EB.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram o efeito do tipo de enzima sobre a remoção de Phe da farinha de trigo. Entretanto, este parâmetro foi estudado anteriormente, empregando-se outro cereal, no mesmo laboratório do presente trabalho. Assim, SILVESTRE et al. (2009) observaram que o uso desta mesma enzima, para hidrolisar as proteínas da farinha de arroz, levou à uma maior remoção de Phe (94,1%), comparando-se com os valores obtidos pela ação de uma pancreatina ou proteases de origem microbiana (76,67 %, em média).

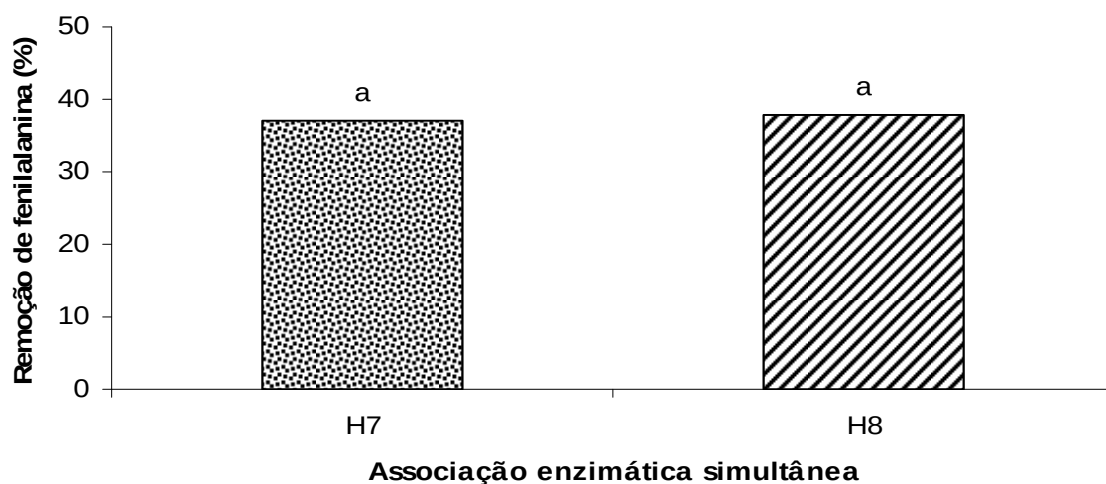
3.2.2 Associações enzimáticas: simultânea x sucessiva

Este estudo foi realizado empregando-se o EB (pH 8,0) e a pancreatina, visto que a ação isolada destas enzimas, promoveram a maior remoção de Phe, em comparação com as demais proteases testadas.

Dois hidrolisados (H7 e H8) foram preparados através da ação simultânea destas enzimas, não tendo sido observada diferença significativa entre as porcentagens de remoção de Phe (37,02 % e 37,9 %, respectivamente) (Figura IV.2).

A associação sucessiva foi empregada no preparo de 22 hidrolisados (H9 a H30), sendo que a maior porcentagem de remoção foi encontrada para os hidrolisados 13, 22 e 26 (66,28 %, 67,64 % e 66,97 %, respectivamente), para os quais não foi observada diferença significativa (Tabela IV.2).

Comparando-se os melhores resultados obtidos para estes dois tratamentos, observa-se a vantagem da associação sucessiva (média de 67,0 %) sobre a simultânea (média de 37,5 %).



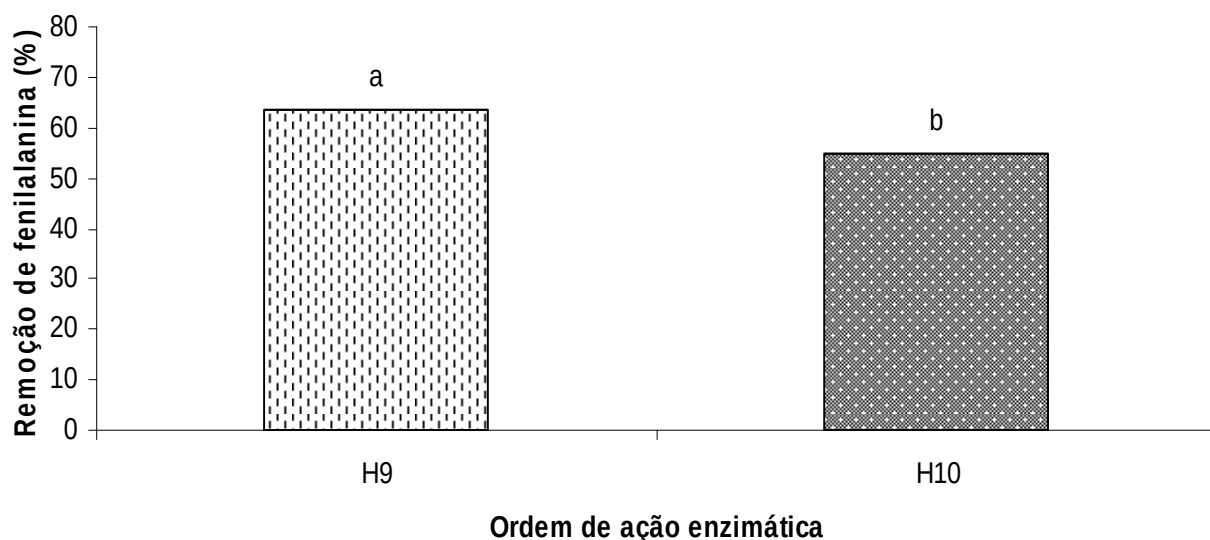
H7: EB+P 1h 30min; H8: EB+P 5h. H: hidrolisados; EB: extrato bruto; P: pancreatina.

Figura IV.2 - Ação enzimática simultânea

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram o efeito de associações enzimáticas sobre a remoção de Phe da farinha de trigo ou de qualquer outro cereal.

3.2.3 Ordem de adição das enzimas

O efeito deste parâmetro pode ser avaliado, comparando-se os resultados obtidos pelo emprego da associação sucessiva de EB com a pancreatina, para os hidrolisados H9 (EB + P) e H10 (P + EB). Pode-se na Figura IV.3 observar a vantagem da utilização de EB antes da pancreatina, pois este procedimento levou à maior remoção de Phe (63,41 %), do que no caso em que a ordem de adição das enzimas foi invertida (54,74%).



H9:EB+P; H10: P+EB. H:hidrolisados; EB: extrato bruto; P: pancreatina.

Figura IV.3 – Ordem de adição das enzimas

Considerando que tanto o EB como a pancreatina são constituídas de misturas de várias enzimas proteolíticas, pode-se sugerir para explicar este resultado, que as endopeptidases presentes no EB atuaram mais efetivamente no início da reação, tendo contribuído para abrir a molécula protéica e possibilitar a ação mais eficiente das exopeptidases da pancreatina, em um segundo momento da reação hidrolítica, promovendo uma maior exposição dos resíduos da Phe. Além disso, sabendo-se da ação mais eficiente da bromelina sobre os grupamentos – SH das proteínas, poderia promover um efeito sinérgico, e assim, promover este resultado mais favorável.

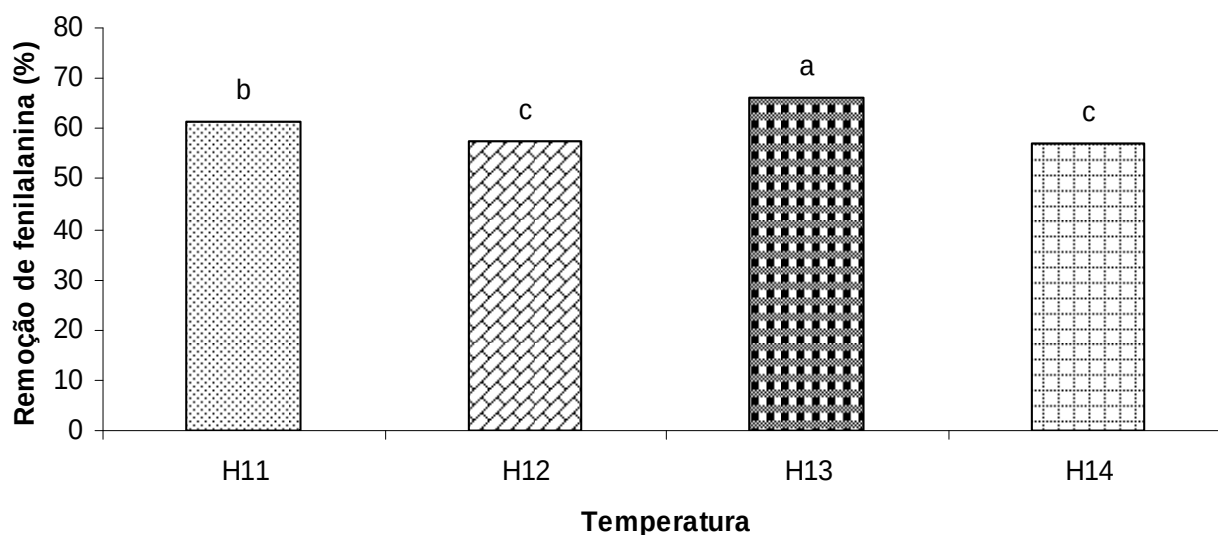
Não foram encontrados na literatura relatos abordando o efeito da associação sucessiva de enzimas sobre a remoção de Phe da farinha de trigo ou de outro cereal.

3.2.4 Associação enzimática X Ação isolada das enzimas

Para avaliar o efeito destes dois tipos de tratamento enzimático sobre a remoção de Phe, pode-se comparar os melhores resultados obtidos na associação sucessiva de EB com pancreatina (H13, H22 e H26 – média de 67 %), com os da ação isolada (H3 e H6, média de 42,19 %). Estes valores demonstram a vantagem da utilização destas enzimas, em associação sucessiva, sobre a sua ação isolada.

3.2.5 Temperatura da reação

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a remoção de Phe, deve-se comparar os hidrolisados H11, H12, H13 e H14 (35, 40, 50 e 70 °C, respectivamente), que foram preparados pela associação sucessiva de EB e pancreatina. Pode-se observar na Figura IV.4, que a temperatura afetou o percentual de remoção, sendo que o melhor resultado foi obtido a 50 °C (66,28 % de remoção), seguido do uso de 35 °C (61,53 % de remoção). Por último, ficaram os hidrolisados preparados às temperaturas de 40 °C e 70 °C, para os quais não houve diferença significativa.



H11: 35 °C; H12: 40 °C; H13: 50°C; H14: 70°C. H: hidrolisados

Figura IV.4 – Temperatura da reação.

O fato de que a remoção de Phe tenha sido maior a 50 °C poderia ser explicado, pelo menos em parte, por ser esta a temperatura ótima de ação da pancreatina. Apesar deste valor se encontrar afastado da temperatura ótima do EB (70 °C), situa-se na faixa ascendente da sua curva da atividade enzimática (Capítulo I). No caso do resultado obtido a 70 °C, que é a temperatura ótima do EB (Capítulo I), não foi observada a mesma performance, provavelmente, porque este valor encontra-se na faixa

descendente de ação da pancreatina (Capítulo I), ou, ainda, devido à ocorrência de uma inativação enzimática pois, segundo FENEMA (1996), se por um lado o emprego de temperaturas mais elevadas aumenta o rendimento das reações enzimáticas, por outro pode provocar a inativação da enzima, comprometendo o processo de hidrólise.

Não foram encontrados na literatura relatos abordando o efeito da temperatura sobre a remoção de Phe da farinha de trigo ou de outro cereal.

3.2.6 Tempo de reação

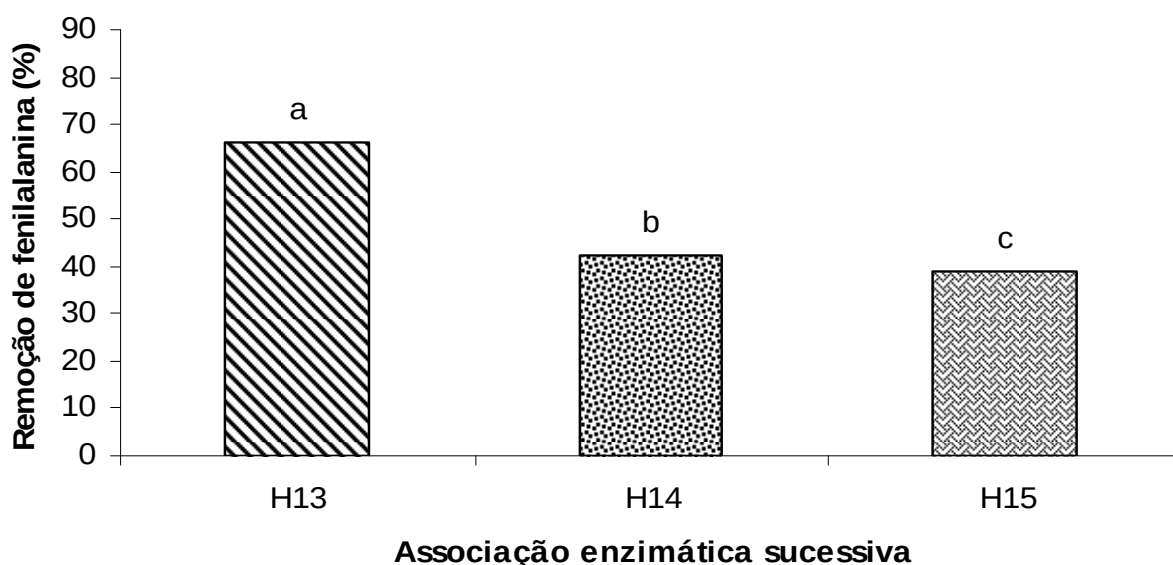
O efeito do tempo de reação sobre o percentual de remoção de Phe, pode ser observado, tanto na associação simultânea quanto na sucessiva, do EB com a pancreatina.

No primeiro caso, este tipo de tratamento foi realizado em 2 tempos de reação: 1h 30min (H7), que corresponde ao tempo ótimo de ação do EB (Capítulo I); e 5 h (H8), que foi estabelecido como tempo máximo de reação, a fim de se evitar a contaminação microbiana (CHATAUD et al., 1988). Observa-se na Tabela IV.2 e na Figura IV.2, que o tempo de reação não influenciou a remoção de Phe, uma vez que não houve diferença significativa entre os valores obtidos (37,02 % e 37,91 %, respectivamente).

Para o segundo caso, comparando-se os 3 tempos de reação para o EB e a pancreatina, respectivamente, de 1h 30min e 3h 30min, de 2h 30min e 2h 30min e de 3h 30min e 1h 30min (H13, H15 e H16, respectivamente), nota-se na Figura IV.5 que o emprego do menor tempo de ação do EB e, conseqüentemente, maior da pancreatina (H13), promoveu a mais elevada taxa de remoção de Phe, sendo os valores obtidos de 66,28 %, 42,26 % e 38,76 %, respectivamente.

Este resultado poderia ser, em parte, explicado pela atuação do EB, cuja ação foi estudada no Capítulo I. Assim, a maior remoção de Phe, obtida com 1h 30min de ação do EB, estaria associada ao fato de que a atividade máxima deste extrato foi obtida com este tempo de reação (Capítulo I). Além disso, ainda com relação à ação do EB, outra provável explicação para este resultado estaria relacionada à redução da taxa de hidrólise, com o passar do tempo, promovida por 3 fatores, ou seja, a diminuição do número de ligações peptídicas disponíveis para a ação da enzima, a inativação enzimática e a competição entre a proteína nativa e os peptídeos formados durante a hidrólise (GUAN et al., 2007).

Não foram encontrados na literatura relatos que abordaram o efeito do tempo de ação enzimática sobre a remoção de Phe, de hidrolisados protéicos de farinha de trigo ou de outros cereais.



H13: EB 1h 30min + P 3h 30min; H15: EB 2h 30min + P 2h 30min; H16: 3h 30min + P 1h 30min. H: hidrolisados; EB: extrato bruto; P: pancreatina.

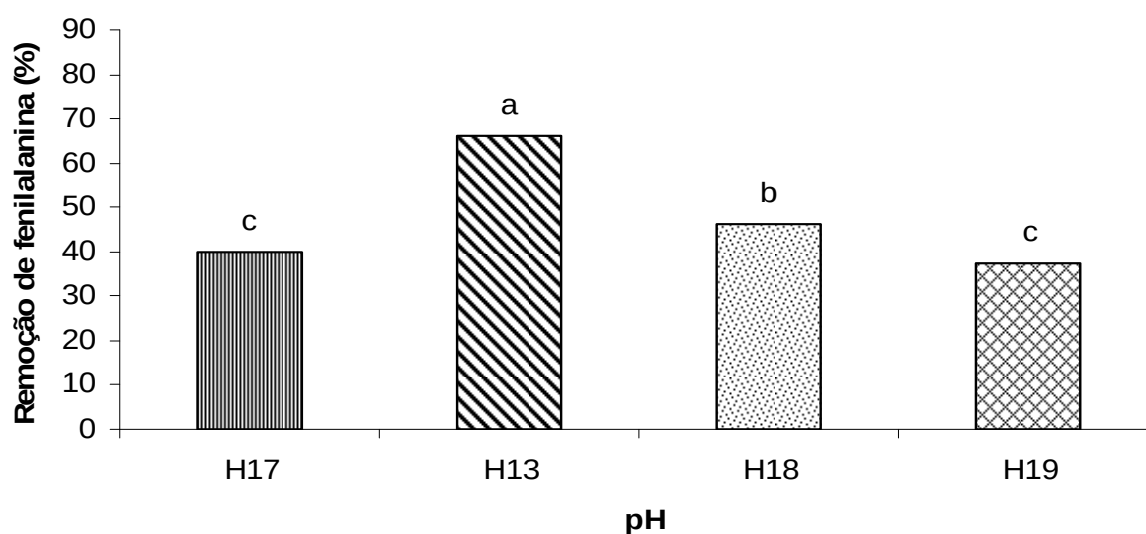
Figura IV.5 – Tempo de reação

3.2.7 pH

A avaliação do efeito deste parâmetro foi realizada nos valores de pH 6,0 (H17), pH 7,0 (H13), pH 8,0 (H18) e pH 9,0 (H19), empregando-se a associação sucessiva de EB (1h 30min) com a pancreatina (3h 30min), a 50 °C.

Observa-se na Figura IV.6 que o teste realizado no pH 7,0 levou à maior remoção de Phe (66,28 %), seguido do pH 8 (H18 - 46,09 %), pH 6 (H17 - 39,90 %) e pH 9,0 (H19 - 37,41 %), não sendo observada diferença significativa entre estes dois últimos valores. Estando todos estes valores de pH dentro da faixa ótima de atuação destas enzimas (pH de 6,0 a 9,0 para o EB – Capítulo I - e de 7,0 a 9,0 para a pancreatina – AB ENZYMES, 2001), era de se esperar que não houvesse diferença entre os resultados de remoção de Phe. Entretanto, a menor remoção de Phe obtida em pH 6,0 e 9,0 poderia ter ocorrido, provavelmente, pelo fato de que tanto o EB quanto a pancreatina serem constituídas de misturas de enzimas e outros interferentes da qualidade enzimática, minimizando a

estabilidade destas enzimas nestes dois valores de pH, que se situam nas extremidades das curvas de atividade enzimática (Capítulo I).



H17: pH 6,0; H13: pH 7,0; H18 pH 8,0; H19 pH 9,0. H: hidrolisados.

Figura VI.6 – Efeito do pH

Não foram encontrados na literatura trabalhos que estudaram o efeito do pH sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos de farinha de trigo ou de outros cereais.

3.2.8 Relação enzima:substrato

O efeito deste parâmetro foi avaliado para cada enzima separadamente, na associação sucessiva de EB (1h 30min) com a pancreatina (3h 30min), a 50 °C, pH 7,0.

3.2.8.1 Relação E:S do extrato bruto da casca do abacaxi

No intuito de avaliar o efeito da relação E:S de EB sobre a remoção de Phe, comparou-se os resultados obtidos para os hidrolisados 22 (10:100), 23 (20:100), 24 (30:100) e 25 (40:100).

Verifica-se na Figura IV.7 que o emprego da E:S de 20:100 promoveu a menor remoção de Phe (48,27 %), enquanto que, para os demais valores testados, quanto menor a relação E:S utilizada, maior foi a remoção de Phe, obtendo-se os valores de 67,64 % (E:S = 10:100), 55,83 % (E:S = 30:100) e 52,82 % (E:S = 40:100).

Este resultado poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato do EB ser uma mistura enzimática não purificada, e, assim, o seu emprego em elevadas concentrações, poderia promover uma autólise ou, ainda, a destruição da pancreatina, diminuindo não só sua ação proteolítica mas, também, interferindo na atividade enzimática, ao atuar em associação com esta enzima.

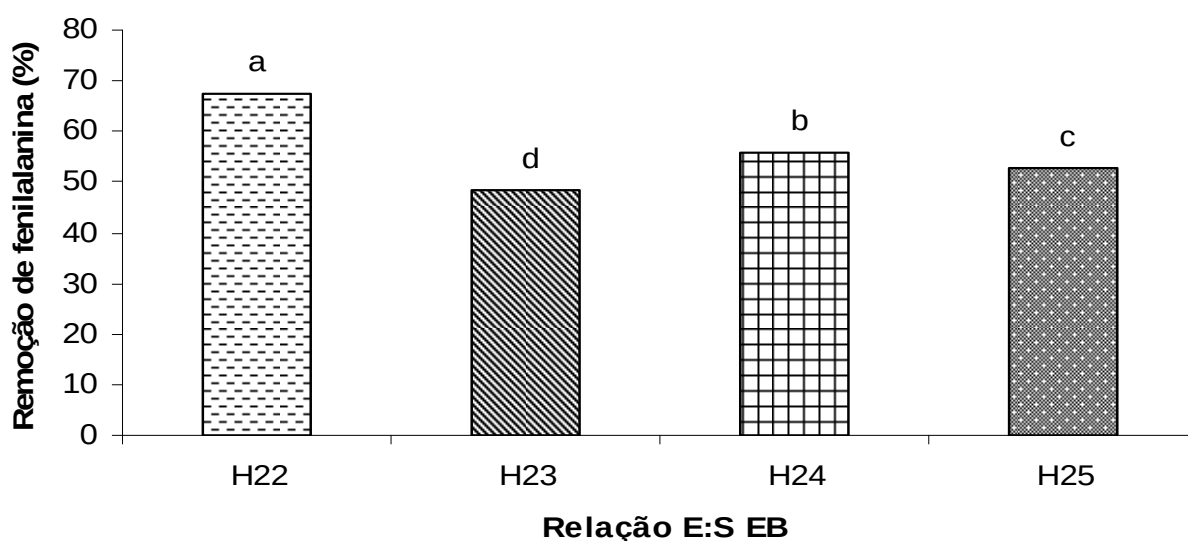


Figura IV.7 – Efeito da relação E:S do EB.

H22: E:S 10:100; H23: E:S 20:100; H24 E:S 30:100; H25: E:S 40:100. H: hidrolisado; E:S relação enzima:substrato.

3.2.8. 2 Relação E:S da pancreatina

Pode-se avaliar o efeito da relação enzima:substrato (E:S) da pancreatina, comparando-se os resultados obtidos para os hidrolisados 20 (E:S = 1:100), 21 (E:S = 2:100), 22 (E:S = 3:100) e 13 (E:S = 4:100). Observa-se na Figura IV.8 que, ao contrário do apresentado para o EB, o emprego de uma maior relação E:S levou à uma remoção de Phe mais elevada, tendo sido obtidos os seguintes resultados: 49,90 %; 52,30 %; 67,64 % e 66,28 % para os valores de E:S de 1:100, 2:100, 3:100 e 4:100, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre os 2 últimos percentuais.

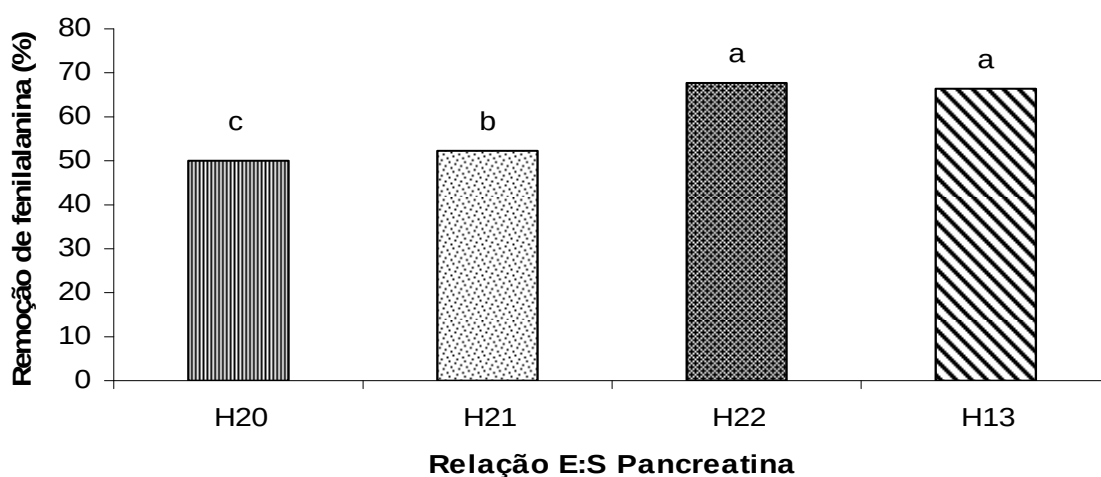


Figura IV.8 – Efeito da relação E:S da pancreatina.

H20: E:S 1:100; H21 E:S 2:100; H22: E:S 3:100; H13: E:S 4:100. H: hidrolisado; E:S : relação enzima: substrato.

Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos de farinha de trigo.

Por outro lado, 3 estudos foram realizados com diferentes cereais e empregando-se a mesma pancreatina do presente trabalho, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG. Em todas estes estudos, o efeito da relação E:S

da pancreatina foi o mesmo relatado no presente trabalho. Assim, LOPES et al. (2008) trabalhando com arroz em grãos, mostraram que a utilização da relação E:S de 2:100 levou a uma remoção de Phe superior à conseguida para uma E:S de 1:100 (99 % e 90 %, respectivamente). Igual comportamento foi observado por CAPOBIANGO et al. (2007), que relataram que o percentual de remoção de Phe de hidrolisados protéicos do fubá de milho foi de 68,72 % e de 82,52 %, quando se utilizou uma relação E:S de 1:100 e de 2:100, respectivamente. Ainda, SILVESTRE et al. (2009), observaram que a aplicação de uma crescente relação E:S, no preparo de hidrolisados protéicos de farinha de arroz (E:S de 1:100; 2:100; 3:100 e 4:100), intensificou a remoção de Phe (62,7 %; 71,7 % ; 90,7 % e 94,1%, respectivamente).

O conjunto dos resultados obtidos, variando-se a E:S das duas proteases empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo demonstra que, apesar de se esperar teoricamente, que uma maior relação E:S leve à um maior grau de hidrólise e, conseqüentemente, aumente a exposição de Phe, promovendo um menor teor final deste aminoácido, na prática, esse procedimento é bem mais complexo e depende de outros fatores, tais como tipo e concentração de enzima e substrato, pH, tempo e temperatura da reação hidrolítica.

3.2.9 Tratamento físico do extrato protéico

Com o objetivo de se analisar o efeito deste parâmetro sobre a remoção de Phe, pode-se comparar os resultados obtidos para os hidrolisados H22, H26 e H27, para os quais não se aplicou qualquer tratamento da amostra, utilizou-se o ultraturrax ou o ultrassom, respectivamente. Estas amostras foram preparadas através da associação sucessiva de EB (1h 30min, E:S =10:100) com a pancreatina (3h 30min, E:S = 3:100), a 50 °C, pH 7,0.

Observa-se na Figura IV.9 que os maiores percentuais de remoção de Phe foram obtidos na ausência do tratamento físico (67,64 %) e empregando-se o ultraturrax por 5 min (66,97 %), não sendo apontadas diferenças significativas entre estes valores. Por outro lado, o emprego do ultrassom foi prejudicial, tendo reduzido a taxa de remoção de Phe para 51,01 %.

Não foram encontrados na literatura trabalhos estudos envolvendo o efeito do tratamento físico da amostra sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos de farinha de trigo ou de outros cereais.

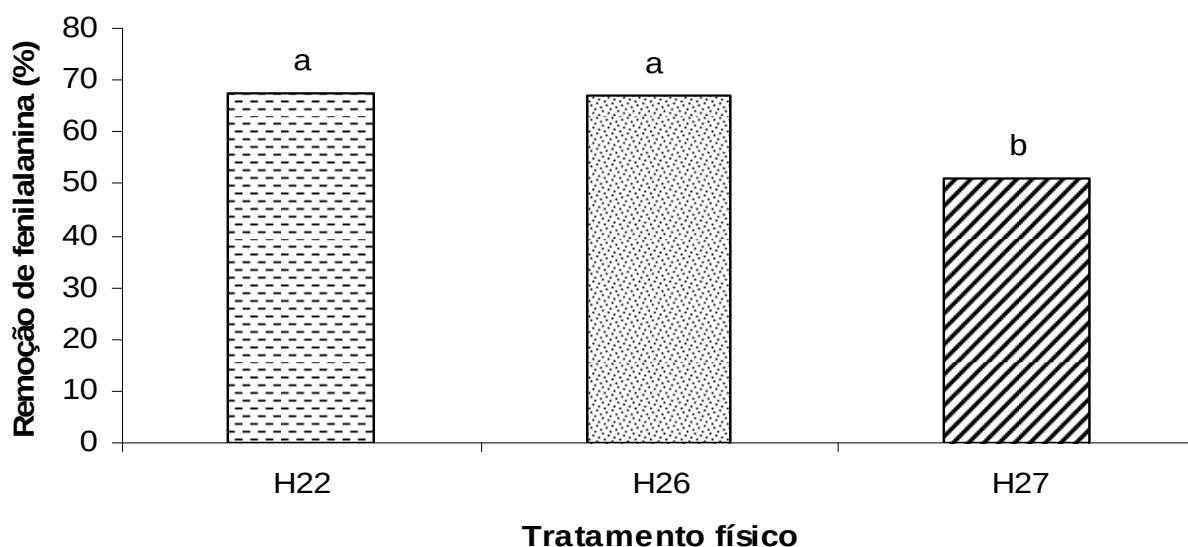


Figura IV.9 – Efeito do tratamento físico do extrato protéico. H: hidrolisado. H22: ausência de tratamento físico; H26: ultraturrax; H27: ultrassom.

3.2.10 Relação proteína: carvão ativado

O efeito da relação proteína:carvão (P:CA) sobre a remoção de Phe pode ser avaliado, comparando-se os resultados obtidos para os hidrolisados H28 (P:CA = 1:8), H29 (P:CA = 1:16), H30 (P:CA = 1:32) e H22 (P:CA = 1:88,5). Para o preparo destes hidrolisados, empregou-se a associação sucessiva de EB (1h 30min, E:S = 10:100) com a pancreatina (3h 30min, E:S = 3:100), a 50 °C, pH 7,0, sem submeter o extrato protéico a qualquer tratamento físico.

Pode-se observar na Figura IV.10 que o maior percentual de remoção foi conseguido ao se utilizar a menor P:CA (1:88,5), ou seja, a maior quantidade de carvão, atingindo-se o valor de 67,64 %, sendo que para as demais relações proteína: carvão ativado, os resultados encontrados foram semelhantes (valor médio de 31,9 %).

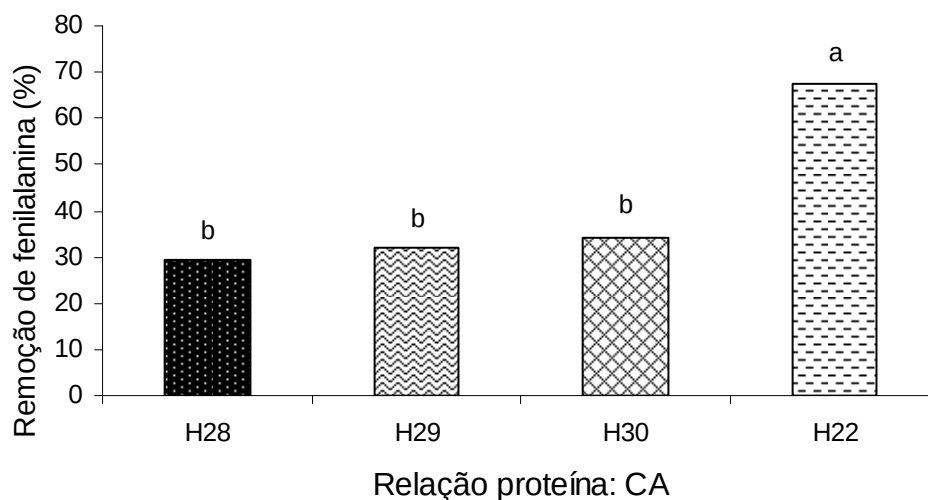


Figura IV.10 - Relação proteína: carvão ativado. H28: P:CA 1:8; H29: P:CA 1:16; H30: P:CA 1:32; H22: P:CA 1:88,5. P:CA: relação proteína : carvão ativado.

Sendo o carvão ativado o meio adsorvente responsável pela remoção da fenilalanina, uma provável explicação para o aumento da porcentagem de retirada de Phe com a diminuição da relação proteína: CA, relaciona-se com o fato de que, ao aumentar a quantidade de CA na coluna, o hidrolisado terá uma maior superfície de contato com este adsorvente, o que proporcionará maior capacidade adsorptiva e, conseqüentemente, gerando hidrolisados com menor teor final de Phe.

Não foram encontrados estudos na literatura que avaliaram o efeito de diferentes P:CA sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos de farinha de trigo. Entretanto, dois trabalhos foram, anteriormente, realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, avaliando o efeito deste parâmetro sobre a remoção de Phe de outros cereais. Assim, de forma semelhante à aqui apresentada, e empregando-se a mesma pancreatina do presente trabalho, CAPOBIANGO et al. (2007), observaram que o aumento da relação P:CA diminuiu a remoção da Phe (1:88,5 – 84,0%, 1:16 – 62,4% e 1:8 - 54,1%) de hidrolisados protéicos a partir do fubá de milho. Ainda, SILVESTRE et al. (2009) relataram o mesmo efeito sobre a remoção de Phe em hidrolisados de farinha de arroz, ao aumentar a relação P:CA de 1:88 para 1:44 e 1:22, alcançando, respectivamente, as porcentagens de remoção de 94,1 %, 78,4 % e 44,0%.

4 CONCLUSÃO

Empregando-se diversas condições de hidrólise das proteínas da farinha de trigo e quantidades variadas de CA como meio adsorvente, foi possível reduzir o teor de Phe do extrato protéico de 1555,13 para 503,29 mg Phe/100g, sendo este último valor correspondente à 67,64 % de remoção. Este resultado foi obtido utilizando a associação sucessiva do extrato enzimático bruto (relação E:S de 10:100; 1h 30min) com uma pancreatina comercial (E:S 3:100, 3h 30min), a 50 °C, no pH 7,0, sem aplicação de qualquer tratamento físico do extrato protéico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB ENZYMES. *Corolase PP*: Description and Specification. Rev. Nr. 02. 2001, 2 p.
- ADACHI, S.; KIMURA, S.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v.55, n.4, p.925-932, 1991.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Arlington: *AOAC International*, 1995. 2 v.
- ARAI, S.; MAEDA, A.; MATSUMURA, M.; HIRAO, N.; WATANABE, M. Enlarged scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.*, v.50, n.10, p.2929-2931, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isenta de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 novembro 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dezembro 2003.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Inter. J. Food Engineer.*, v. 3, p. 1-19, 2007.
- CHATAUD, J. ; DESREUMEUX, S. ; CARTWRIGHT, T. Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988.
- FENEMA, O. R. *Food Chemistry*. 3rd. New York: Marcel Dekker, 1996.1069p.
- GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chromatog. A*, v.347, p.219-235, 1985.
- GUAN, X.; YAO, H.; CHEN, Z; SHAN, L.; ZHANG, M. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chem.*, v. 101, p. 163-170, 2007.

- HAMMAN, K.; CLARK, H.; MONTINI, E.; AL-DHALIMY, M.; GROMPE, M.; FINEGOLD, M.; HARDING, C.O. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol. Therapy*, v.12, n.2, p.337-344, 2005.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v.494, n.1, p.267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.580, n.1, p.120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.2, p.438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.671, n.1, p.33-37, 1981b.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *British Food J.*, v. 107, n.1, p. 42-53, 2005.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- LOPES, D.C.F., BIZZOTTO, C.S., SILVA, V.D.M., AFONSO, W.O., LOPES Jr., C.O., SILVESTRE, M.P.C. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins.. *J. Food Technol.*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPES Jr., C.O. *Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2008. 81 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 938-942, 1991.
- MALLOY-DINIZ, L.F.; CARDOSO-MARTINS, C.; CARNEIRO, K.C.; CERQUEIRA, M.M.M.; FERREIRA, A.P.A.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L. Funções executivas em crianças fenilcetonúricas. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 62, n. 2-B, p.473-479, 2004.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Públ.*, v. 34, p. 86-96, 2000.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.*, v. 19, p. 381-387, 2006.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hidrolizates of casein depleted in phenilalanine. *App. Biochem.Microbiol.*, v. 29, n. 3, p. 302-306, 1993.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. Valio Oy, Helsinki, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, p.753-761, 1988.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US

- 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O., LOPES, D.C.F, JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am.J. Food Technol.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- SILVA, R.A. Caracterização físico-química e purificação da bromelina do *Ananas comosus* (L.) Merrill (Abacaxi-bromeliaceae). Recife: Centro de Ciências Biológicas da UFPE. 2008. 83p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica e Fisiologia).
- SILVA, M. C. Hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro do leite: remoção de fenilalanina, grau de hidrólise e perfil peptídico. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2009. 112p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- SILVESTRE, M.P.C. ; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R. ; SILVA, M.C; LOPES Jr., C.O.; SILVA, V.D.M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Engineer.*, v. 5, n. 1, p.1-13, 2009.
- SOARES, R. D. L.; BIASUTTI, E. A. R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C. R.; SILVA, V. D. M.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M.Jb.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac. Bonaer.*, v. 25, p. 325-332, 2006.
- SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- SOUZA, M.W.S.; LIMA, L.G.; SILVA; V.D.M.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de leite com teor reduzido de fenilalanina pela ação da protease do *Aspergillus sojae* e uso do carvão ativado. *E-xacta*, v. 2, n. 1, p. 23-33, 2009.
- USP (Universidade do Estado de São Paulo). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, v.4.1, 2005. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em: 22 jun. 2006.
- WASSERSTEIN, M.P.; SNYDERMAN, S.E.; SANSARICQ, C.; BUCHSBAUM, M.S. Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria. *Mol. Genet. Metabol.*, v.87, n.3, p.272–277, 2006.

CAPÍTULO V

PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DA FARINHA DE TRIGO

RESUMO

Visando a obtenção de hidrolisados protéicos de farinha de trigo contendo teor elevado de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres, assim como reduzida quantidade de grandes peptídeos, diferentes condições hidrolíticas e de tratamento da amostra foram testadas, empregando-se a associação sucessiva de uma pancreatina comercial e de um extrato enzimático bruto obtido da casca de abacaxi (EB), preparado no laboratório onde se realizou este trabalho. Assim, avaliou-se a ordem de adição das enzimas, a temperatura de reação, a relação enzima: substrato (E:S) e o efeito do ultraturrax, no intuito de promover, também, a redução de custos para adaptação em larga escala. A análise do perfil peptídico destes hidrolisados foi realizada pelo fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular, seguida pela quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pelo método da Área Corrigida da Fração. Desta forma, o melhor perfil peptídico foi encontrado para o hidrolisado obtido quando a pancreatina (E:S = 4:100) atuou primeiro por 3h 30min, seguida da ação do EB (E:S =10:100) durante 1h 30min, nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima promovendo assim, maior quantidade de di-tripeptídeos (16,98 %), um dos maiores teores de aminoácidos livres (42,70 %) e o menor conteúdo de grandes peptídeos (13,09 %). Observou-se, ainda, que o emprego do ultraturrax não afetou o perfil peptídico.

Palavras-chave: farinha de trigo, hidrólise protéica, pancreatina, casca de abacaxi, resíduo agroindustrial, peptídeos

1 INTRODUÇÃO

A utilização de hidrolisados protéicos em formulações específicas é uma área de crescente interesse. Estes hidrolisados vêm sendo empregados na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção, fenilcetonúria e pessoas com alergia a proteínas (FREITAS et al., 1993; BOZA et al., 1995, AKYIAMA, 2006). Além disto, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, pacientes HIV/AIDS, na nutrição de esportistas, como também, em dietas para controle de peso (FROKJAIR et al., 1994). Porém, a maior parte dos hidrolisados protéicos existentes no mercado nacional são obtidos a partir da caseína e do concentrado protéico do soro de leite, que são fontes protéicas importadas e de preços elevados. Por isso, o desenvolvimento de hidrolisados obtidos a partir de fontes protéicas de origem vegetal, poderia representar uma alternativa viável para minimizar os gastos na produção destes formulados (ROSSI, 2007).

O trigo, considerado essencial na alimentação humana (COLLE, 1998), encontra-se entre os principais cultivos agrícolas mundiais, apresentando uma safra anual próxima a 620 milhões de toneladas em 2007 (BORDES et al., 2008), sendo empregado, principalmente, na produção de alimentos (67 %) e de ração animal (20 %) (SAYASLAN et al., 2006). Entre todos os grãos de cereais, o trigo é o único panificável, devido à capacidade da sua farinha em produzir uma massa que exhibe as propriedades reológicas (extensibilidade e elasticidade), adequadas para a produção de pães, atributo este proporcionado pela presença das proteínas de reserva formadoras do glúten (gluteninas e gliadinas) (GIANIBELLI et al., 2002; MANU & RAO, 2008). Este cereal é amplamente utilizado na alimentação humana sob a forma de farinha, o que facilita o seu consumo e possibilita a melhor utilização de suas propriedades tecnológicas e nutricionais (ORTOLAN, 2006). Pelo fato da farinha de trigo já apresentar grande aceitação pelo consumidor, a introdução de hidrolisados protéicos de farinha de trigo de alto valor nutricional nos suplementos alimentares causaria um impacto positivo, pois, complementaria um mercado deficiente de alimentos de elevado valor protéico (MIRANDA & EL-DASH, 2002).

Uma das maneiras para melhorar o valor nutricional da farinha de trigo consiste na hidrólise enzimática de suas proteínas, pois este processo dá origem a

oligopeptídeos, especialmente di-tripeptídeos que representam a forma protéica mais rapidamente utilizável pelo organismo (KEOHANE et. al., 1985; GRIMBLE et al., 1986; RÉRAT, 1993; FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA et al., 2000). Além disso, este processo hidrolítico, realizado em condições brandas e controladas, garante a manutenção da qualidade nutricional dos hidrolisados e a obtenção de um perfil peptídico definido para melhorar as propriedades funcionais ou nutricionais dos alimentos (BOZA et al., 2000). Na forma hidrolisada, as proteínas da farinha de trigo poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de suplementos alimentares de custo moderado e de bom valor nutricional.

No preparo de hidrolisados protéicos utilizam-se, normalmente, proteases comerciais, que são produtos caros e, na maioria das vezes, importados. Por esta razão, no presente trabalho, testou-se a associação de uma enzima comercial com um extrato enzimático bruto, obtido de um resíduo agroindustrial (casca de abacaxi), preparado no laboratório, visando reduzir os custos do processo.

Considerando que o valor nutricional dos hidrolisados protéicos está associado aos seu teor de oligopeptídeos, especialmente di-tripeptídeos, SILVESTRE et al. (1994a) desenvolveram um método analítico, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou fracionar e quantificar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da. Este método já foi utilizado, pelo mesmo grupo de pesquisa, na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes protéicas (SILVESTRE et al., 1994b, MORATO et al., 2000, CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2006; BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2008).

O objetivo deste trabalho consistiu no emprego da associação sucessiva de uma pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi (EB), preparado no laboratório, para a obtenção de hidrolisados protéicos de farinha de trigo, contendo teores elevados de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres, assim como quantidade reduzida de grandes peptídeos. Para tal, diferentes parâmetros hidrolíticos e tratamento da amostra foram testados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A farinha de trigo tipo I foi adquirida no comércio de Belo Horizonte, MG. A protease Protemax® 580 L (EC 3.4.21.14), uma serino-endopeptidase de origem bacteriana – cepa do *Bacillus licheniformis*, atividade 580 KDU/g, estável em pH entre 7 e 10 com pH ótimo em 9,5, temperatura ótima de 60 °C e temperatura de inativação acima de 85 °C por 10 min) foi adquirida da Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). A pancreatina (Corolase® PP) (complexo enzimático obtido do pâncreas – EC 3.4.21.4, constituído pelas serina-endopeptidases tripsina e quimotripsina, e pelas metalo-exopeptidases carboxipeptidases A e B, atividade 200.000 LVE/g, pH ótimo de 9 e temperatura ótima de 50 °C), foi adquirida da AB Enzymes Brasil Comercial Ltda (Barueri, SP, Brasil). O extrato enzimático bruto (EB) da casca do abacaxi (*Ananás comosus*) variedade Pérola, foi preparado no laboratório. Utilizou-se o Liofilizador Freezone, (modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA), o cutter (Sire, modelo Super Cutter, São Paulo, Brasil), ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) e o agitador magnético (Fisatom, modelo 752 A, São Paulo, SP, Brasil). O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos foi constituído por uma coluna cromatográfica poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-silica (PHEA) 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyIC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPChemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo

Os hidrolisados protéicos foram preparados em 2 etapas, sendo a primeira, a extração enzimática das proteínas, de acordo com a metodologia desenvolvida no

mesmo laboratório do presente trabalho (CAPOBIANGO et al., 2007), seguida da hidrólise enzimática, empregando-se as condições hidrolíticas que promoveram em um estudo anterior, os menores teores de fenilalanina, após remoção pelo carvão ativado (Capítulo IV). Assim, foi empregada a associação sucessiva da pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi – EB (Capítulo I), estudando também outros parâmetros hidrolíticos, como a ordem de adição das enzimas (pancreatina + EB e EB + pancreatina); temperatura (35, 40, 50 e 70 °C), relação enzima:substrato (E:S) (2:100, 3:100 e 4:100 para a pancreatina), bem como o efeito do tratamento físico da amostra. Para todas as amostras analisadas definiu-se o tempo total de 5h de reação.

Tabela V.1 - Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos da Farinha de Trigo

Parâmetros hidrolíticos						
H	Protease	E:S	T (°C)	Tempo (H)	pH	Te
H1	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70/50	1h30 min/3h30 min	8/7	Ausente
H2	Pancreatina +EB	4:100 + 10:100	50/70	3h30 min/1h30 min	7/8	Ausente
H3	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	35	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H4	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	40	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H5	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H6	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H7	EB + pancreatina	10:100 + 2:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H8	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H9	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ultraturrax

H = hidrolisados; EB: extrato enzimático bruto da casca de abacaxi; E:S: relação enzima:substrato; T = temperatura; Te = tratamento físico do extrato.

2.2.2 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Para caracterizar o perfil peptídico foi realizado o fracionamento das amostras, de acordo com o tamanho da cadeia, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência – exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE et al. (1994a). Assim, os hidrolisados foram dissolvidos em uma concentração de 1 g % (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidos à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min, injetando-se um volume de 20 µL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45 µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e desgaseificada imediatamente antes do uso.

Posteriormente, os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados foram quantificados pelo método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994b), no qual realizou-se a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva padrão, relacionando a ACF em função do teor de aminoácidos (SILVESTRE et al., 1994b; MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2004; BARBOSA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007).

2.2.3 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados do extrato protéico de farinha de trigo foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos hidrolisados protéicos

3.1.1 Perfil peptídico

Os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di-tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres), conforme descrito, anteriormente, em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo (SILVESTRE et al., 1994b, MORATO et al., 2000, CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2006; BIASUTTI et al., 2007). A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado H1, a 230 nm, está apresentado na Figura V.1.

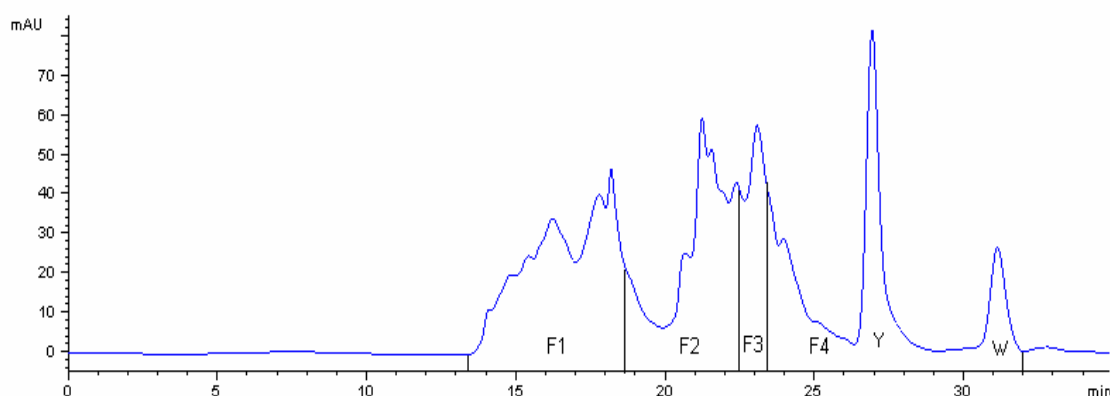


Figura V.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado H1: EB (10:100, 70 °C, 1h 30min, pH 8,0) + pancreatina (4:100, 70 °C, 3h 30min, pH 7,0).

Observa-se nesta figura que a técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, mostrou-se eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente no fracionamento de peptídeos com massas moleculares inferiores a

1000 Da. Estes resultados confirmam os obtidos, anteriormente, no mesmo laboratório do presente estudo, para os hidrolisados de proteínas utilizando como fonte protéica o soro de leite (BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007) a caseína (MORATO et al., 2000; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; MORAIS et al., 2005), o leite (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006) e o arroz (LOPES et al., 2008).

Na literatura, são encontradas diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (LI-JUN et al., 2008), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN et al., 2008), HPLC capilar (ITO et al., 2005), HPLC de fase reversa (NOGUEIRA et al., 2005), HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) (LEMIEUX et al., 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO et al., 1992; VISSER et al., 1992), Cromatografia rápida de fase líquida de proteína (Fast protein liquid chromatography - FPLC) (JE et al., 2007) e Foco Isoelétrico em Fase Líquida (SAINT-SAUVEUR et al., 2008).

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes. Assim, LEMIEUX et al. (1991), empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes. De acordo com NOGUEIRA et al. (2005), na HPLC de fase reversa há sobreposição de peptídeos e impureza nos picos. Além disso, também pode ocorrer sobrecarga de peptídeos básicos tanto na HPLC de fase reversa quanto na HPLC capilar (McCALLEY, 2004)

GOLOVCHENKO et al. (1992) e VISSER et al. (1992), também utilizando SE - HPLC, porém com uma coluna Superose-12HR 10/30, verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. SCHIMIDT & POLL (1991), empregando a SDS-PAGE, relataram a dificuldade de detectar pequenos peptídeos (< 2000 Da) pela técnica utilizada uma vez que os peptídeos, devido à fixação insuficiente, são removidos durante os procedimentos de revelação e lavagem do gel.

Alguns autores têm relatado o emprego da SE-HPLC para a caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo (WESLEY et al, 2001; WANG et al., 2007, KONG et al., 2007). Entretanto, em nenhum destes trabalhos foi possível separar os di-tripeptídeos dos peptídeos maiores. Assim, KONG et al. (2007), ao avaliarem a

distribuição da massa molecular dos peptídeos obtidos da hidrólise do glúten do trigo, sob ação das enzimas proteolíticas alcalase (*Bacillus licheniformis*) e Neutrase (*Bacillus amyloliquefaciens*), empregando-se a SE-HPLC com a coluna Sephadex G-15, observaram apenas que os peptídeos apresentavam massa molecular inferior a 1355 Da, não sendo avaliados em separado, o conteúdo de di-tripeptídeos.

De forma semelhante, WANG et al. (2007) caracterizaram o perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo obtidos com uso de uma papaína. O método analítico usado neste estudo (SE-HPLC com a coluna BioSepSec-4000) separou os peptídeos obtidos nas seguintes frações: maiores que 15000 Da, entre 15-10 000Da, entre 5-10000 Da e menores que 5000 Da.

Outros autores têm empregado a técnica do fracionamento por SE-HPLC para avaliar o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo. Assim, AKIYAMA et al (2006), empregaram este método cromatográfico com a coluna Superdex™ Peptide HR, com o intuito de separar as frações dos hidrolisados ácido e enzimático. Entretanto, este método não foi capaz de fracionar os peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente os pequenos peptídeos. Segundo os autores, apenas a faixa de massa molecular foi evidenciada, sendo que no hidrolisado preparado sob a ação de protease, predominaram os peptídeos com massa molecular superior a 1050 000 Da, enquanto que os peptídeos obtidos no hidrolisado ácido, ficaram na faixa de 500-1050 000 Da. MANU & RAO (2008), fracionaram por SE-HPLC com a coluna Biosep–SEC–S–4000, os extratos protéicos obtidos a partir de diferentes cultivares de farinha de trigo, obtendo-se as frações F1 (>130000 Da), F2 (80 – 130000 Da), F3 (10-80000 Da) e F4 (< 5000 Da), sendo estes valores superiores aos determinados no presente estudo. Da mesma maneira, KAMMOUN et al. (2003), utilizaram a SE-HPLC e a coluna Shodex KW 802.5 para caracterizar o perfil peptídico do hidrolisado de farinha de trigo, obtido pela ação da enzima Neutrase (endoprotease de *Bacillus subtilis*), obtendo-se também 4 frações: Fração1 (0-1000 Da), Fração 2 (1-2000 Da), Fração 3 (2-3000 Da) e Fração 4 (>3000 Da), estando apenas a Fração 1 dentro da faixa de massa molecular de principal interesse do presente trabalho.

3.1.2 Teor de peptídeos e de aminoácidos livres

Observa-se na Tabela V.2 que não houve uma grande variação nos perfis peptídicos dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo. Acrescenta-se, ainda, que os perfis peptídicos obtidos para todos os hidrolisados podem ser considerados adequados, do ponto de vista nutricional, uma vez que, em diversos trabalhos do mesmo grupo de pesquisa em que foram testadas várias fontes protéicas e inúmeras condições hidrolíticas, ficou evidenciada a dificuldade de se obter teores de di-tripeptídeos acima de 10 %, de aminoácidos livres acima de 30 % e de grandes peptídeos abaixo de 25 % (MORATO et al., 2000., BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004., LOPES et al., 2005., MORAIS et al., 2005; SOARES et al., 2006., BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; LOPES et al., 2008). Valores melhores do que estes somente foram obtidos após a utilização da ultrafiltração, para a retirada de peptídeos com massa molecular superior a 10000 Da (LOPES et al., 2007).

Para escolha do hidrolisado que apresentou o melhor perfil peptídico, as ponderações de alguns autores devem ser consideradas. Assim, segundo FRENHANI & BURINI (1999), durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di-tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas nesta forma e na de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores, os di-tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di-tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os primeiros apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior. GONZÁLEZ-TELLO et al. (1994) também relatam as vantagens dos di-tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

Desta maneira, conclui-se que o melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, dentre todos os hidrolisados analisados, foi obtido para o hidrolisado H2, pois apresentou a maior quantidade de di-tripeptídeos (16,98 %), um dos maiores teores de aminoácidos livres (42,70 %) e o menor de grandes peptídeos (13,09 %). Por outro lado, os perfis peptídicos mais desfavoráveis foram obtidos para os hidrolisados H3 e H7, uma vez que apresentaram um dos menores teores de di-tripeptídeos (13,55 % e 12,85 %), e um dos maiores teores de grandes peptídeos (22,61 % e 23,06 %, respectivamente).

Tabela V.2 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do extrato protéico de farinha de trigo

Hidrolisado	Fração F1 (> 7 resíduos de AA)	Fração F2 (4-7 resíduos de AA)	Fração F3 (di-tripeptídeos)	Fração F4 (aminoácidos livres)
H1	15,42 ^{d/3}	32,96 ^{a/2}	12,03 ^{e/3}	39,58 ^{a,b/1}
H2	13,09 ^{e/4}	27,23 ^{c/2}	16,98 ^{a/3}	42,70 ^{a/1}
H3	22,61 ^{a/3}	30,68 ^{a,b/2}	13,55 ^{c,d,e/4}	34,15 ^{b,c/1}
H4	17,89 ^{c/3}	31,24 ^{a,b/2}	15,16 ^{a,b,c/3}	35,71 ^{b,c/1}
H5	15,85 ^{d/3}	29,95 ^{a,b,c/2}	15,52 ^{a,b,c/3}	38,68 ^{a,b/1}
H6	20,08 ^{b/2}	32,72 ^{a/1}	14,64 ^{b,c,d/3}	32,56 ^{c/1}
H7	23,06 ^{a/3}	29,21 ^{b,c/2}	12,85 ^{d,e/4}	34,89 ^{b,c/1}
H8	18,39 ^{b,c/3}	29,18 ^{b,c/2}	13,80 ^{b,c,d,e/4}	38,62 ^{a,b/1}
H9	18,47 ^{b,c/3}	30,37 ^{a,b,c/2}	15,95 ^{a,b/3}	35,22 ^{b,c/1}

AA = aminoácidos. Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna).

3.2 EFEITO DE PARÂMETROS SOBRE O PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

Para a análise de alguns parâmetros utilizados neste trabalho (E:S, temperatura e emprego do ultraturrax), levou-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação à produção em larga escala. Assim, a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária à hidrólise; a diminuição da temperatura de reação está relacionada à menor probabilidade de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia, e a

eliminação da etapa operacional do ultraturrax, que contribui para redução dos custos do processo.

3.2.1 Ordem de adição de enzimas

No estudo da associação sucessiva da pancreatina com o EB, observou-se que a ordem de adição das enzimas interferiu no perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos. Assim, dentre as condições estudadas (H1 - EB + pancreatina e H2 - pancreatina + EB), a melhor distribuição de peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, foi obtida quando a pancreatina atuou primeiro, uma vez que produziu um maior teor de di-tripeptídeos (H2 - 16,98 % e H1 - 12,03 %) e menor de grandes peptídeos (H2 - 13,09 % e H1 - 15,42 %). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os teores de aminoácidos livres (39,58 % e 42,70 %, para H1 e H2, respectivamente). Considerando que tanto a pancreatina como o EB são constituídas de misturas de várias enzimas proteolíticas (exopeptidases), provavelmente, no início da reação predominou a ação das endopeptidases sobre as exopeptidases da pancreatina, liberando peptídeos de tamanhos variados. Em seguida, a ação das endopeptidases do EB foi, igualmente, mais eficiente do que a das exopeptidases atuando, assim, sobre os peptídeos liberados pela pancreatina, reduzindo o seu tamanho.

Não foram encontrados na literatura relatos abordando o efeito da ordem de adição das enzimas sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos da farinha de trigo ou de outros cereais.

3.2.2 Temperatura de reação

A influência da temperatura sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos da farinha de trigo pode ser avaliada comparando-se os hidrolisados H3 (35 °C), H4 (40 °C), H5 (50 °C) e H6 (70 °C). Observa-se na Tabela V.2 que o melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, foi obtido a 50 °C. Além disso, o emprego vantajoso de uma menor temperatura ocorreu ao se comparar os valores de 50 °C (H5) e 70 °C (H6), pois, apesar de não ter sido observada diferença significativa em relação aos teores de di-tripeptídeos, o emprego da temperatura mais baixa levou à obtenção de teores mais elevados de aminoácidos livres (38,68 % em H5 e 32,56 % em H6) e de

menor quantidade de grandes peptídeos (15,85 % e 20,08 %, para H5 e H6, respectivamente).

Este resultado poderia ser explicado, pelo menos em parte, por ser esta a temperatura ótima de ação da pancreatina e, portanto, a hidrólise a 50 °C intensifica sua atividade proteolítica, ao passo que o emprego de elevadas temperaturas ocasionaria a formação de estados de transição de energia, sendo este processo acompanhado de uma pequena, mas significativa desordem no sítio ativo da enzima, além de promover uma ruptura das principais ligações que estabilizam a estrutura nativa da proteína, comprometendo sua capacidade hidrolítica (ARROYO-REYNA & HERNANDEZ-ARANA, 1995). Isto está, igualmente, de acordo com a afirmativa de FENEMA (1996), segundo a qual, se por um lado o emprego de temperaturas mais elevadas aumenta o rendimento das reações enzimáticas, por outro pode provocar a inativação da enzima, comprometendo o processo de hidrólise. Estes resultados também estão de acordo com LOOSEN et al. (1991) e CHATAUD et al. (1988), que defendem o emprego de temperaturas médias (50 °C), no preparo de hidrolisados subtilisínicos de caseína. Segundo estes autores, este procedimento pode, ainda, contribuir para a redução do tempo de hidrólise, sem provocar significativa desnaturação da enzima, além de minimizar a contaminação microbiana.

Não foram encontrados na literatura trabalhos abordando o efeito da temperatura da reação sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo ou de outros cereais.

3.2.3 Relação E:S

A influência da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo, pode ser avaliada comparando-se os hidrolisados H7, H8 e H5, para os quais empregou-se E:S para a pancreatina de 2:100, 3:100 e 4:100, respectivamente. Observa-se na Tabela V.2 que a vantagem do emprego de uma menor relação E:S não foi observada em nenhum dos dois casos, ao se comparar 2:100 com 3:100 e 3:100 com 4:100 pois, além de não ter alterado significativamente os teores de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres, elevou os teores de grandes peptídeos. Na verdade, apesar das pequenas diferenças observadas nos perfis peptídicos, estes resultados eram esperados teoricamente pois, ao se utilizar uma maior quantidade de enzima (maior relação E:S), intensifica-se o processo hidrolítico com produção de menores teores de grandes peptídeos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram o efeito de E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo. Com relação a outro cereal, apenas um estudo foi feito com arroz em grãos, no laboratório do presente trabalho, empregando-se 2 pancreatinas, a corolase PP utilizada no presente trabalho e a P-1500 da Sigma. No primeiro caso, foi observado que o emprego da menor relação E:S (1:100), comparando-se com a E:S de 2:100, foi favorável para o perfil peptídico, pois contribuiu para a obtenção de maior teor de di-tripeptídeos (31,6 % e 20,6 %, respectivamente) e um menor conteúdo de grandes peptídeos (15,2 % e 20,2 %, respectivamente), apesar de ter sido encontrado um menor conteúdo de aminoácidos livres (20 % e 22 %, respectivamente) (LOPES et al., 2008), sendo estes resultados contrários aos obtidos no presente trabalho, empregando-se a mesma enzima proteolítica. Entretanto, ao se utilizar a outra pancreatina, não foi observada assim como no presente trabalho, vantagem do emprego de uma menor relação E:S, ao se comparar 1:100 com 2:100 pois, neste caso, obteve-se menor teor de di-tripeptídeos (14,7 % e 22,2 %, respectivamente) e maior de grandes peptídeos (33,7 % e 24,6 %, respectivamente), apesar de ter promovido, também, uma redução nos teores de aminoácidos livres (33,4 % e 24,2 %, respectivamente).

3.2.4 Tratamento físico do extrato protéico

Neste estudo, compararam-se os resultados obtidos para os hidrolisados H8 (sem tratamento) e H9 (emprego de ultraturrax). Observa-se na Tabela V.2 que o emprego do ultraturrax não exerceu qualquer influência sobre o perfil peptídico do hidrolisado protéico da farinha de trigo, visto que não foram observadas diferenças significativas para as frações F1, F3 e F4 (20,17 % e 18,47%, 14,82 % e 15,95% e 34,18 % e 35,22%, respectivamente).

Não foram encontrados na literatura outros trabalhos que avaliaram o efeito do tratamento físico do extrato protéico sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo ou de outros cereais.

4 CONCLUSÃO

A associação sucessiva de uma pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi (EB) foi eficiente na obtenção de hidrolisados protéicos de farinha de trigo de elevado valor nutricional. Com exceção do tratamento físico da amostra, a ordem de adição das enzimas, a relação E:S e a temperatura de reação afetaram o perfil peptídico dos hidrolisados, sendo que o melhor resultado foi obtido empregando-se a pancreatina (E:S 4:100, 3h 30min) seguida do EB (E:S 10:100, 1h 30min), no pH 7,0 à temperatura de 50 °C, obtendo-se um hidrolisado com 16,98 % de di-tripeptídeos, 42,70 % de aminoácidos livres e, apenas, 13,09 % de grandes peptídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AKIYAMA, H.; SAKATA, K.; YOSHIOKA, Y.; MURATA, Y.; ISHIHARA, Y.; TESHIMA, R.; SAWADA, J.; MAITANI, T. Profile Analysis and Immunoglobulin E Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 140, p. 36-42, 2006.
- ARROYO-REYNA, A.; HERNÁNDEZ-ARANA, A. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochim. biophys. acta.*, v. 1248, p. 123-128, 1995.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres, *J. Sci. Food Agric.*, v.84, n. 4, p.1891-1900, 2004.
- BIASUTTI, E.A.R.; LOPES, D.C.F.; SOUZA, M.W.S.; CAMPOS, R.B.D.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C.; Obtenção de Hidrolisados do Soro de Leite com Alto Teor de Oligopeptídeos Utilizando-se Subtilisina. *J. Food Technol*, v. 10, n. 4, p. 226-232, 2007.
- BORDES, J.; BRANLARD, G.; OURY, F.X.; CHARMET, G.; BALFOURIER, F. Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in a worldwide core collection. *J. of Cereal Sci.* v. 48, p. 569-579, 2008.
- BOZA, J.J.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; GIP, A. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, p. 872-875, 1995.
- BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.* v. 3, p. 1-19, 2007.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; ORNELLAS, C.B.D.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v.23, n.1, p.17-25, 2004.

- CHATAUD, J.; DESREUMEUX, S.; CARTWRIGHT, T. Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocoll.*, v. 23, p. 593-599, 2009.
- COLLE, C.A. *A Cadeia Produtiva do Trigo no Brasil: contribuição para a geração de emprego e renda*. Porto Alegre: Faculdade de Ciências Econômicas da UFRGS. 1998. 160p. (Dissertação, Mestrado em Economia Rural da UFRGS).
- FENEMA, O. R. *Food Chemistry*. 3rd. New York: Marcel Dekker, 1996. 1069p.
- FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; SANTOS, J.E.; OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1432 - 1438, 1993.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, v. 48, n.10, p. 86-88, 1994.
- GIANIBELLI, M.C.; MASCI, S.; LARROQUE, O.R.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Biochemical Characterisation of a Novel Polymeric Protein Subunit from Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. of Cereal Science*, v. 35, p. 265–276, 2002.
- GOLOVCHENKO, N.; KATAEVA, I.A.; AKIMENKO, V.K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, v. 591, n. 4, p.121-128, 1992.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M.. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-69, 1986.
- ITO, S.; YOSHIOKA, S.; OGATA, I.; YAMASHITA, E.; NAGAI, S.; OKUMOTO, T.; ISHII, K.; ITO, M.; KAJI, H.; TAKAO, K.; DEGUCHI, K. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J. Chromatogr. A*, v. 1090, p. 178-183, 2005.
- JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Proc. Biochem.*, v. 42, p. 840-846, 2007.
- KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; ELLOUZ, R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutras. *Bioresour. technol.*, v. 90, p. 249-254, 2003.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, p. 907 - 913, 1985.
- KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food chem.*, v. 102, p. 759-763, 2007.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M., GUILLOCHON, D; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*, v. 32, p.499-504, 1991.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod. Proc.*, v. 86, n. 1, p. 1-6, 2008.

- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P.R.; JULIEEN, A.R.; PEJOAN, C.H.; VERNEUIL, B. Procède pour préparer un hydrolysate enzymatique. Tessenderlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessenderlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Br. food j.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O. ; SILVESTRE, M. P. C. . Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins.. *J. Food Technol.* (Faisalabad), v. 6, p. 57-65, 2008.
- MANU, B.T.; RAO, U.J.S. P. Influence of size distribution of proteins, thiol and disulfide content in whole wheat flour on rheological and chapati texture of Indian wheat varieties. *Food Chem.*, v. 110, p. 88–95, 2008.
- McCALLEY, D.V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1038, p. 77-84, 2004.
- MIRANDA, M. Z.; EL-DASH, A. farinha integral de trigo germinado. 3. características nutricionais e estabilidade ao armazenamento1. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 3, p. 216-223, 2002.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v.34, n.1, p.59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. Anal.*, v.13, n.5, p.843-857, 2000.
- NOGUEIRA, R.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, v. 1089, p. 158-169, 2005.
- ORTOLAN, F. *Genótipos de trigo do Paraná- Safra 2004: caracterização e fatores relacionados à alteração de cor de farinha*. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. 2006. 140p. (Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos).
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- RERAT, A.A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- ROSSI, D. M. *Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado protéico a partir de enzimas microbianas*. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia da UFRS. 2007. 103 p. (Dissertação, mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente).
- SAINT-SAUVEURA, D.; GAUTHIERA, BOUTINB, S.F.Y.; MONTONIA, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Intern. D. J.*, v. 18, p. 260–270, 2008.
- SAYASLAN, A.; SEIB, P. A.; CHUNG, O. K. Wet-milling properties of waxy wheat flours by two laboratory methods. *J. food eng.*, v. 72, p. 167–178, 2006.
- SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.

- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; STARLING, A. L. P. ; SILVESTRE, M. P. C. . Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *American Journal of Food Technology*, v. 2, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. . *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994b.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v.25, n.3, p.325-332, 2006.
- VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; ROBBEN, A.J.P.M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.
- WANG, J.; ZHAO, M.; JIANG, Y. Effects of Wheat Gluten Hydrolysate and Its Ultrafiltration Fractions on Dough Properties and Bread Quality. *Food Technol. Biotechnol. Food technol. biotechnol.*, v. 45, p. 410-414, 2007.
- WESLEY, I. J.; LARROQUE, O.; OSBORNE, B. G.; AZUDIN, N.; ALLEN, H.; SKERRITT, J. H. Measurement of gliadin and glutenin content of flour by NIR spectroscopy. *J. of Cereal Sci.*, v. 34, p. 125–133, 2001.

CAPÍTULO VI

PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DA FARINHA DE TRIGO, APÓS A REMOÇÃO DE FENILALANINA

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo, após a remoção de fenilalanina. Inicialmente, as proteínas foram extraídas e hidrolisadas enzimaticamente, empregando-se a associação sucessiva de uma pancreatina comercial e de um extrato enzimático bruto obtido da casca de abacaxi (EB), preparado no laboratório. Em seguida, os hidrolisados protéicos foram tratados pelo carvão ativado e, então, fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular, seguida pela quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pelo método da Área Corrigida da Fração. O efeito de alguns parâmetros hidrolíticos, tais como a ordem de adição das enzimas, a temperatura de reação, a relação enzima: substrato (E:S), assim como do tratamento físico da amostra foram avaliados, visando, também, a redução de custos para a adaptação deste processo em larga escala. Observou-se que o emprego do ultraturrax, no preparo da amostra, foi benéfico tendo produzido um menor teor de grandes peptídeos. Além disso, o conjunto dos resultados obtidos, demonstraram a vantagem de se utilizar a pancreatina (E:S = 4:100) primeiramente, por 3h 30min, seguida da ação do EB (E:S =10:100) durante 1h 30min, nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima, produzindo uma maior quantidade de di-tripeptídeos (23,58 %), um dos maiores teores de aminoácidos livres (36 %) e o menor conteúdo de grandes peptídeos (12 %).

Palavras-chave: farinha de trigo, hidrolisados protéicos, remoção de fenilalanina, perfil peptídico.

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) consiste em uma patologia ocasionada por um erro inato do metabolismo, de herança autossômica recessiva (MARTINS et al., 1993), e que apresenta como principal tratamento, uma dieta pobre em fenilalanina (Phe), devendo ser iniciada até o vigésimo primeiro dia de vida do recém-nascido e mantida por toda a vida (KANUFRE et al., 2001). Considerando que a Phe está presente em todas as proteínas de origem animal e vegetal na proporção de 3 a 6 % (OUTINEN et al., 1996), a redução de seus teores em alimentos representa uma etapa fundamental no desenvolvimento de produtos alimentícios para fenilcetonúricos, visto que o tratamento desta patologia baseia-se, quase que exclusivamente, na utilização de misturas de aminoácidos livres que, no Brasil, são importadas e de elevado custo. Além disso, a ausência no mercado brasileiro de alimentos com teores reduzidos de Phe, torna a dieta monótona, pouco atrativa e de difícil adesão (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Os métodos utilizados para a remoção da Phe baseiam-se em duas etapas principais: a liberação deste aminoácido por hidrólise enzimática, e posterior remoção por meios adsorventes diferenciados, como carvão ativado (CA) e resinas de adsorção. Acrescenta-se, ainda, que para serem aplicados em larga escala, estes métodos devem ser práticos, de fácil reprodução, apresentar uma relação custo/benefício adequada, além de resultarem em produtos palatáveis (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993). No mesmo laboratório do presente trabalho, o tratamento enzimático de proteínas, seguido da remoção pelo carvão ativado, vem sendo empregado para a remoção de Phe, tendo sido testadas diversas proteases e condições de hidrólise (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2007), assim como avaliada a eficiência do CA na remoção de Phe de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), arroz (LOPES et al., 2008), feijão (LOPES Jr., 2008) e farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009).

Considerando a importância da farinha de trigo na alimentação do brasileiro e sua utilização restrita por parte dos fenilcetonúricos, é de grande interesse o desenvolvimento de uma farinha de trigo contendo teor reduzido de fenilalanina, a fim de que pudesse ser incorporada, sem restrições, na dieta de fenilcetonúricos (NUPAD,

2008). Para a obtenção desta farinha, seria necessária a associação de 3 etapas: inicialmente, a extração protéica, que é feita enzimaticamente, seguida da hidrólise protéica, empregando-se diferentes enzimas proteolíticas e condições de reação (CAPOBIANGO et al., 2007), o que promoveria a exposição da Phe, finalizando com sua posterior remoção pelo carvão ativado (LOPES et al., 2006, 2007; SOARES et al., 2006; CAPOBIANGO et al., 2007; SILVA et al., 2007; LOPES et al., 2008; LOPES Jr., 2008; SILVESTRE et al., 2009).

Dessa forma, as proteínas hidrolisadas da farinha de trigo com baixo teor de fenilalanina e, ainda, com elevados teores de oligopeptídeos, o que as tornaria mais efetivamente absorvidas e utilizadas pelo organismo do que proteínas intactas e misturas de aminoácidos livres (KEOHANE et al., 1985, GRIMBLE et al., 1986; RÉRAT, 1993; BOZA et al., 2000), poderiam ser adicionadas ao amido (previamente separado na extração protéica), obtendo-se assim, uma farinha de trigo a ser empregada na alimentação de crianças e adultos portadores de fenilcetonúria (KANUFRE et al., 2001).

Entretanto, o custo do processo de hidrólise protéica é elevado devido, principalmente, ao emprego de proteases comerciais, normalmente importadas. Por isto, neste trabalho, testou-se a associação de uma enzima comercial com um extrato enzimático bruto, obtido de um resíduo agroindustrial (casca de abacaxi), preparado no laboratório.

Sabendo-se que o valor nutricional dos hidrolisados protéicos relaciona-se diretamente com o seu alto teor de di-tripeptídeos, um método analítico empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA), foi desenvolvido por Silvestre et al. (1994a), o qual lhes possibilitou fracionar e quantificar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da. Este método já foi utilizado, pelo mesmo grupo de pesquisa, na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes protéicas (SILVESTRE et al., 1994b, MORATO et al., 2000, CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; BIASUTTI et al., 2007., LOPES et al., 2008).

Considerando que não foi encontrado na literatura qualquer relato sobre a caracterização do perfil peptídico de hidrolisados protéicos após a remoção de Phe, este tema foi o objetivo principal do presente trabalho. Estudou-se, ainda, o efeito do tratamento físico da amostra, assim como do emprego da associação sucessiva de uma pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi (EB),

preparado no laboratório, tendo sido avaliada a ação de alguns parâmetros hidrolíticos, tais como a ordem de adição das enzimas, a relação E:S e a temperatura de reação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A farinha de trigo tipo I foi adquirida no comércio de Belo Horizonte, MG. A protease Protamax® 580 L (EC 3.4.21.14), uma serino-endopeptidase de origem bacteriana – cepa do *Bacillus licheniformis*, atividade 580 KDU/g, estável em pH entre 7 e 10 com pH ótimo em 9,5, temperatura ótima de 60 °C e temperatura de inativação acima de 85 °C por 10min) foi adquirida da Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). A pancreatina (Corolase® PP) (complexo enzimático obtido do pâncreas – EC 3.4.21.4, constituído pelas serina-endopeptidases tripsina e quimotripsina, e pelas metalo-exopeptidases carboxipeptidases A e B, atividade 200.000 LVE/g, pH ótimo de 9 e temperatura ótima de 50 °C), foi adquirida da AB Enzymes Brasil Comercial Ltda (Barueri, SP, Brasil). Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O carvão ativado (granulado n° 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil). O extrato enzimático bruto da casca do abacaxi (*Ananás comosus*) variedade Pérola, foi preparado no laboratório. Utilizou-se o Liofilizador Freezone, (modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA), o compressor (Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), o cutter (Sire, modelo Super Cutter, São Paulo, Brasil), ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) e o agitador magnético (Fisatom, modelo 752 A, São Paulo, SP, Brasil). O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos foi constituído por uma coluna cromatográfica poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-silica (PHEA) 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo

Inicialmente, as proteínas da farinha de trigo foram extraídas empregando-se o método enzimático desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho (CAPOBIANGO et al., 2007). Em seguida, as proteínas foram hidrolisadas enzimaticamente, tendo sido obtidos 9 hidrolisados protéicos (Tabela VI.1). Para tal, empregou-se as condições hidrolíticas que promoveram em um estudo anterior, os menores teores de fenilalanina, após remoção pelo carvão ativado (Capítulo IV). Testou-se, assim, a associação sucessiva da pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi – EB (Capítulo I), variando-se os parâmetros: ordem de adição das enzimas (pancreatina + EB e EB + pancreatina); temperatura (35, 40, 50 e 70 °C), relação enzima:substrato (E:S) (2:100, 3:100 e 4:100 para a pancreatina. O efeito do tratamento físico foi testado para apenas uma das amostras. O tempo total de reação, para todas as amostras, foi de 5h.

2.2.2 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo pela utilização do carvão ativado (CA), como meio adsorvente, usando a relação proteína :carvão ativado 1:88,5 utilizada, anteriormente, no mesmo laboratório deste trabalho (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009). Foi empregado o procedimento de passagem por coluna, descrito neste mesmo laboratório por SOARES et al. (2006). Dois gramas de CA de granulometrias diferentes (20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh e 6 x 12 mesh) foram hidratados com água destilada por 10 min sob agitação constante e, em seguida, colocados em seringa descartável de 10 mL, contendo filtro de nylon com lã de vidro. Em seguida, os hidrolisados foram passados pela coluna e submetidos à pressão, tendo sido recolhidos os eluatos.

Tabela VI.1 - Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo

Parâmetros Hidrolíticos							
H	Protease	E:S	T	Tempo	pH	Te	
			(°C)	(h)			
H1	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70/50	1h30 min/3h30 min	8/7	Ausente	
H2	Pancreatina + EB	4:100 + 10:100	50/70	3h 30min/1h30min	7/8	Ausente	
H3	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	35	1h30 min/3h30 min	7	Ausente	
H4	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	40	1h30 min/3h30 min	7	Ausente	
H5	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente	
H6	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70	1h30 min/3h30 min	7	Ausente	
H7	EB + pancreatina	10:100 + 2:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente	
H8	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente	
H9	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ultraturrax	

H = hidrolisado; EB: extrato enzimático bruto da casca de abacaxi; E:S: relação enzima:substrato; T = temperatura; Te: tratamento físico do extrato.

2.2.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

A caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados, após a remoção de fenilalanina, foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação. O fracionamento dos peptídeos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE et al. (1994a). As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1 g % (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições

isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min. O volume injetado foi de 20 µL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45 µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e desgaseificada imediatamente antes do uso.

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nas frações cromatográficas. O cálculo da ACF foi realizado após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva padrão, relacionando a ACF em função do teor de aminoácidos.

2.2.4 Análise Estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos, foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

3.1.1 Perfil peptídico

O perfil cromatográfico do hidrolisado H1, a 230 nm, está apresentado na Figura VI.1. Como pode ser observado, os hidrolisados foram separados em 4 frações de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di-tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres), confirmando, assim, a eficiência da técnica aqui empregada (SE-HPLC) para fracionar os hidrolisados protéicos com massas moleculares inferiores a 1000 Da. Estes resultados estão de acordo com os obtidos, em estudos anteriores realizados neste mesmo laboratório, empregando-se esta mesma metodologia para

caracterizar os hidrolisados de diferentes fontes protéicas, tais como o soro de leite (BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007) a caseína (MORATO et al., 2000; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; MORAIS et al., 2005), o leite (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006) e o arroz (LOPES et al., 2008).

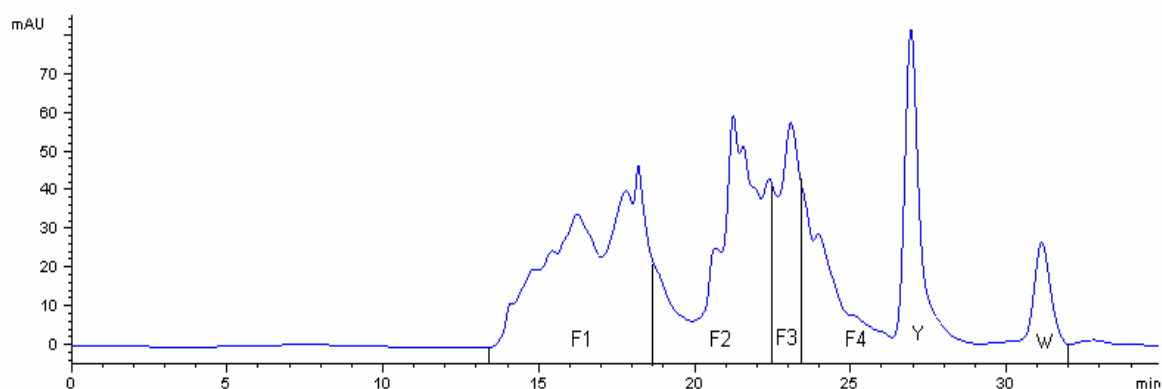


Figura VI.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado H1: EB (10:100, 70 °C, 1h 30min, pH 8,0) + pancreatina (4:100, 70 °C, 3h 30min, pH 7,0).

O fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, pode ser realizado através de diversas técnicas, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (LI-JUN et al., 2008), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN et al., 2008), HPLC capilar (ITO et al., 2005), HPLC de fase reversa (NOGUEIRA et al., 2005), HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) (LEMIEUX et al., 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO et al., 1992; VISSER et al., 1992), Cromatografia rápida de fase líquida de proteína (Fast protein liquid chromatography - FPLC) (JE et al., 2007) e Foco Isoelétrico em Fase Líquida (SAINT-SAUVEUR et al., 2008).

Porém, diferentemente do que acontece com a metodologia utilizada no presente trabalho, muitos autores têm relatado alguns problemas com as outras técnicas analíticas. Assim, LEMIEUX et al. (1991), empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, e DAVIS & LEE (1992), empregando a HPLC capilar, relataram a

difficuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes. De acordo com NOGUEIRA et al. (2005), na HPLC de fase reversa há sobreposição de peptídeos e impureza nos picos. Além disso, também pode ocorrer sobrecarga de peptídeos básicos tanto na HPLC de fase reversa quanto na HPLC capilar (McCALLEY, 2004).

GOLOVCHENKO et al. (1992) e VISSER et al. (1992), também utilizando SE-HPLC, porém com uma coluna Superose -12HR 10/30, verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. SCHIMIDT & POLL (1991), empregando a SDS-PAGE, relataram a dificuldade de detectar pequenos peptídeos (< 2000 Da) pela técnica utilizada uma vez que os peptídeos, devido à fixação insuficiente, são removidos durante os procedimentos de revelação e lavagem do gel.

A SE-HPLC também foi empregada para caracterizar o perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo, entretanto, os resultados encontrados demonstraram que não foi possível separar os di-tripeptídeos dos peptídeos maiores. Assim, WANG et al. (2007) ao analisarem os hidrolisados de glúten do trigo obtidos com uso de uma papaína, empregando a SE-HPLC com a coluna BioSepSec-4000), separaram os peptídeos obtidos nas seguintes frações: maiores que 15.000 Da, entre 15-10.000 Da, entre 5-10.000 Da e menores que 5.000 Da. De forma semelhante, KONG et al. (2007), ao avaliarem a distribuição da massa molecular dos peptídeos obtidos da hidrólise do glúten do trigo, sob ação das enzimas proteolíticas alcalase (*Bacillus licheniformis*) e Neutrase (*Bacillus amyloliquefaciens*), empregando-se a SE -HPLC com a coluna Sephadex G-15, observaram apenas que os peptídeos apresentavam massa molecular inferior a 1355 Da, não sendo avaliados em separado, o conteúdo de di-tripeptídeos.

Outra aplicação da técnica do fracionamento por SE-HPLC consistiu na avaliação do perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo. Assim, AKIYAMA et al (2006), empregaram este método cromatográfico com a coluna Superdex™ Peptide HR, com o intuito de separar as frações dos hidrolisados ácido e enzimático. Entretanto, este método não foi capaz de fracionar os peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente os pequenos peptídeos. Segundo os autores, apenas a faixa de massa molecular foi evidenciada, sendo que no hidrolisado preparado sob a ação de protease, predominaram os peptídeos com massa molecular superior a 1.050.000 Da, enquanto

que os peptídeos obtidos no hidrolisado ácido, ficaram na faixa de 500-1.050.000 Da. MANU e RAO (2008), fracionaram por SE-HPLC com a coluna Biosep–SEC–S–4000, os extratos protéicos obtidos a partir de diferentes cultivares de farinha de trigo, obtendo-se as frações F1 (>130.000 Da), F2 (80 – 130.000 Da), F3 (10-80.000 Da) e F4 (< 5.000 Da), sendo estes valores superiores aos determinados no presente estudo. Da mesma maneira, KAMMOUN et al. (2003), utilizaram a SE-HPLC e a coluna Shodex KW 802.5 para caracterizar o perfil peptídico do hidrolisado de farinha de trigo, obtido pela ação da enzima Neutrase (endoprotease de *Bacillus subtilis*), obtendo-se também 4 frações: Fração1 (0-1.000 Da), Fração 2 (1-2.000 Da), Fração 3 (2-3.000 Da) e Fração 4 (>3.000 Da), estando apenas a Fração 1 dentro da faixa de massa molecular de principal interesse do presente trabalho.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo ou de outros cereais, após a remoção de Phe.

3.1.2 Teor de peptídeos e de aminoácidos livres

Os teores dos peptídeos constituintes das frações cromatográficas dos hidrolisados de farinha de trigo estão apresentados na Tabela VI.2. Excetuando-se o hidrolisado H2, não houve uma grande variação entre os perfis peptídicos das amostras analisadas. Além disso, os elevados teores de di-tripeptídeos e aminoácidos livres obtidos, associados a quantidades relativamente baixas de grandes peptídeos, comprovam a qualidade nutricional para todos os hidrolisados estudados, uma vez que, em outros trabalhos realizados, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, testando-se várias fontes protéicas e diferentes condições hidrolíticas, ficou evidenciada a dificuldade de se obter teores de di-tripeptídeos acima de 10 %, de aminoácidos livres acima de 30 % e de grandes peptídeos abaixo de 25 % (MORATO et al., 2000., BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004., LOPES et al., 2005., MORAIS et al., 2005., SOARES et al., 2006., BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007., LOPES et al., 2008). Estes valores somente foram mais elevados, após a utilização da ultrafiltração, visando a retirada de peptídeos com massa molecular superior a 10.000 Da (LOPES et al., 2007).

Tabela VI.2 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos

Hidrolisado	Fração F1	Fração F2	Fração F3	Fração F4
H1	20,47 ^{a,b,c/3}	27,81 ^{b/2}	14,97 ^{b/4}	36,75 ^{a,b/1}
H2	12 ^{f/4}	28,43 ^{b/2}	23,58 ^{a/3}	36,00 ^{a,b/1}
H3	19,18 ^{b,c,d,e/3}	30,26 ^{a,b/2}	15,50 ^{b/4}	35,06 ^{b/1}
H4	16,64 ^{d,e/3}	32,69 ^{a/1}	22,28 ^{a/2}	28,40 ^{c/1}
H5	17,98 ^{c,d,e/3}	29,18 ^{a,b/2}	15,24 ^{b/3}	37,60 ^{a,b/1}
H6	20,92 ^{a,b/3}	27,02 ^{b/1}	14,34 ^{b/4}	34,39 ^{b/2}
H7	23,13 ^{a/2}	26,18 ^{b/2}	14,56 ^{b/3}	36,14 ^{a,b/1}
H8	19,38 ^{b,c,d/3}	27,38 ^{b/2}	13,81 ^{b/4}	39,43 ^{a,b/1}
H9	16,50 ^{e/3}	28,41 ^{b/2}	13,68 ^{b/3}	41,41 ^{a/1}

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna). F1: maior que 7 resíduos de aminoácidos; F2: entre 4 e 7 resíduos; F3: di-tripeptídeos e F4: aminoácidos livres.

Apesar destas considerações iniciais, a escolha do hidrolisado que apresentou o melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, deve ser amparada, também, em observações de outros autores. Assim, segundo FRENHANI & BURINI (1999), durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di-tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores os di-tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di-tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di-tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes

maior. GONZÁLEZ-TELLO et al. (1994) também relatam as vantagens dos di-tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

Assim sendo, do ponto de vista nutricional, o hidrolisado H2 destacou-se por ter apresentando o melhor perfil peptídico, com um dos maiores teores de di-tripeptídeos (23,58 %) e de aminoácidos livres (36 %) e o menor de grandes peptídeos (12 %). Por outro lado, os perfis peptídicos mais desfavoráveis foram obtidos para os hidrolisados H1, H6 e H7, pois, apesar dos seus teores de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres se situarem entre os mais elevados, os valores encontrados para os grandes peptídeos foram os maiores (20,47 %, 20,92 % e 23,13 %, respectivamente).

3.2 Efeito de parâmetros sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Os parâmetros (E:S, temperatura e emprego do ultraturrax), utilizados neste trabalho, foram analisados considerando-se a aplicabilidade do processo em larga escala e a redução dos gastos envolvidos. Assim, o emprego de uma menor relação E:S está associado à utilização de menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise; o de uma menor temperatura de reação está associado à diminuição de contaminação bacteriana, à redução de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia, sendo este último fator também associado à necessidade da eliminação da etapa operacional do ultraturrax.

3.2.1 Ordem de adição das enzimas

A ordem de adição das enzimas (EB + pancreatina e pancreatina + EB), empregada em associação sucessiva, interferiu no perfil peptídico dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo. Observa-se na Tabela VI.2, que a melhor distribuição de peptídeos foi obtida quando a pancreatina atuou primeiro, uma vez que promoveu um maior teor de di-tripeptídeos (H2 – 23,58 % e H1 – 14,97 %) e uma menor quantidade de grandes peptídeos (H2 – 12,00 % comparando-se com H1 – 20,47 %). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os teores de aminoácidos livres (36,75 % e 36%, para H1 e H2, respectivamente). Estes resultados eram esperados teoricamente,

baseando-se no conhecimento do complexo enzimático da pancreatina. Assim sendo, suas subunidades endopeptidases (tripsina e quimiotripsina) e as exopeptidases (carboxipeptidase A e B), ao atuarem primeiro, promoveriam a hidrólise das ligações peptídicas internas e as presentes nas porções N- ou C- terminais da cadeia peptídica, facilitando o posterior acesso do EB, que, por apresentar, provavelmente, atividade predominante de exopeptidase, atuaria, principalmente, na porção terminal dos peptídeos previamente liberados.

Não foram encontrados na literatura relatos abordando o efeito da ordem de adição das enzimas sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos da farinha de trigo ou de outros cereais, após a remoção de fenilalanina.

3.2.2 Temperatura de reação

Para a avaliação deste parâmetro, foram comparados os resultados obtidos para os hidrolisados H3 (35 °C), H4 (40 °C), H5 (50 °C) e H6 (70 °C), apresentados na Tabela VI.2. Do ponto de vista nutricional, o melhor perfil peptídico foi obtido a 40 °C. Além disso, o emprego vantajoso de uma menor temperatura ocorreu ao se comparar os valores de 40 °C (H5) e 70 °C (H6), pois, apesar da redução nos teores de aminoácidos livres (28,40 % e 34,39 %, para H4 e H6, respectivamente), o emprego da temperatura mais baixa levou à obtenção de teores mais elevados de di-tripeptídeos (22,28 % em H4 e 14,34 % em H6) e de menor quantidade de grandes peptídeos (16,64 % e 20,92 %, para H4 e H6, respectivamente).

Apesar da temperatura de 40 °C não corresponder ao ótimo de ação de nenhuma das duas enzimas utilizadas no processo hidrolítico, este valor se encontra próximo à temperatura ótima de ação da pancreatina (50 °C), o que provavelmente, poderia ter contribuído para intensificar a sua atividade proteolítica, explicando, pelo menos parcialmente, o resultado obtido. Além disso, o emprego de elevadas temperaturas ocasiona a formação de estados de transição de energia, sendo este processo acompanhado de uma pequena, mas significativa desordem no sítio ativo da enzima, o que promove uma ruptura das principais ligações que estabilizam a estrutura nativa da proteína e compromete sua capacidade hidrolítica (ARROYO-REYNA & HERNANDEZ-ARANA, 2000). Acrescenta-se, ainda, que, se por um lado o emprego de temperaturas mais elevadas aumenta o rendimento das reações enzimáticas, por outro pode provocar a inativação da enzima, comprometendo o processo de hidrólise (FENNEMA, 1996).

Estes resultados também estão de acordo com LOOSEN et al. (1991) e CHATAUD et al. (1988), que defendem o emprego de temperaturas médias no preparo de hidrolisados subtilisínicos de caseína. Segundo estes autores, este procedimento pode, ainda, contribuir para a redução do tempo de hidrólise, sem provocar significativa desnaturação da enzima, além de minimizar a contaminação microbiana.

Não foram encontrados na literatura trabalhos abordando o efeito da temperatura da reação sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo ou de outros cereais submetidos ao processo de remoção de fenilalanina.

3.2.3 Efeito da relação E:S

Visando avaliar o efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo, foram comparados os hidrolisados H7, H8 e H5, para os quais empregou-se a E:S para a pancreatina de 2:100, 3:100 e 4:100, respectivamente. Como pode ser observado na Tabela VI.2, a vantagem de se utilizar uma menor relação E:S não foi encontrada em nenhum dos dois casos. Assim, ao se comparar 2% com 3%, nota-se que, apesar de não ter havido diferenças significativas entre os teores de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres, a quantidade de grandes peptídeos foi maior a 2%, indicando, nutricionalmente, um perfil peptídico inferior. Na comparação de 3% com 4%, os valores obtidos para as quatro frações foram estatisticamente iguais, o que demonstra uma similaridade entre os dois perfis peptídicos, do ponto de vista nutricional.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram o efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo ou de outros cereais, após a remoção de fenilalanina.

3.2.4 Tratamento físico do extrato protéico

A influência do tratamento físico sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo foi avaliada, comparando-se os resultados obtidos para os hidrolisados H8 (sem tratamento) e H9 (emprego de ultraturrax). Uma ligeira vantagem da utilização do ultraturrax no preparo do hidrolisado, do ponto de vista nutricional, pode ser observada na Tabela VI.2, sendo esta relacionada ao menor teor de grandes peptídeos, visto que a diferença entre os valores obtidos com o emprego do ultraturrax foi de apenas 2,88 % (19,38 % em H8 e 16,50 % em H9).

Não foram encontrados na literatura outros trabalhos que avaliaram o efeito do tratamento físico do extrato sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo ou de outros cereais, após a remoção de fenilalanina.

4 CONCLUSÃO

A caracterização do perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo, após a remoção de Phe, estudando-se o efeito de vários parâmetros hidrolíticos e do tratamento da amostra por ultraturrax, revelou que foi possível obter teores relativamente elevados de di-tripeptídeos (23,58 %) e de aminoácidos livres (36 %), assim como pequenas quantidades de grandes peptídeos (12 %). Estes resultados foram obtidos ao se utilizar a pancreatina (E:S = 4:100) por 3h 30min, seguida da ação do EB (E:S =10:100) por 1h 30min, nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, H.; SAKATA, K.; YOSHIOKA, Y.; MURATA, Y.; ISHIHARA, Y.; TESHIMA, R.; SAWADA, J.; MAITANI, T. Profile Analysis and Immunoglobulin e Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 140, p. 36-42, 2006.
- ARROYO-REYNA, A.; HERNÁNDEZ-ARANA, A. The thermal denaturation os stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochim. biophys. acta.*, v. 1248, p. 123-128, 1995.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, v.84, n. 4, p.1891-1900, 2004.
- BIASUTTI, E.A.R.; LOPES, D.C.F.; SOUZA, M.W.S.; CAMPOS, R.B.D.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C.; Obtenção de Hidrolisados do Soro de Leite com Alto Teor de Oligopeptídeos Utilizando-se Subtilisina. *J. Food Technol*, v. 10, n. 4, p. 226-232, 2007.
- BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L. ; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.* v. 3, p. 1-19, 2007.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; ORNELLAS, C.B.D.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v.23, n.1, p.17-25, 2004.

- CHATAUD, J.; DESREUMEUX, S.; CARTWRIGHT, T. Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food hydrocoll.*, v. 23, p. 593-599, 2009.
- DAVIS, M.T.; LEE, T.D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: A practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci.*, v.1, p.935-944, 1992.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- GOLOVCHENKO, N.; KATAEVA, I.A.; AKIMENKO, V.K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, v. 591, n. 4, p.121-128, 1992.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M.. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-69, 1986.
- ITO, S.; YOSHIOKA, S.; OGATA, I.; YAMASHITA, E.; NAGAI, S.; OKUMOTO, T.; ISHII, K.; ITO, M.; KAJI, H.; TAKAO, K.; DEGUCHI, K. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J. Chromatogr. A*, v. 1090, p. 178-183, 2005.
- JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Proc. Biochem.*, v. 42, p. 840-846, 2007.
- KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; ELLOUZ, R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutras. *Bioresour. technol.*, v. 90, p. 249-254, 2003.
- KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S.; SOARES, R.D.L.; REIS, D.G. *Receitas especiais para fenilcetonúria*. Belo Horizonte: Folium, 2001. 65p.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, p. 907 - 913, 1985.
- KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food chem.*, v. 102, p. 759-763, 2007.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D.; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*, v. 32, p.499-504, 1991.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod. Proc.*, v. 86, n. 1, p. 1-6, 2008.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P.R.; JULIEEN, A.R.; PEJOAN, C.H.; VERNEUIL, B. Procédé pour préparer un hydrolysate enzymatique. Tesserderlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tesserderlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Br. food j.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.

- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr. & Food Sci.*, v. 36 n. 2, p. 96-104, 2006.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O. ; SILVESTRE, M. P. C. . Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins.. *J. Food Technol.*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPES Jr., C.O. Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2008. 81p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A. ; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 938-942, 1991.
- MANU, B.T.; RAO, U.J.S. P. Influence of size distribution of proteins, thiol and disulfide content in whole wheat flour on rheological and chapati texture of Indian wheat varieties. *Food Chem.*, v. 110, p. 88–95, 2008.
- MARTINS, A. M.; FISBERG, R. M.; SCHMIDT, B. J. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica NESTLÉ, São Paulo, n.54, 1993.
- McCALLEY, D.V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1038, p. 77-84, 2004.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pub.* v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v.34, n.1, p.59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. Anal.*, v.13, n.5, p.843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochem. Microbiol.*, v.29, n.3, p. 302-306, 1993.
- NOGUEIRA, R.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, v. 1089, p. 158-169, 2005.
- NUPAD – Núcleo de ações e pesquisas em apoio diagnóstico. Disponível em: < <http://www.nupad.medicina.ufmg.br/>>. Acesso em: 15 de outubro de 2008
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. *Valio Oy, Helsink, Finland, Patents US 5547687*, aug. 20. 1996.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- RERAT, A.A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- SAINT-SAUVEURA, D.; GAUTHIERA, BOUTINB, S.F.Y.; MONTONIA, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Intern. D. J.*, v. 18, p. 260–270, 2008.
- SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.

- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; STARLING, A. L. P. ; SILVESTRE, M. P. C. . Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Technol.*, v. 2, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. . *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994b.
- SILVESTRE, M. P. C.; VIEIRA, C. R.; SILVA, M. R.; SILVA, M. C.; LOPES Jr., C. O.; SILVA, V. D. M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolyzing rice proteins aiming at phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.*, v. 5, n. 1, 2009.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v.25, n.3, p.325-332, 2006.
- SOARES, R.D.L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R; SILVESTRE, M.P.C. Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol.*, v. 21, n. 1, p. 45-56, 2007.
- VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; ROBBEN, A.J.P.M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.
- WANG, J.; ZHAO, M.; JIANG, Y. Effects of Wheat Gluten Hydrolysate and Its Ultrafiltration Fractions on Dough Properties and Bread Quality. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 45, p. 410-414, 2007.

CAPÍTULO VII

EFEITO DA REMOÇÃO DE FENILALANINA SOBRE O PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DA FARINHA DE TRIGO

RESUMO

A inclusão da farinha de trigo, sem restrição, na dieta dos fenilcetonúricos requer a hidrólise das proteínas, seguida da remoção de fenilalanina. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito deste último procedimento no perfil peptídico dos hidrolisados protéicos. Inicialmente, nove hidrolisados enzimáticos foram preparados, empregando-se a associação sucessiva de uma pancreatina comercial e de um extrato enzimático bruto obtido da casca de abacaxi (EB), preparado no laboratório, testando-se também, o efeito de diversos parâmetros de reação, como a ordem de adição das enzimas, a temperatura de reação, a relação enzima: substrato (E:S), assim como o tratamento físico da amostra. A análise do perfil peptídico destes hidrolisados foi realizada em 2 etapas: antes e após a remoção da Phe, empregando-se o carvão ativado (CA) como meio adsorvente. A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular foi utilizada para o fracionamento, seguida pela quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pelo método da Área Corrigida da Fração. O processo de remoção de Phe melhorou o perfil peptídico de 3 hidrolisados, não afetou o de 5 hidrolisados e, para apenas uma amostra, exerceu influência negativa. O efeito benéfico deste processo está relacionado a um aumento no teor de di-tripeptídeos ou a uma redução na quantidade de grandes peptídeos. O melhor perfil peptídico foi obtido após a remoção de Phe, quando se utilizou a pancreatina na relação E:S de 4:100, a 50 °C e por 3h 30min, seguida do EB na relação E:S de 10:100, a 70 °C, por 1h 30min.

Palavras-chave: farinha de trigo, hidrolisados protéicos, remoção de Phe, perfil peptídico.

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria é uma doença genética, causada por uma mutação no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase, ativa no fígado e responsável pela transformação de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). O tratamento da fenilcetonúria é essencialmente dietético e, no Brasil, utiliza-se fórmulas importadas e de alto custo, constituídas de misturas de aminoácidos livres, isentas de Phe, resultando em uma dieta monótona e pouco palatável (MIRA & MARQUEZ, 2000; MALLOY-DINIZ et al., 2004, HAMMAN et al., 2005; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; WASSERSTEIN et al., 2006). A ingestão de alimentos de alto valor protéico e com teor de Phe de aproximadamente 5 % é controlada na dieta dos fenilcetonúricos, sendo que os cereais, dentre eles o trigo, faz parte deste grupo de alimentos cuja ingestão deve ser controlada. Portanto, a inclusão da farinha de trigo na alimentação destes pacientes, sem restrição, deve passar necessariamente, por uma etapa de remoção de Phe. Assim, vários métodos foram estudados visando à remoção desse aminoácido de hidrolisados protéicos (MIRA & MARQUEZ, 2000), podendo-se citar a adsorção em carvão ativado (CA) ou resinas de adsorção, cromatografia de troca iônica, peneira molecular ou filtração em gel. A escolha do método deve considerar a praticidade, a reprodutibilidade e a relação custo/eficiência de cada tratamento (OUTINEN et al., 1996; MOSZCZYNSKI & IDZIAK, 1993). O laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG tem realizado estudos para avaliar a eficiência do CA na remoção de Phe de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), arroz (LOPES et al., 2008), feijão (LOPES Jr., 2008) e farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009).

Esta etapa de remoção de Phe deve ser precedida da extração protéica e do tratamento enzimático, originando os hidrolisados protéicos. Entretanto, as proteases comerciais são, em sua maioria, importadas e de custo elevado. Assim, com o objetivo de reduzir os custos operacionais, foi testada neste trabalho, a associação de uma enzima comercial com um extrato enzimático bruto, obtido de um resíduo agroindustrial (casca de abacaxi), preparado no laboratório.

O valor nutricional dos hidrolisados protéicos está relacionado com o tamanho dos peptídeos, visto que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção dos mesmos e, além disso, fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta (KEOHANE et al., 1985, GRIMBLE et al., 1986; VIJAYALAKSHIMI et al., 1986; RÉRAT, 1993; BOZA et al., 2000).

Visando caracterizar o perfil peptídico de hidrolisados protéicos, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (LI-JUN et al., 2008), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN et al., 2008), HPLC capilar (ITO et al., 2005), HPLC de fase reversa (NOGUEIRA et al., 2005), HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) (LEMIEUX et al., 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO et al., 1992; VISSER et al., 1992). O método desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994a) foi empregado na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes protéicas por este mesmo grupo de pesquisa (SILVESTRE et al., 1994b, MORATO et al., 2000, CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; BIASUTTI et al., 2007., LOPES et al., 2008), foi. Dessa forma, este método, que permite fracionar e quantificar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, foi aplicado, de forma análoga, no presente trabalho, utilizando-se a mesma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da remoção de fenilalanina sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo, uma vez que não foram encontrados na literatura nenhum trabalho que abordasse este tema. Desta forma, a obtenção de hidrolisados protéicos de farinha de trigo com elevado teor de di-tripeptídeos e com pequenas quantidades de Phe, seria nutricionalmente vantajosa para a reconstituição da farinha de trigo destinada aos fenilcetonúricos. Neste sentido, estudou-se, a influência do tratamento físico da amostra, assim como do emprego da associação sucessiva de uma pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi (EB), preparado no laboratório, e verificou-se também, a ação de

diversos parâmetros hidrolíticos, tais como a ordem de adição das enzimas, a relação E:S e a temperatura de reação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A farinha de trigo tipo I foi adquirida no comércio de Belo Horizonte, MG. A protease Protamax® 580 L (EC 3.4.21.14), uma serino-endopeptidase de origem bacteriana – cepa do *Bacillus licheniformis*, atividade 580 KDU/g, estável em pH entre 7 e 10 com pH ótimo em 9,5, temperatura ótima de 60 °C e temperatura de inativação acima de 85 °C por 10min) foi adquirida da Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). A pancreatina (Corolase® PP) (complexo enzimático obtido do pâncreas – EC 3.4.21.4, constituído pelas serina-endopeptidases tripsina e quimotripsina, e pelas metalo-exopeptidases carboxipeptidases A e B, atividade 200.000 LVE/g, pH ótimo de 9 e temperatura ótima de 50°C), foi adquirida da AB Enzymes Brasil Comercial Ltda (Barueri, SP, Brasil). Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O carvão ativado (granulado n° 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil). O extrato enzimático bruto da casca do abacaxi (*Ananás comosus*) variedade Pérola, foi preparado no laboratório. Utilizou-se o Liofilizador Freezone, (modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA), o compressor (Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), o cutter (Sire, modelo Super Cutter, São Paulo, Brasil), ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) e o agitador magnético (Fisatom, modelo 752 A, São Paulo, SP, Brasil). O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos foi constituído por uma coluna cromatográfica poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-silica (PHEA) 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo

Inicialmente, a enzima de *Bacillus licheniformis* foi empregada para extrair as proteínas da farinha de trigo, de acordo com o método desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho (CAPOBIANGO et al., 2007). O extrato protéico obtido foi submetido à hidrólise enzimática, testando-se a associação sucessiva da pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi – EB (Capítulo 1), variando-se os parâmetros: ordem de adição das enzimas (pancreatina + EB e EB + pancreatina); temperatura (35, 40, 50 e 70°C) e relação enzima:substrato (E:S) (2:100, 3:100 e 4:100 para a pancreatina. Dessa forma, foram obtidos 9 hidrolisados protéicos, que estão apresentados na Tabela VII.1, empregando-se as condições hidrolíticas que promoveram em um estudo anterior, os menores teores de fenilalanina, após remoção pelo carvão ativado (Capítulo IV). O tempo total de reação, para todas as amostras, foi de 5h, sendo testado o efeito do tratamento físico em apenas um dos casos estudados.

2.2.2 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos

A remoção da Phe foi realizada pela utilização do CA como meio adsorvente, empregando-se o procedimento de passagem por coluna, desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho (SOARES et al., 2006). O CA foi hidratado com água destilada por 10 min sob agitação constante e, em seguida, colocado em seringa descartável de 10 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. A coluna de carvão ativado foi montada colocando-se embaixo o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por último o de maior granulometria. Em sequência, os hidrolisados foram passados pela coluna em quantidade suficiente para atingir a relação proteína:CA 1:88,5 utilizada, anteriormente, no mesmo laboratório deste trabalho (CAPOBIANGO et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009) e submetidos à pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), tendo sido recolhidos os eluatos.

Tabela VII.1 - Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo

Parâmetros Hidrolíticos						
H	Protease	E:S	T (°C)	Tempo (h)	pH	Te
H1	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70/50	1h30 min/3h30 min	8/7	Ausente
H2	Pancreatina + EB	4:100 + 10:100	50/70	3h 30min/1h30min	7/8	Ausente
H3	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	35	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H4	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	40	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H5	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H6	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H7	EB + pancreatina	10:100 + 2:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H8	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ausente
H9	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	1h30 min/3h30 min	7	Ultraturrax

H = hidrolisado; EB: extrato enzimático bruto da casca de abacaxi; E:S: relação enzima:substrato; T = temperatura; Te: tratamento físico do extrato.

2.2.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Para caracterizar o perfil peptídico dos hidrolisados, antes e após a remoção de fenilalanina, empregou-se o fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e a sua posterior quantificação. Este primeiro procedimento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE et al. (1994a). Sucintamente, as amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1 g % (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob

condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min. O volume injetado foi de 20 µL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45 µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e degaseificada imediatamente antes do uso. Posteriormente, a quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres presentes nas frações cromatográficas foi realizada empregando-se o método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994b). O cálculo da ACF foi realizado após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Finalmente, traçou-se, uma curva padrão, relacionando a ACF com os teores de aminoácidos das frações cromatográficas.

2.2.4 Análise Estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos, foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

3.1.1 Perfil peptídico

No intuito de exemplificar o perfil cromatográfico obtido dos hidrolisados protéicos, antes e após a remoção de Phe, apresenta-se abaixo, o hidrolisado H1 a 230 nm (Figura VII.1). As amostras foram separados em 4 frações de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di-tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres). A análise deste perfil obtido, permite concluir que a técnica de SE-HPLC, empregada neste estudo mostrou-se eficiente para fracionar os hidrolisados protéicos com massas moleculares

inferiores a 1000 Da. Estes resultados estão de acordo com os obtidos, em estudos anteriores realizados neste mesmo laboratório, utilizando esta metodologia, para caracterizar os hidrolisados de diferentes fontes protéicas, tais como o soro de leite (BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007) a caseína (MORATO et al., 2000; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; MORAIS et al., 2005), o leite (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006) e o arroz (LOPES et al., 2008).

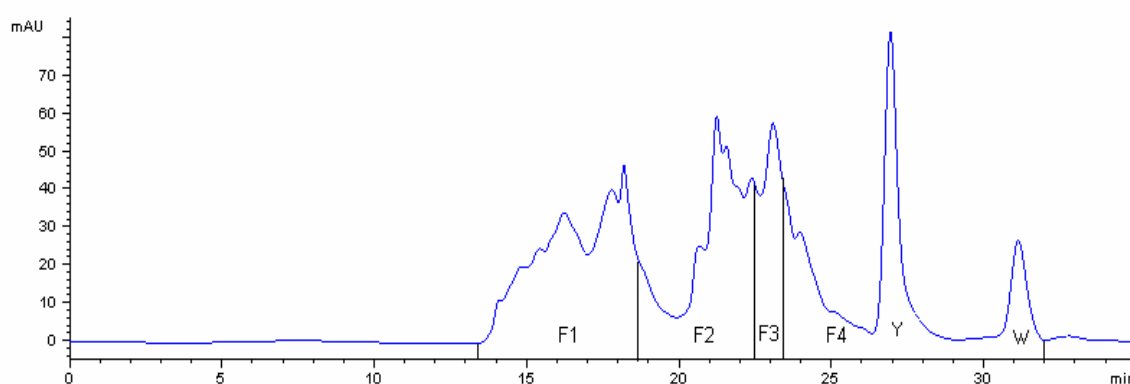


Figura VII.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado H1: EB (10:100, 70 °C, 1h 30min, pH 8,0) + pancreatina (4:100, 70 °C, 3h 30min, pH 7,0).

Vários métodos têm sido relatados na literatura visando o fracionamento de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (LI-JUN et al., 2008), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN et al., 2008), HPLC capilar (ITO et al., 2005), HPLC de fase reversa (NOGUEIRA et al., 2005), HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) (LEMIEUX et al., 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO et al., 1992; VISSER et al., 1992), Cromatografia rápida de fase líquida de proteína (Fast protein liquid chromatography - FPLC) (JE et al., 2007) e Foco Isoelétrico em Fase Líquida (SAINT-SAUVEUR et al., 2008).

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes. Assim, LEMIEUX et al. (1991), empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes. De acordo com NOGUEIRA et al. (2005), na HPLC de fase reversa há sobreposição de peptídeos e impureza nos picos. Além disso, também pode ocorrer sobrecarga de peptídeos básicos tanto na HPLC de fase reversa quanto na HPLC capilar (McCALLEY, 2004). GOLOVCHENKO et al. (1992) e VISSER et al. (1992), também utilizando SE-HPLC, porém com uma coluna Superose - 12HR 10/30, verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. Por outro lado, o emprego da eletroforese em gel de poliacrilamida- sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) por SCHIMIDT & POLL (1991) para estimar a distribuição por pesos moleculares de peptídeos, também não foi adequada, pois esta técnica não permite a identificação dos oligopeptídeos que são arrastados no momento da coloração e lavagem do gel. Dessa forma, a técnica empregada neste trabalho, desenvolvida por SILVESTRE et al. (1994a) possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, apresentando resultados contrários aos encontrados na literatura.

A SE-HPLC também tem sido usada na caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo, apesar de não ter promovido a separação dos di-tripeptídeos dos hidrolisados maiores, de acordo com o relatado por WESLEY et al. (2001), WANG et al. (2007) e KONG et al. (2007). Assim, KONG et al. (2007), empregaram a SE -HPLC com a coluna Sephadex G-15, para avaliarem a distribuição da massa molecular dos peptídeos obtidos da hidrólise do glúten do trigo, sob ação das enzimas proteolíticas alcalase (*Bacillus licheniformis*) e Neutrase (*Bacillus amyloliquefaciens*), e observaram apenas que os peptídeos apresentavam massa molecular inferior a 1355 Da, não sendo avaliados em separado, o conteúdo de di-tripeptídeos.

De maneira análoga, WANG et al. (2007) caracterizaram o perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo sob a ação de uma papaína, separando os peptídeos obtidos nas seguintes frações: maiores que 15000 Da, entre 15-10 000 Da, entre 5-10 000 Da e menores que 5 000 Da. Para tal, empregou o método analítico SE-HPLC com a coluna BioSepSec-4000.

AKIYAMA et al. (2006) empregando a coluna Superdex™ Peptide HR, com o intuito de separar as frações dos hidrolisados ácido e enzimático de farinha de trigo,

relataram que apenas a faixa de massa molecular foi evidenciada, sendo que no hidrolisado preparado sob a ação de protease, predominaram os peptídeos com massa molecular superior a 1050 000 Da, enquanto que os peptídeos obtidos no hidrolisado ácido, ficaram na faixa de 500-1050 000 Da. Utilizando a coluna Biosep–SEC–S–4000 e a SE-HPLC, MANU & RAO (2008), fracionaram os extratos protéicos obtidos a partir de diferentes cultivares de farinha de trigo, obtendo-se as frações F1 (>130000 Da), F2 (80 – 130 000 Da), F3 (10-80 000 Da) e F4 (< 5 000 Da), sendo estes valores superiores aos determinados no presente estudo. De forma semelhante, KAMMOUN et al. (2003), utilizaram a SE-HPLC e a coluna Shodex KW 802.5 para caracterizar o perfil peptídico do hidrolisado de farinha de trigo, obtido pela ação da enzima Neutrase (endoprotease de *Bacillus subtilis*), obtendo-se também 4 frações: Fração1 (0-1 000 Da), Fração 2 (1-2 000 Da), Fração 3 (2-3 000 Da) e Fração 4 (>3000 Da), estando apenas a Fração 1 dentro da faixa de massa molecular de principal interesse do presente trabalho.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que compararam o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de farinha de trigo ou de outros cereais, antes e após a remoção de Phe.

3.1.2 Teores de peptídeos e de aminoácidos livres

Os resultados obtidos para os teores de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo estão expostos na Tabela VII.2, na qual os valores estão apresentados em termos de porcentagem de peptídeos presentes nas frações F1, F2, F3 e F4. Pode-se observar que houve variação entre os perfis cromatográficos das amostras analisadas, sendo que muitos hidrolisados apresentaram teores peptídicos significativamente diferentes. Entretanto, os elevados teores de di-tripeptídeos e aminoácidos livres obtidos, e ainda, quantidades moderadas de grandes peptídeos, confirmam o elevado valor nutricional de todos os hidrolisados estudados, uma vez que, em outros trabalhos realizados, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, testando-se várias fontes protéicas e diferentes condições hidrolíticas, ficou evidenciada a dificuldade de se obter teores de di-tripeptídeos acima de 10%, de aminoácidos livres acima de 30% e de grandes peptídeos abaixo de 25% (MORATO et al., 2000., BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004., LOPES et al., 2005., MORAIS et al., 2005., SOARES et al., 2006., BIASUTTI et al., 2007; LOPES et

al., 2007; SILVA et al., 2007; LOPES et al., 2008). Apenas o processo da ultrafiltração, realizado por (LOPES et al., 2007) foi capaz de melhorar o perfil peptídico dos hidrolisados analisados, pois promoveu a retirada de peptídeos com massa molecular superior a 10.000 Da.

Tabela VII.2 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos

H	F1		F2		F3		F4	
	AR	DR	AR	DR	AR	DR	AR	DR
H1	15,42 ^{h/3}	20,47 ^{b,c,d,e/3}	32,96 ^{a/2}	28,43 ^{b,c,d,e/2}	12,03 ^{e/3}	14,97 ^{b,c,d,e/4}	39,58 ^{a,b,c/1}	36,75 ^{b,c,d/1}
H2	13,09 ^{i/4}	12 ^{i/4}	27,23 ^{c,d,e/2}	28,43 ^{b,c,d,e/2}	16,98 ^{b/3}	23,58 ^{a/3}	42,70 ^{a/1}	36,00 ^{b,c,d/1}
H3	22,61 ^{a,b/3}	19,18 ^{c,d,e/3}	30,68 ^{a,b,c/2}	30,26 ^{a,b,c,d/2}	13,55 ^{c,d,e/4}	15,50 ^{b,c,d/4}	34,15 ^{c,d/1}	35,06 ^{c,d/1}
H4	17,89 ^{e,f,g/3}	16,64 ^{f,g,h/3}	31,24 ^{a,b/2}	32,69 ^{a/1}	15,16 ^{b,c,d/3}	22,28 ^{a/2}	35,71 ^{c,d/1}	28,40 ^{e/1}
H5	15,85 ^{g,h/3}	17,98 ^{e,f,g/3}	29,95 ^{a,b,c,d,e/2}	29,18 ^{a,b,c,d,e/2}	15,52 ^{b,c,d/3}	15,24 ^{b,c,d/3}	38,68 ^{a,b,c/1}	37,60 ^{a,b,c,d/1}
H6	20,08 ^{c,d,e/2}	20,92 ^{a,b,c,d/3}	32,72 ^{a/1}	27,02 ^{c,d,e/1}	14,64 ^{b,c,d,e/3}	14,34 ^{b,c,d,e/4}	32,56 ^{d,e/1}	34,39 ^{c,d/2}
H7	23,06 ^{a/3}	23,13 ^{a/2}	29,21 ^{a,b,c,d,e/2}	26,18 ^{e/2}	12,85 ^{d,e/4}	14,56 ^{b,c,d,e/3}	34,89 ^{c,d/1}	36,14 ^{b,c,d/1}
H8	18,39 ^{d,e,f/3}	19,38 ^{c,d,e/3}	29,18 ^{a,b,c,d,e/2}	27,38 ^{b,c,d,e/2}	13,80 ^{c,d,e/4}	13,81 ^{c,d,e/4}	38,62 ^{a,b,c/1}	39,43 ^{a,b,c/1}
H9	18,47 ^{d,e,f/3}	17,56 ^{e,f,g/3}	30,37 ^{a,b,c,d/2}	28,490 ^{b,c,d,e/2}	15,95 ^{b,c/3}	17,15 ^{c,d/3}	35,22 ^{c,d/1}	36,40 ^{b,c,d/1}

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna). AR: antes da remoção; DR: depois da remoção. F1: maior que 7 resíduos de aminoácidos; F2: entre 4 e 7 resíduos; F3: di-tripeptídeos e F4: aminoácidos livres.

Entretanto, a escolha do hidrolisado com perfil peptídico mais favorável, nutricionalmente, deve ser complementada, baseando-se em estudos realizados por outros autores. Assim, segundo FRENHANI & BURINI (1999), durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di-tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores os di-

tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di-tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di-tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior. GONZÁLEZ-TELLO et al. (1994) também relatam as vantagens dos di-tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

Conclui-se que, do ponto de vista nutricional, o melhor perfil peptídico foi obtido para o hidrolisado H2, após ter sido submetido ao processo de remoção de Phe, apresentando um dos maiores teores de di-tripeptídeos (23,58 %) e de aminoácidos livres (36 %) e o menor de grandes peptídeos (12 %). Por outro lado, os perfis peptídicos mais desfavoráveis foram obtidos para os hidrolisados H6 e H7, antes e após a remoção de Phe, uma vez que estes dois hidrolisados apresentaram os menores valores para os di-tripeptídeos (14,49 % e 13,7%, em média, respectivamente), e os maiores conteúdos de grandes peptídeos (20,5 % e 23,1%, em média, respectivamente).

3.1.3 Efeito da remoção de Phe sobre o perfil peptídico

Pode-se observar na Tabela VII.2 que o processo de remoção de Phe interferiu, no perfil peptídico de 4 hidrolisados, o que representa, aproximadamente 44 % das amostras estudadas. Por outro lado, para os hidrolisados H5, H6, H7, H8 e H9, não foram observadas diferenças significativas entre os teores dos peptídeos constituintes das frações cromatográficas dos hidrolisados de farinha de trigo, antes e após a remoção de Phe. Ressalta-se que estes hidrolisados foram obtidos empregando-se as mesmas condições hidrolíticas, referentes à ordem de ação enzimática (EB + pancreatina), tempo de hidrólise (1h 30min+3h 30min), e pH (7,0).

Do ponto de vista nutricional, a remoção de Phe foi favorável para os hidrolisados H2, H3 e H4, sendo que no caso dos hidrolisados H2 e H4, o efeito benéfico foi observado, essencialmente, no que diz respeito ao aumento acentuado dos teores de di-tripeptídeos, que passaram de 16,58 % para 23,58 % e de 15,16 % para 22,28%, respectivamente. Este resultado está associado à queda nos teores de aminoácidos livres destes hidrolisados, que, por sua vez, poderia ser explicada pela maior facilidade de adsorção da Phe pelo carvão ativado quando presente na forma livre. No preparo dos hidrolisados H2 e H4 apenas a relação enzima:substrato (E:S) empregada foi a mesma, as demais condições hidrolíticas, tais como ordem de ação das enzimas, temperatura e

pH foram diferentes.

Quanto ao hidrolisado H3, a melhora do perfil peptídico pela remoção de Phe foi menos pronunciada do que a dos 2 hidrolisados citados acima, e relaciona-se, apenas, a uma pequena redução nos teores de grandes peptídeos (de 22,61 % para 19,18 %), a qual poderia estar associada a uma maior presença de Phe na fração F1, provavelmente situada na porção –C- ou –N- terminal dos peptídeos.

Dentre todos os hidrolisados analisados, apenas para o H1 a remoção de Phe não favoreceu a obtenção de um perfil peptídico nutricionalmente adequado. Além de não terem sido observadas diferenças significativas entre os teores de di-tripeptídeos e aminoácidos livres, o emprego do CA promoveu uma elevação no conteúdo de grandes peptídeos, passando de 15,42 % para 20,47 %.

Não foram encontrados na literatura relatos comparando o perfil peptídico de hidrolisados protéicos da farinha de trigo ou de outros cereais, antes e após a remoção de fenilalanina.

4 CONCLUSÃO

O processo de remoção de fenilalanina aqui empregado interferiu na distribuição de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados protéicos, tendo sido prejudicial apenas, em 1 dos 9 casos estudados. Por meio deste processo, foi possível obter um perfil peptídico nutricionalmente adequado, representado, especialmente, por um alto teor de di-tripeptídeos, em torno de 24 %.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, H.; SAKATA, K.; YOSHIOKA, Y.; MURATA, Y.; ISHIHARA, Y.; TESHIMA, R.; SAWADA, J.; MAITANI, T. Profile Analysis and Immunoglobulin e Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v.140, p.36-42, 2006.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres, *J. Sci. Food Agric.*, v.84, n. 4, p.1891-1900, 2004.
- BIASUTTI, E.A.R.; LOPES, D.C.F.; SOUZA, M.W.S.; CAMPOS, R.B.D.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C.; Obtenção de Hidrolisados do Soro de Leite com Alto Teor de Oligopeptídeos Utilizando-se Subtilisina. *J. Food Technol.*, v. 10, n.4, p. 226-232, 2007.

- BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.*, v. 3, p. 1-19, 2007.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; ORNELLAS, C.B.D.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v.23, n.1, p.17-25, 2004.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food hydrocoll.*, v. 23, p. 593-599, 2009.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- GOLOVCHENKO, N.; KATAEVA, I.A.; AKIMENKO, V.K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, v. 591, n. 4, p.121-128, 1992.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M.. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-69, 1986.
- HAMMAN, K.; CLARK, H.; MONTINI, E.; AL-DHALIMY, M.; GROMPE, M.; FINEGOLD, M.; HARDING, C.O. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol. Therapy*, v.12, n.2, p.337-344, 2005.
- ITO, S.; YOSHIOKA, S.; OGATA, I.; YAMASHITA, E.; NAGAI, S.; OKUMOTO, T.; ISHII, K.; ITO, M.; KAJI, H.; TAKAO, K.; DEGUCHI, K. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J. Chromatogr. A*, v. 1090, p. 178-183, 2005.
- JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Proc. Biochem.*, v. 42, p. 840-846, 2007.
- KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; ELLOUZ, R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrases. *Bior. Technol.*, v. 90, p. 249-254, 2003.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, p. 907 - 913, 1985.
- KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, v. 102, p. 759-763, 2007.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D.; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*, v. 32, p.499-504, 1991.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod. Proc.*, v. 86, n. 1, p. 1-6, 2008.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Br. food j.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.

- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutrition & Food Science*, v. 36 n. 2, p. 96-104, 2006.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O. ; SILVESTRE, M. P. C. . Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J. Food Technol.*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPES Jr., C.O. Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. 81p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- MALLOY-DINIZ, L.F.; CARDOSO-MARTINS, C.; CARNEIRO, K.C.; CERQUEIRA, M.M.M.; FERREIRA, A.P.A.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L. Funções executivas em crianças fenilcetonúricas. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v.62, n.2-B, p.473-479, 2004.
- MANU, B.T.; RAO, U.J.S. P. Influence of size distribution of proteins, thiol and disulfide content in whole wheat flour on rheological and chapati texture of Indian wheat varieties. *Food Chem.*, v. 110, p. 88–95, 2008.
- McCALLEY, D.V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1038, p. 77-84, 2004.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pub.*, v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.*, v. 19, n. 3, p. 381-387, 2006.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v.34, n.1, p.59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. Anal.*, v.13, n.5, p.843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochem. Microbiol.*, v.29, n.3, p. 302-306, 1993.
- NOGUEIRA, R.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, v. 1089, p. 158-169, 2005.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. *Valio Oy, Helsink, Finland, Patents US 5547687*, aug. 20. 1996.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- RERAT, A.A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- SAINT-SAUVEURA, D.; GAUTHIERA, BOUTINB, S.F.Y.; MONTONIA, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Intern. D. J.*, v. 18, p. 260–270, 2008.
- SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; STARLING, A. L. P. ; SILVESTRE, M. P. C. . Preparation of low-

- phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Technol.*, v. 2, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994b.
- SILVESTRE, M. P. C.; VIEIRA, C. R.; SILVA, M. R.; SILVA, M. C.; LOPES Jr., C. O.; SILVA, V. D. M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolyzing rice proteins aiming at phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng.*, v. 5, n. 1, 2009.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v.25, n.3, p.325-332, 2006.
- VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; ROBBEN, A.J.P.M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.
- WANG, J.; ZHAO, M.; JIANG, Y. Effects of Wheat Gluten Hydrolysate and Its Ultrafiltration Fractions on Dough Properties and Bread Quality. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 45, p. 410-414, 2007.
- WASSERSTEIN, M.P.; SNYDERMAN, S.E.; SANSARICQ, C.; BUCHSBAUM, M.S. Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria. *Mol. Genet. Metabol.*, v.87, n.3, p.272-277, 2006.
- WESLEY, I. J.; LARROQUE, O.; OSBORNE, B. G.; AZUDIN, N.; ALLEN, H.; SKERRITT, J. H. Measurement of gliadin and glutenin content of flour by NIR spectroscopy. *J. of Cereal Sci.*, v. 34, p. 125-133, 2001.
- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

Este trabalho demonstrou que é possível usar a casca de abacaxi, um resíduo agroindustrial, na obtenção de enzimas proteolíticas, contribuindo, assim, para resolver os problemas ambientais, decorrentes do seu acúmulo na natureza. Além disso, ficou evidenciado que, no caso do extrato da casca de abacaxi, para as finalidades aqui propostas, não há necessidade de precipitação, uma vez que os resultados obtidos para o extrato bruto foram superiores aos dos precipitados por 3 métodos distintos.

No estudo de validação do método quantitativo para determinação de fenilalanina (Phe) em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda, os parâmetros de desempenho analisados indicaram a adequação do método para o monitoramento e controle de teores de Phe nesta amostra.

O método enzimático de extração protéica utilizado no presente trabalho, mostrou ser altamente eficiente, tendo extraído para todas as condições testadas, mais de 77 % das proteínas da farinha de trigo.

As condições hidrolíticas testadas no intuito de otimizar a remoção de Phe pelo uso concomitante de 3 tipos de CA, permitiram reduzir em até 68 % o teor inicial deste aminoácido, sendo que as maiores porcentagens de remoção foram obtidas quando se empregou a associação sucessiva, na qual o EB atuou antes da pancreatina.

A caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos de farinha de trigo, antes e após a remoção de Phe, mostrou que as condições hidrolíticas empregadas deram origem a teores elevados de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres, e, ainda, baixos teores de grandes peptídeos, indicando um perfil de alto valor nutricional. O melhor resultado foi obtido com o emprego da associação sucessiva, na qual a ação da pancreatina precedeu a do EB. Dentre as 9 amostras analisadas, a remoção de Phe, além de não ter afetado o perfil peptídico de 5, contribuiu para melhorar o de 3 hidrolisados, sendo que o efeito benéfico deste processo mostrou estar relacionado a um aumento no teor de di-tripeptídeos ou a uma redução na quantidade de grandes peptídeos.

O emprego do extrato bruto (EB) da casca de abacaxi, em associação sucessiva com uma pancreatina comercial (P), possibilitou a redução do teor de Phe dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo, bem como a obtenção de um perfil peptídico adequado, do ponto de vista nutricional. Entretanto, a ordem de ação destas enzimas

afetou estes 2 parâmetros de forma diferenciada. Assim, se por um lado, quando a ação do EB precedeu à da Pancreatina alcançou-se uma maior remoção de Phe (H22 – Capítulo IV), a inversão desta ordem de ação enzimática deu origem ao melhor perfil peptídico (H2 – Capítulo VI).

Considerando que o objetivo principal deste trabalho consiste na obtenção de hidrolisados protéicos para serem usados na reconstituição de uma farinha de trigo com baixo teor de Phe, a escolha do hidrolisado preparado pela associação sucessiva EB+Pancreatina deve prevalecer, apesar do seu perfil peptídico ter sido inferior ao do hidrolisado obtido pela ordem inversa (P+EB). Ressalta-se, entretanto, que o perfil peptídico deste hidrolisado pode ser considerado adequado, do ponto de vista nutricional, uma vez que ficou evidenciada, em trabalhos anteriores realizados no mesmo laboratório deste estudo, a dificuldade de se obter teores de di-tripeptídeos acima de 10%, de aminoácidos livres acima de 30% e de grandes peptídeos abaixo de 25% (MORATO et al., 2000., BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004., LOPES et al., 2005., MORAIS et al., 2005; SOARES et al., 2006., BIASUTTI et al., 2007; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007., LOPES et al., 2008).

