

CLAUDIA REGINA VIEIRA

**EXTRAÇÃO, HIDRÓLISE E
REMOÇÃO DE FENILALANINA
DAS PROTEÍNAS DE FARINHA DE ARROZ**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007**

CLAUDIA REGINA VIEIRA

EXTRAÇÃO, HIDRÓLISE E REMOÇÃO DE FENILALANINA DAS PROTEÍNAS DE FARINHA DE ARROZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Marialice Pinto C. Silvestre

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

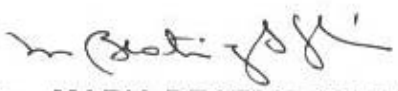
CLAUDIA REGINA VIEIRA

**“EXTRAÇÃO, HIDRÓLISE E REMOÇÃO DE FENILALANINA DAS
PROTEÍNAS DE FARINHA DE ARROZ”**

APROVADA EM 13 DE MARÇO DE 2007

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. MÔNICA RIBEIRO PIROZI


Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA


Prof. Dr. JOSÉ VIRGÍLIO COELHO


Profa. Dra. MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE
Orientadora

À minha origem... à minha continuidade...

À minha mãe, Neide Vieira...

... uma das razões do “meu ser”.

Ao meu filho, Rodrigo Vieira Pericin...

... uma das razões do “meu viver”.

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram possível a realização deste trabalho:

Em primeiro lugar, ao meu pai, Tristão Vieira, pelo apoio e incentivo nas minhas escolhas e pelos esforços ilimitados para minha formação pessoal e profissional: “Pai, obrigada por acreditar e apostar em mim, obrigada pelo seu amor e dedicação!”

Ao meu irmão, Jorge Luiz, que mesmo distante esteve ao meu lado, me apoiando em minhas decisões e me mostrando o quão valiosa é a vida: “Irmão, mesmo longe tenho você sempre dentro do meu coração; amo você!”

À minha irmã, Ana Cristina, amiga e maior incentivadora para o meu retorno ao aperfeiçoamento acadêmico: “Irmã, obrigada por tudo que tem feito por mim. Você sabe que a verdade mais verdadeira do mundo é que te amo!”

Ao meu filho Rodrigo e meus sobrinhos, Jorge Matheus, Jorge Lucas e Evelin Caroline, que mesmo distantes sempre torceram por mim, por meu sucesso e felicidade: “Crianças estarei sempre ao lado de vocês em suas decisões; amo vocês!”

À Professora Doutora Marialice Pinto Coelho Silvestre pela oportunidade de tê-la tido como minha orientadora, por sua exigência, por sua competência e por seu amor pelo que faz.

Aos membros da banca examinadora, professor Doutor José Virgílio Coelho (FAFAR/UFMG), a professora Doutora Maria Beatriz Abreu Glória (FAFAR/UFMG) e a professora Doutora Mônica Ribeiro Pirozi (DTA/UFV), pelas contribuições e as valiosas idéias finais.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição em minha formação científica.

Aos meus amigos, Alessandro, Flaviana, Julinho, Luciano, Marcelo, Isabella, Sandra, João Ricardo e Silvana, pela demonstração de carinho e amizade, pelos momentos de descontração e por terem aturado meus momentos de “chatices”.

Aos meus amigos, Thiago Lucas e Michely, pela amizade e cumplicidade, pelos ensinamentos e pelas trocas de experiências: “Obrigada por todos os momentos alegres e difíceis que compartilhamos e pela grande amizade construída e sedimentada!”

As minhas amigas, Alessandra, Bárbara, Carolina, Karen, Marinês, Norma e Vânia, que mesmo distantes me deram apoio para essa nova jornada.

Aos amigos, antigos e novos, do Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, pela contribuição na parte experimental e nas correções da dissertação.

À minha querida equipe de laboratório, Ana Luiza, Aline, Camila e Flávia, pela preciosa contribuição na parte experimental desse trabalho: “Meninas, vocês foram os meus pilares para concretização dessa etapa”.

À companheira de trabalho, Viviane, por sua ajuda incondicional, por sua simplicidade e seu carinho em todos os dias que passamos juntas: “Vivi, obrigada por tudo!”

A todos os colegas de mestrado pela troca de experiências, em especial a minha querida argentina Pamela: “Amiga, obrigada por dividir comigo não só os momentos de alegrias, como também os de tristezas”.

Aos funcionários da FAFAR/UFMG por sua contribuição direta e indireta na realização das minhas atividades acadêmicas, em especial ao “Marcão”, por sua disposição em querer ajudar e alegrar os dias mais difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao Laboratório de Pesquisa em Bromatologia da FAFAR/UFMG.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar ainda que em vão, que nada fazer. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade, viver.”

Martin Luther King (1968)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	17
1 ARROZ: ALGUNS DADOS RELEVANTES	17
1.1 Indicadores sócio-econômicos	17
1.2 Importância nutricional	18
1.3 Proteínas do arroz	20
2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS: ALGUMAS CARACTERÍSTICAS	21
2.1 Serino-proteases	24
2.2 Metalo-proteases	25
2.3 Cisteíno-proteases	25
2.4 Carboxil-proteases	25
2.5 Algumas proteases comerciais	26
2.5.1 Protamax [®] 580 L	27
2.5.2 Protamax [®] N200	27
2.5.3 Corolase [®] PP	27
2.5.4 Corolase [®] TS	28
2.5.5 Corolase [®] N e Corolase [®] 7089	29
2.5.6 Corolase [®] LAP	29
2.5.7 Corolase [®] L10	30
3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	30
4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	35
4.1 Importância	35
4.2 Fatores interferentes	37
5 REMOÇÃO DE FENILALANINA	39
5.1 Importância da remoção	39
5.2 Métodos de remoção	40
5.3 Avaliação da eficiência da remoção	41
TRABALHO EXPERIMENTAL	43
CAPÍTULO I - EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA FARINHA	
DE ARROZ	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 MATERIAL	50
2.2 MÉTODOS	50
2.2.1 Determinação da composição centesimal da matéria-prima	50
2.2.2 Extração enzimática das proteínas da farinha comercial de arroz	51

2.2.2.1	Avaliação do efeito do tipo de enzima.....	51
2.2.2.2	Avaliação do efeito da temperatura	52
2.2.2.3	Avaliação do efeito do pH.....	52
2.2.2.4	Avaliação do efeito do tratamento físico.....	52
2.2.2.5	Avaliação do efeito da relação enzima:substrato e da concentração da matéria-prima.....	52
2.2.2.6	Determinação do rendimento da extração protéica	53
2.2.3	Análise estatística	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA	53
3.2	EFEITO DOS PARÂMETROS NA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS.....	55
3.2.1	Efeito do tipo de enzima	55
3.2.2	Efeito da temperatura.....	55
3.2.3	Efeito do pH	57
3.2.4	Efeito do tratamento físico	59
3.2.5	Efeito da relação enzima:substrato e da concentração da matéria-prima .	61
3.3	EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS.....	62
4	CONCLUSÃO	64
CAPÍTULO II - OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE FARINHA DE ARROZ COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA		65
	RESUMO.....	65
	ABSTRACT	66
1	INTRODUÇÃO	67
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1	MATERIAL	69
2.2	MÉTODOS	70
2.2.1	Extração das proteínas	70
2.2.2	Preparo dos hidrolisados	70
2.2.3	Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos.....	71
2.2.4	Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina.....	72
2.2.5	Efeito de alguns parâmetros sobre a remoção de fenilalanina	73
2.2.6	Análise estatística	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1	EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA	73
3.2	EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA	77
3.2.1	Efeito do tipo de enzima	77
3.2.2	Efeito da relação enzima:substrato	78
3.2.3	Efeito da relação proteína:CA	79
3.2.4	Efeito do tipo e modo de emprego do carvão ativado	79
4	CONCLUSÃO	81
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS		82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		84
OUTRAS PUBLICAÇÕES		94

LISTA DE TABELAS

1	Composição química de arroz <i>Oryza sativa</i> L de diferentes safras.....	18
2	Conteúdo de vitaminas e minerais do arroz e seus subprodutos a 14% de umidade.....	19
3	Composição centesimal aproximada do arroz e seus subprodutos.....	19
4	Conteúdo de proteína e de aminoácidos essenciais em alguns cereais.....	20
5	Valor nutricional de proteínas de cereais.....	21
6	Características de algumas proteases comerciais.....	26
I.1	Composição química da farinha comercial de arroz	54
I.2	Efeito do tratamento físico no rendimento de extração protéica.....	59
I.3	Efeito da concentração de matéria-prima e da relação enzima:substrato no rendimento de extração protéica	61
II.1	Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de arroz e na remoção de fenilalanina.....	71
II.2	Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de farinha de arroz.	74
II.3	Efeito do tipo e do modo de emprego de carvão ativado sobre a remoção de fenilalanina.....	80

LISTA DE FIGURAS

1	Classificação das peptídeo hidrolases de acordo com o seu mecanismo catalítico.....	22
2	Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica, catalisada por uma enzima proteolítica.....	23
3	Principais etapas do trabalho experimental do capítulo 1.....	44
4	Principais etapas do trabalho experimental do capítulo 2.....	45
I.1	Efeito da temperatura no rendimento de extração protéica	56
I.2	Efeito do pH no rendimento da extração protéica.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH₄	- Tetrahidrobiopterina
CA	- Carvão ativado
E:S	- Relação enzima e substrato
EDS	- Espectrofotometria derivada segunda
EPFA	- Extrato protéico de farinha de arroz
FAO	- Food and Agriculture Organization
FCC	- Food Chemical Codex
His	- Histidina
HPA	- Hiperfenilalaninemia
HPFA	- Hidrolisado protéico de farinha de arroz
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
Ile	- Isoleucina
Leu	- Leucina
Lys	- Lisina
Met	- Metionina
NPU	- Utilização Protéica Líquida
PAH	- Fenilalanina hidroxilase
Phe	- Fenilalanina
PKU	- Fenilcetonúria
REP	- Rendimento de extração protéica
Tyr	- Tirosina
Thr	- Treonina
Trp	- Triptofano
Val	- Valina

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de extração e hidrólise protéica, e da remoção de fenilalanina (Phe), utilizando-se farinha comercial de arroz como matéria-prima, buscando fornecer alternativas para o mercado no desenvolvimento de formulações com baixo teor de Phe, para ser utilizada na dieta de fenilcetonúricos. Inicialmente, foram estudadas diferentes condições de extração enzimática das proteínas da farinha de arroz, com o objetivo de otimizar o rendimento de extração protéica (REP). Todos os parâmetros empregados (tipo de enzima; temperatura; pH; tratamento físico da amostra; relação enzima:substrato (E:S) e concentração inicial de matéria-prima) influenciaram no REP, sendo que o melhor resultado foi obtido quando se empregou a concentração inicial de matéria prima a 1:10 (p/v), sem tratamento físico, pH 10,5, com uma protease alcalina na relação E:S de 10:100, a 50 °C; tendo atingido um REP de 63,4%. Posteriormente, o extrato protéico obtido, sob estas condições, foi hidrolisado utilizando-se diversas condições de hidrólise, e o carvão ativado (CA) foi empregado como meio adsorvente na remoção de Phe. Foram, então, avaliados o tipo de enzima, relação E:S, relação proteína:CA, tipo e modo de emprego do CA. Após passagem dos hidrolisados por coluna de CA, a Phe foi dosada por espectrofotometria derivada segunda (EDS). O emprego da papaína na relação E:S de 4:100 e o uso de três tipos de CA na relação proteína:CA de 1:88 mostraram ser eficientes, obtendo-se hidrolisado com teor final de Phe (82,5 mg/100 g de hidrolisado) dentro do limite máximo permitido pela legislação brasileira para produtos destinados à fenilcetonúricos.

Palavras-chave: Arroz; enzimas; extração; fenilalanina; hidrolisados; proteínas.

ABSTRACT

EXTRACTION, HYDROLYSIS AND PHENYLALANINE REMOVAL FROM PROTEINS OF RICE FLOUR. The aim of this work was to use rice flour in the development of a new food with low phenylalanine (Phe), to be used in phenylketonurics' diet. Initially, different conditions of enzymatic extraction of proteins were compared, in order to optimize protein extraction yield (PEY). All the parameters investigated (enzyme type; temperature; pH; physical treatment of the sample; enzyme:substrate ratio (E:S) and initial concentration of raw material) affected PEY. The best result (PEY = 63.4%) was achieved for the initial concentration of raw material of 1:10 (w/v), with no physical treatment, pH 10.5, using an alkaline protease with E:S of 10:100, at 50 °C. Then, the protein extract obtained under these conditions was hydrolysed using varying hydrolysis conditions and activated carbon (AC) as adsorbent for Phe removal. Some parameters such as enzyme type, E:S ratio, protein:AC ratio, type and mode of using of AC were evaluated. After passing the hydrolysates through the AC column, Phe was evaluated by second derivative spectrophotometry (SDS). The use of papain in a E:S of 4:100 and of the three types of AC in a protein:AC ratio of 1:88 showed to be efficient, and produced a hydrolysate with final Phe content (82.5 mg/100 g) which is below the maximum limit stated by the Brazilian legislation for products destined to phenylketonurics.

Key words: Rice; enzymes; extraction; hydrolysates; phenylalanine; protein.

INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte da Linha de Pesquisa “Propriedades nutricionais e funcionais de proteínas alimentares”, criada em 1994 pela coordenadora do presente estudo, cuja meta final consiste na produção de suplementos alimentares e de alimentos para fins dietéticos especiais, com diversas aplicações relevantes para as áreas de nutrição e saúde (alimentação de idosos e crianças, prevenção e/ou tratamento de doenças, etc.), bem como, a obtenção de ingredientes ou agentes funcionais (emulsionantes e outros) para alimentos e medicamentos. Evidencia-se, dessa forma, o seu caráter multidisciplinar e a sua importância para as indústrias alimentícias e farmacêuticas.

Com relação às propriedades nutricionais das proteínas, vários trabalhos têm sido desenvolvidos, partindo-se de proteínas de origem animal e vegetal. Assim, utilizando-se diferentes enzimas e condições hidrolíticas, foram preparados, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, diversos hidrolisados protéicos com elevado valor nutritivo, ricos em di- e tripeptídeos (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2001, 2004; BARBOSA et al., 2004; DE MARCO et al., 2005; LOPES et al., 2005a; MORAIS et al., 2002, 2005; SILVA et al., 2005b; SOARES et al., 2004b, 2006; DELVIVO et al., 2006; BIZZOTTO et al., 2006a, b).

Após ter adquirido o domínio da tecnologia de preparo e análise de hidrolisados protéicos, tornou-se importante dar sequência a esta pesquisa, através do desenvolvimento de formulações que apresentassem finalidade específica e aplicação industrial. Neste caso, a escolha voltou-se para a dieta de fenilcetonúricos, dada a importância social e econômica deste problema de saúde no Brasil.

A fenilcetonúria (PKU) é um dos distúrbios metabólicos congênitos mais comuns, caracterizando-se pela deficiência ou ausência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Esta enzima é sintetizada no fígado e catalisa a conversão de Phe em tirosina (Tyr). Os fenilcetonúricos parecem normais ao nascer, mas se não forem tratados, desenvolvem grave retardamento mental (MIRA & MARQUEZ, 2000; MALLOY-DINIZ et al., 2004, HAMMAN et al., 2005; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; WASSERSTEIN et al., 2006).

A dieta para fenilcetonúricos se baseia no controle da ingestão de alimentos que contêm Phe, o que implica em uma ingestão de fontes protéicas bastante limitadas (MIRA & MARQUEZ, 2000). A dieta deve ser complementada por substitutos protéicos, isentos ou pobres em Phe, e suplementada com Tyr e outros aminoácidos, além de vitaminas e minerais (STRYER, 1996; KANUFRE et al., 2001).

Inicialmente, pensando em atender as necessidades nutricionais de fenilcetonúricos durante o primeiro ano de vida, a matéria-prima escolhida foi um derivado do leite, dada a importância deste alimento nesta fase do desenvolvimento da criança (SOARES et al., 2004a, 2006; DE MARCO et al., 2005; DELVIVO et al., 2005, 2006; LOPES et al., 2005b, 2006, SILVA et al., 2005a, b).

Considerando a importância de prosseguir com o tratamento de fenilcetonúricos durante toda a vida, como demonstrado na portaria 847/02 (BRASIL, 2002), torna-se necessária a pesquisa de outras fontes protéicas para compor formulações dietéticas, visando diversificar a oferta de alimentos deste grupo, até então, muito restrita.

O arroz é a cultura cereal mais importante em países em desenvolvimento, e o alimento base de cerca de 2/3 da população mundial. Apesar do teor de proteína do arroz ser o menor dentre os cereais (cerca de 7%), o valor nutricional desta proteína é superior a de outros grãos, possuindo melhor digestibilidade e maiores teores de lisina, aminoácido limitante nos cereais (JULIANO, 1993).

Além disso, levando-se em conta a posição relevante que ocupa o arroz na dieta do brasileiro, seria de grande interesse utilizá-lo como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de fenilcetonúricos, atendendo, assim, a grande demanda que vai desde a infância até a fase adulta.

Em trabalho anterior, desenvolvido no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, empregou-se o arroz em grão como matéria-prima, extraindo suas proteínas por processo químico e removendo a Phe de seu hidrolisado utilizando apenas um tipo de CA (BIZZOTTO et al., 2006a, b).

Dando continuidade a esse estudo, o presente trabalho teve como objetivos extrair enzimaticamente as proteínas da farinha comercial de arroz e o preparo de hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe. As principais diferenças entre o atual estudo e o anterior estão relacionados ao tipo de matéria-prima e método de extração empregados, uma vez que procurou-se um produto comercial de uso industrial e um método que atingisse as exigências do consumidor, hoje muito preocupados com a segurança alimentar.

REVISÃO DE LITERATURA

1 ARROZ: ALGUNS DADOS RELEVANTES

1.1 Indicadores sócio-econômicos

O arroz é um dos mais importantes cereais na nutrição humana, consumido por 2/3 da população mundial (STORCK et al., 2005). São conhecidas cerca de 20 espécies do gênero *Oryza*, mas quase todo o arroz cultivado no mundo é da espécie *Oryza sativa* L. Devido ao seu longo histórico de cultivo e seleção em diversos ambientes, *O. sativa* adquiriu uma ampla faixa de adaptabilidade e tolerância, podendo ser cultivado em vários regimes de água/solo, que variam de terras profundamente inundadas a rampas montanhosas secas (JULIANO, 1993).

Na produção mundial de arroz, o Brasil se destaca como o principal produtor entre os países ocidentais, com 11,5 milhões de toneladas na safra 2006/2007 (IBGE, 2006). Apesar das reduções de produção em algumas safras nos últimos anos, devido a adversidades climáticas, a produção brasileira de arroz vem apresentando uma tendência de crescimento, em função, principalmente, do constante incremento de produtividade (BARATA, 2005).

O arroz é considerado pela FAO (Food and Agriculture Organization) como o alimento mais importante para a segurança alimentar do mundo. Além de fornecer um excelente balanceamento nutricional, é uma cultura extremamente rústica, podendo ser considerada a espécie de maior potencial de aumento de produção para o combate da fome no mundo.

Segundo dados da FAO, o consumo brasileiro de arroz é de aproximadamente 52,5 quilogramas por habitante por ano (kg/hab/ano). Apesar de ser inferior ao consumo mundial médio por habitante (84,8 kg/hab/ano), este valor é considerado alto se comparado com o consumo *per capita* dos países desenvolvidos (16,7 kg/hab/ano) (FAO, 2004).

O consumo alimentar do arroz ocorre basicamente na forma de grãos inteiros, sofrendo pequena transformação na agroindústria. No Brasil, este cereal é consumido principalmente na forma de arroz polido, parboilizado e integral, porém existe uma variação maior de formas em que o arroz também é consumido no Brasil e no mundo.

Esta diversidade de formas decorre principalmente em função da cultivar produzida ou do processo de beneficiamento (BARATA, 2005).

1.2 Importância nutricional

Apesar de ser considerado um alimento importante na alimentação humana, o arroz ainda é pouco reconhecido pelas suas características funcionais. Rico em carboidratos, este cereal, na sua forma natural, é um alimento essencialmente energético, mas pode ser também uma importante fonte de proteínas, sais minerais (principalmente fósforo, ferro e cálcio) e vitaminas do complexo B, como a B1 – tiamina, B2 – riboflavina e B3 – niacina (BARATA, 2005). Segundo a FAO (2004), o arroz fornece 20% da energia e 15% das proteínas necessárias ao homem e se destaca pela sua fácil digestão.

Alguns estudos mostraram a existência de fatores que podem afetar a composição e valor nutricional deste grão, como variação de fenótipo, condições edafoclimáticas, processamento e armazenamento (SUJATHA et al., 2004). STORCK et al. (2005) avaliaram a composição química de cultivares de arroz *Oryza sativa* L. plantados no Brasil em duas safras diferentes, 2001/2002 e 2002/2003, obtendo os resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química de arroz *Oryza sativa* L de diferentes safras.

	Safra 2001/2002 (g/100 g)	Safra 2002/2003 (g/100 g)
Amilose	24,60 ^a ±3,70	22,70 ^a ±2,91
Cinzas	0,46 ^a ±0,09	0,30 ^b ±0,03
Lipídios	0,34 ^a ±0,12	0,36 ^a ±0,10
Fibra Total	2,50 ^a ±0,28	2,87 ^a ±0,53
Proteína Bruta	8,37 ^a ±0,85	8,94 ^a ±1,55
Amido Digestível	85,10 ^a ±0,96	84,50 ^a ±1,83
Fibra Insolúvel	1,07 ^a ±0,29	1,05 ^a ±0,36
Fibra Solúvel	1,44 ^a ±0,26	1,82 ^a ±0,53

Os resultados estão expressos em matéria seca. Diferentes letras entre as médias das safras mostram diferença significativa (p<0,05) pelo método de Tukey (n=9); Fonte: STORCK et al. (2005).

Pode-se observar que houve diferença significativa nos teores de cinzas de uma safra para outra, enquanto que para os outros componentes, os valores foram estatisticamente semelhantes. Segundo os autores, a diminuição no teor de cinzas da safra 2001/2002 para o de 2002/2003 poderia ser atribuída a outros fatores como tipo de terra, comportamento de plantio e qualidade de água que não eram controlados durante o período, uma vez que as condições climáticas eram semelhantes entre os anos.

Outro fator que pode modificar a composição nutricional do arroz está relacionado às diferentes formas de processamento que o grão passa, antes de ser oferecido ao consumidor. As vitaminas e sais minerais deste cereal estão concentrados na sua película e germe, e a remoção dessas camadas durante o processo de beneficiamento causa uma redução acentuada de gordura, minerais e fibras (Tabelas 2 e 3) (JULIANO, 1993).

Tabela 2 – Conteúdo de vitaminas e minerais do arroz e seus subprodutos a 14% de umidade

Arroz	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)	Cálcio (mg)	Fósforo (g)
Integral ¹	0,26	0,09	4,18	8,0	0,25
Polido ¹	0,16	0,04	1,12	4,0	0,11
Farelo ²	1,80	0,30	38,30	85,0	1,80
Casca ²	0,15	0,06	2,90	95,0	0,05
Farinha ²	0,07	0,04	1,85	20,0	0,12

Fonte: ¹ TACO, 2006; ² JULIANO, 1993

Tabela 3 – Composição centesimal aproximada do arroz e seus subprodutos

	Integral ¹ (g/100 g)	Polido ¹ (g/100 g)	Farelo ² (g/100 g)	Casca ² (g/100 g)	Farinha ³ (g/100 g)
Umidade	12,2	13,2	14,0	14,0	11,6
Proteínas	7,3	7,2	13,1	2,4	6,9
Lipídios	1,9	0,3	17,4	0,6	1,1
Cinzas	1,2	0,5	8,2	17,5	0,7
Fibra Alimentar	4,8	1,6	26,5	28,0	0,5
Carboidratos	77,4	78,8	47,3	65,5	79,7
Energia (Kcal)	360	358	437	298	354

Fonte: ¹ TACO, 2006; ² JULIANO, 1993; ³ USP, 2005.

1.3 Proteínas do arroz

As proteínas dos cereais podem ser classificadas, de acordo com a solubilidade (extratibilidade) em: albuminas, solúveis em água deionizada; globulinas, solúveis em soluções salinas diluídas; prolaminas, solúveis em solução alcoólicas a 70-80%; glutelinas, solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas (SGARBIERI, 1996).

O grão de arroz é composto de pericarpo, camadas de aleurona, endosperma e embrião. Pericarpo, camadas de aleurona e embrião contém maior proporção de albumina e globulina que o endosperma. A proteína do endosperma consiste de 5% de albuminas, 10% de globulinas, de 5 a 8% de prolaminas e de 77 a 80% de glutelinas (JULIANO, 1993).

A glutelina do arroz consiste em três subunidades ácidas (ou α -subunidades) de 30 a 39 KDa e duas subunidades básicas (ou β -subunidades) de 19 a 25 KDa (JULIANO, 1993). Os dois tipos de subunidades são formados pela clivagem de um polipeptídeo precursor de 57 KDa (SUGIMOTO et al., 1986). A prolamina é formada, principalmente, por subunidades de 13 KDa, somadas a uma menor quantidade de subunidades de 10 e 16 KDa (HIBINO et al., 1989).

O teor de proteína no arroz é um dos menores, quando comparado a de outros cereais. Entretanto, a composição de aminoácidos das proteínas do arroz é significativamente mais balanceada e o conteúdo de lisina é relativamente mais elevado (WRIGLEY & BEKES, 2001) como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Conteúdo de proteína e de aminoácidos essenciais em alguns cereais

Cereal	Proteína (g/100 g)	Aminoácidos Essenciais (mg/100 g) ¹								
		Lys	Ile	Leu	Met	Phe	Thr	Trp	Val	His
Arroz Polido ²	7,2	258	308	589	168	381	255	83	435	168
Trigo ³	12,2	179	204	417	94	435	183	68	276	143
Milho ³	9,5	167	230	783	120	305	225	44	303	170
Sorgo ³	10,1	126	245	832	87	306	189	87	313	134
Centeio ³	11,0	212	219	385	91	276	209	46	297	138
Aveia ³	13,0	232	236	454	105	313	207	79	319	131

¹ Lys: Lisina; Ile: Isolceucina; Leu: Leucina; Met: Metionina; Phe: Fenilalanina; Thr: Treonina; Trp: Triptofano; Val: Valina; His: Histidina; ² USDA (2006); ³ FAO (1981).

As proteínas do arroz têm a maior digestibilidade entre os cereais (Tabela 5), provavelmente devido, em parte, ao menor conteúdo de fibras e taninos deste grão. Desta forma, a Utilização Protéica Líquida (NPU) da proteína do arroz é maior que a dos demais cereais, mesmo as proteínas do centeio possuem maior valor biológico (JULIANO, 1993).

Tabela 5 - Valor nutricional de proteínas de cereais

Alimento	Digestibilidade de N (%)	Valor biológico (%)	NPU (%)	Energia digerível	
				(kcal/g)	(% do total)
Arroz integral	99,7	74,0	73,8	3,70	96,3
Trigo	96,0	55,0	53,0	3,24	86,4
Milho	95,0	61,0	58,0	3,21	81,0
Sorgo	84,8	59,2	50,0	3,07	79,9
Centeio	77,0	77,7	59,0	3,18	85,0
Aveia	84,1	70,4	59,1	2,77	70,6

Fonte: JULIANO (1993).

2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS: ALGUMAS CARACTERÍSTICAS

De acordo com o sistema de nomenclatura e classificação de enzimas, adotado por acordo internacional (*Enzyme Commission*, EC), cada enzima recebe um número classificatório (número EC) composto por quatro dígitos separados por pontos (IUBMB, 1992).

O primeiro dígito indica uma das seis classes em que são divididas as enzimas, de acordo com as reações que catalisam: 1. Oxirredutases (reações de oxido-redução), 2. Transferases (reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc.), 3. Hidrolases (reações de hidrólise de ligação covalente), 4. Liases (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou desfazendo ligações duplas), 5. Isomerases (reações de isomerização), 6. Ligases (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP). O segundo e terceiro dígitos (subclasse e sub-subclasse, respectivamente) indicam diferentes situações, dependendo da classe em que se encontram. O quarto dígito é o número de série da enzima em sua sub-subclasse (REED, 1975).

Segundo o sistema internacional de nomenclatura, as enzimas proteolíticas pertencem à subclasse 4 da classe 3 (EC 3.4 Peptídeo hidrolase), conforme Figura 1. As proteases são subdivididas em sub-subclasses com base nos seus mecanismos catalíticos; as enzimas, em cada sub-subclasse, são distinguidas com base em sua especificidade pelo substrato (ANTONOV, 1993; BEYNON & BOND, 2001).

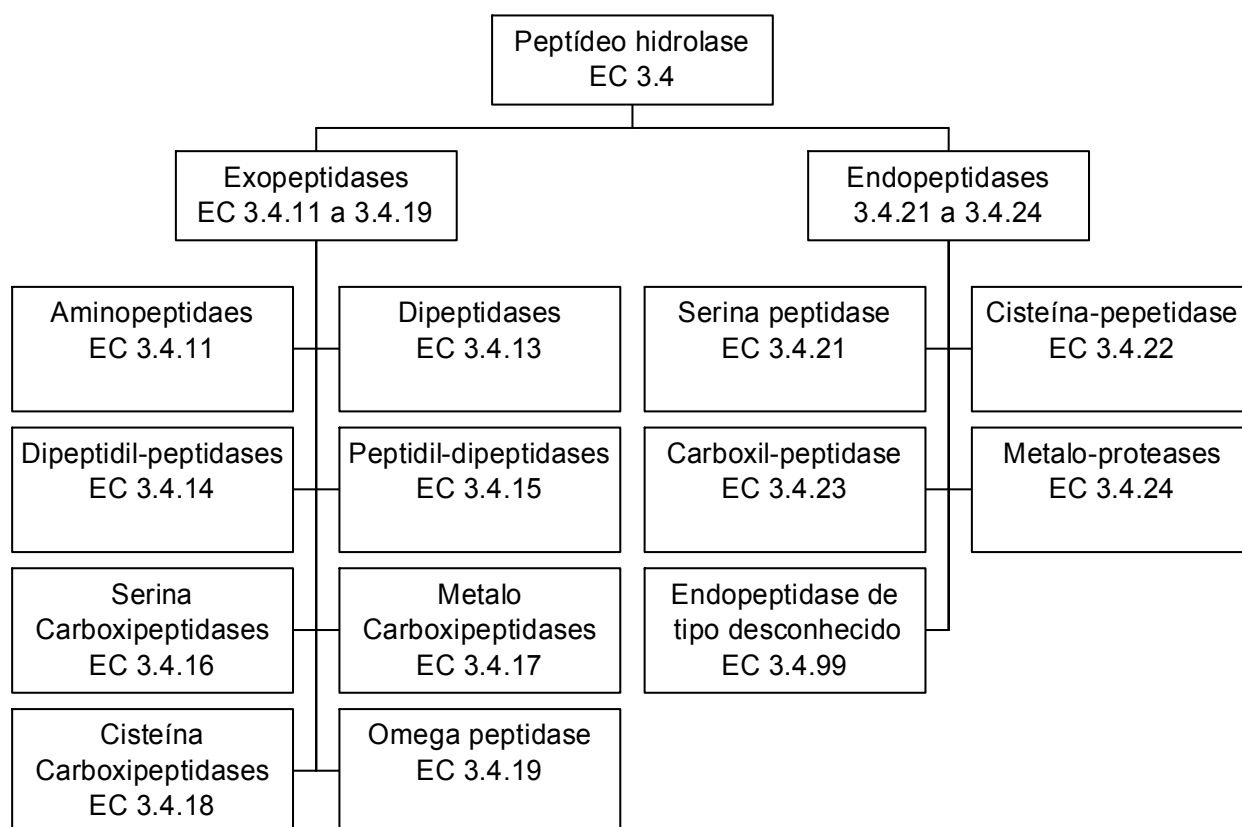


Figura 1 – Classificação das peptídeo hidrolases de acordo com o seu mecanismo catalítico. Cada enzima, dentro de um sub-subgrupo, é diferenciada com base em sua especificidade pelo substrato (BEYNON & BOND, 2001).

As enzimas proteolíticas constituem um grupo grande e complexo de enzimas, as quais diferem entre si por suas especificidades pelo substrato, sítio ativo e mecanismo catalítico, perfis de estabilidade e atividade quanto à temperatura e ao pH (BEYNON & BOND, 2001).

As proteases podem ser produzidas a partir de plantas, animais ou microorganismos. Os microorganismos proteolíticos parecem ser as mais promissoras fontes de proteases, por produzirem uma maior variedade de enzimas específicas, em comparação às plantas ou aos animais (DINIZ & MARTIN, 1999).

As proteases podem ser usadas para preparar peptídeos com características que dependem do tipo de proteína hidrolisada, enzima utilizada e condições de hidrólise. Os produtos são distinguidos da proteína original principalmente pelo pequeno tamanho de suas moléculas. Peptídeos podem ser, portanto, muito diferentes das proteínas e podem possuir novas propriedades nutricionais, funcionais ou biológicas (KONG et al., 2007).

As primeiras enzimas proteolíticas utilizadas na indústria alimentícia foram as proteases pancreáticas de origem animal, no entanto, as de origem bacteriana ou fúngica tem adquirido maior importância. Ultimamente, enzimas proteolíticas de organismos marinhos têm sido utilizadas como auxiliares no processamento. Outros possíveis usos para essas enzimas na indústria de alimentos são baseadas em suas propriedades inerentes, como a elevada atividade molecular em baixas temperaturas, a habilidade para catalisar hidrólises de proteínas nativas e a atenuação da desnaturação pelo calor, além das enzimas proteolíticas de animais marinhos serem preferidas para aplicações específicas, em relação às fontes convencionais microbiana, vegetal e animal (FURLAN & OETTERER, 2002).

De acordo com WHITAKER (1994), é conveniente dividir as enzimas proteolíticas em quatro grupos, com base no seu mecanismo catalítico de ação. Os nomes dos grupos servem para indicar um dos importantes grupos catalíticos do sítio ativo. Os quatro grupos são: serino-proteases, cisteíno-proteases, metalo-proteases e carboxil-proteases.

2.1 Serino-proteases

Estão incluídas neste grupo a quimotripsina (EC 3.4.21.1 e 3.4.21.2), a tripsina (EC 3.4.21.4), a subtilisina (EC 3.4.21.14) dentre outras, sendo todas endopeptidases, exibindo atividade catalítica na faixa de pH de 7 a 10. Elas diferenciam entre si na seqüência de aminoácidos e em suas estruturas tridimensionais, porém apresentam em comum geometria do sítio ativo e mecanismo catalítico. Todas possuem ácido aspártico, histidina e serina no sítio ativo (WHITAKER, 1994; BEYNON & BOND, 2001).

As serino-proteases podem ser obtidas a partir do pâncreas de animais, como por exemplo, a tripsina e quimotripsina, ou a partir de bactérias do gênero *Bacillus* (*amyloliquefaciens*, *licheniformis*, *subtilis*, dentre outros), como por exemplo, a subtilisina (BOYER, 1971; BEYNON & BOND, 2001).

2.2 Metallo-proteases

Neste grupo estão as exopeptidases, encontradas nos tecidos de animais superiores e sendo todas inibidas por agentes quelantes, por conterem um íon metálico, no sítio ativo, participante do mecanismo catalítico. São também encontradas em bactérias e bolores e são mais ativas em pH neutro. Como exopeptidases que necessitam de Zn^{2+} tem-se a carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1), a carboxipeptidase B (EC 3.4.17.2), a glicil-glicina dipeptidase (EC 3.4.13.11), a amino-acil-histidina hidrolase (EC 3.4.13.3) e a citosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1). Como aquelas que necessitam de Mn^{2+} tem-se a polidase (EC 3.4.13.9) e a iminopeptidase (EC 3.4.13.8-9), com especificidade para resíduos de prolina carboxi- e amino-terminal, respectivamente (BOYER, 1971; WHITAKER, 1994). A termolisina (EC 3.4.24.4) é uma metallo-endopeptidase com sítio ativo, especificidade e mecanismo catalítico muito similar aos da carboxipeptidase A.

2.3 Cisteíno-proteases

Inclui-se neste grupo a papaína, a ficina, a bromelina e a enzima microbiana *Streptococcus* protease. A similaridade destas enzimas deve-se ao fato de todas serem inibidas por reagentes sulfidrílicos e terem a mesma seqüência de aminoácidos ao redor dos resíduos de cistina e histidina do sítio ativo.

A papaína (obtida do mamão), a ficina (do figo) e a bromelina (do abacaxi) têm em comum o fato de serem muito estáveis a temperaturas de 60 a 80 °C em pH neutro. A papaína e a ficina hidrolisam com igual eficiência substratos contendo resíduos de lisina, arginina e glicina (WHITAKER, 1994).

2.4 Carboxil-proteases

As carboxil-proteases são representadas pelas enzimas do estômago de animais superiores, como por exemplo, a pepsina e a renina, mas também podem ser encontradas em fungos, tais como *Endothia parasítica*, *Mucor pusillus* e *M. miehei*, sendo boas substitutas da renina.

As enzimas deste grupo possuem atividade ótima em pH ácido (entre 2 e 4), utilizam o grupo carboxílico de dois resíduos de ácido aspártico do sítio ativo no mecanismo catalítico e são todas inibidas por pepstatina (BOYER, 1971; WHITAKER, 1994). A enzima mais estudada deste grupo é a pepsina e a mais importante comercialmente é a renina, pois é utilizada na produção de queijo (WHITAKER, 1994).

2.5 Algumas proteases comerciais

Na Tabela 6 são apresentadas algumas proteases comerciais de grau alimentício disponíveis no mercado. Esses preparados, geralmente, são misturas de algumas enzimas e normalmente são vendidas no estado líquido ou em pó¹.

Tabela 6 – Características de algumas proteases comerciais

Grupo	Nome comercial	Origem	Atividade enzimática	Estabilidade	
				pH	T (°C)
Serino Protease	Protamax® 580 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	580 KDU/g	7<pH<10	25<T<75
Serino Protease	Protamax® N200	<i>Bacillus subtilis</i>	200 NU/g	4,5<pH<7,5	50<T<55
Serino e Metaló protease	Corolase® PP	Tripsina Quimotripsina Carboxipeptidase A Carboxipeptidase B	200.000 LVE/g	7<pH<9	45<T<55
Metaló protease	Corolase® TS	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	220 UHB/g	7<pH<8	60<T<80
Metaló protease	Corolase® N	<i>Bacillus subtilis</i>	600 UHB/g	6,5<pH<7,5	45<T<55
Metaló protease	Corolase® 7089	<i>Bacillus subtilis</i>	840 UHB/g	6,5<pH<7,5	45<T<55
Metaló protease	Corolase® LAP	<i>Aspergillus sojæ</i>	350 LAP/g	6<pH<9	55<T<70
Cisteíno protease	Corolase® L10	<i>Carica papaya</i>	850 UHB/g	3<pH<9	50<T<70

Fontes: PROZYN (2005); AB ENZYMES (2001, 2002, 2003).

¹ PROZYN. Especificações técnicas de enzimas. s.n., 2005. 2p; AB ENZYMES. Corolase® PP, Corolase® 7089, Corolase® LAP, Corolase® N: *Description and Specification*. Rev. Nr. 02. 2001, 8p; AB ENZYMES. Corolase® TS: *Description and Specification*. Rev. Nr. 00. 2002, 2p; AB ENZYMES. Corolase® L 10: *Description and Specification*. Rev. Nr. 03. 2003, 2p.

2.5.1 Protemax® 580 L

Protemax® 580L é uma preparação enzimática comercial, produzida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil) e tem sido largamente utilizada na indústria de gelatinas, em processos de hidrólise e extração, na remoção de colágeno e no processamento de *pet food*. A Protemax® 580L é eficiente na hidrólise de diferentes tipos de proteínas (gelatina, caseína, hemoglobina, de peixes, etc.) e sua eficiência é maior em substratos protéicos previamente desnaturados.

Segundo a Prozyn, a Protemax® 580L, classificada como uma subtilisina (EC 3.4.21.14), é uma serino-protease, caracterizada pelo seu desempenho a altas temperaturas e moderada alcalinidade (Tabela 6), e é produzida por fermentação submersa de um microorganismo não patogênico, o *Bacillus licheniformis*, com especificações de pureza recomendadas para as enzimas de grau alimentício definidas pela FAO e pela Food Chemical Codex (FCC). A preparação enzimática comercial está disponível na forma líquida e apresenta coloração marrom, com densidade igual a 1,1 g/mL (PROZYN, 2005).

2.5.2 Protemax® N200

Protemax® N200 é um produto constituído à base de proteases neutras derivadas de uma cepa selecionada do *Bacillus subtilis* produzido pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). A Protemax® N200 é capaz de hidrolisar diferentes fontes protéicas em peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos.

Segundo a Prozyn, a Protemax® N200 é classificada como uma subtilisina (EC 3.4.21.62), sendo uma serino-protease. Apresenta benefícios tais como, alta velocidade e especificidade para degradar proteínas, além de possuir alta solubilidade. O produto é comercializado sob a forma de um pó fino, de cor branca e totalmente solúvel em água (PROZYN, 2005).

2.5.3 Corolase® PP

Corolase® PP é um preparado enzimático proteolítico, obtido de pâncreas suíno composto por várias enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, amino e

carboxipeptidase) e produzido pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil). O produto é comercializado sob a forma sólida, apresenta coloração bege e cheiro característico (AB ENZYMES, 2001) As proteases pancreáticas são divididas em serino-proteases (tripsina e quimotripsina) e metalo-proteases (carboxipeptidases A e B) (HINSBERGER & SANDHU, 2004).

A tripsina catalisa apenas a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonila (-CO) é fornecido pela arginina ou lisina. A quimotripsina hidrolisa ligações peptídicas em que o referido grupo é fornecido pela Phe, Tyr e Trp (SGARBIERI, 1996; HINSBERGER & SANDHU, 2004).

A carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) é uma exopeptidase produzida no pâncreas de animais superiores como um composto de três cadeias polipeptídicas, que, por ativação com tripsina, produz a enzima com uma única cadeia polipeptídica, contendo 307 resíduos de aminoácidos. O pâncreas produz também outro zimogênio, que por ativação produz carboxipeptidase B. As duas enzimas são similares nos detalhes gerais do mecanismo catalítico: ambas requerem que o grupo carboxílico do resíduo carboxi-terminal esteja livre e ambas possuam Zn^{2+} no sítio ativo, essencial para a atividade catalítica. Entretanto, possuem especificidades bem diferentes: carboxipeptidase B hidrolisa ligações peptídicas contendo arginina e lisina carboxi-terminais, enquanto que a carboxipeptidase A requer que os resíduos carboxi-terminais não sejam arginina, lisina ou prolina (WHITAKER, 1994).

2.5.4 Corolase[®] TS

Corolase[®] TS é um preparado enzimático proteolítico, contendo exclusivamente atividade de endopeptidase, produzido pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil). Segundo dados do fabricante, a Corolase[®] TS é um produto derivado do *Bacillus stearothermophilus* (EC 3.4.24.28) sendo uma metalo-protease.

Apresenta ótimo desempenho catalítico em pH de neutro a ligeiramente alcalino (Tabela 6). Tem como vantagem ser resistente a altas temperaturas, apresentando temperatura ótima de 80 °C. A Corolase[®] TS é comercializada sob a forma líquida, apresentando coloração marrom clara e cheiro característico, com densidade igual a 1,15 g/mL (AB ENZYMES, 2002).

2.5.5 Corolase[®] N e Corolase[®] 7089

Corolase[®] N e Corolase[®] 7089 são preparações enzimáticas comerciais, produzidas pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil) e são usadas na hidrólise de proteínas de diferentes fontes. Segundo dados do fabricante, alguns exemplos de aplicação são a hidrólise das proteínas de glúten de trigo, gelatina, peixe e leite (AB ENZYMES, 2001).

Trata-se de metalo-proteases, contendo exclusivamente ação de endopeptidase. A Corolase[®] N e Corolase[®] 7089 são produzidas a partir do *Bacillus subtilis* (EC 3.4.24.28), apresentam atividade de atuação ótima em pH neutro com temperatura em 55 °C (Tabela 6).

As duas enzimas diferenciam-se entre si pela atividade enzimática e pela forma de comercialização. A Corolase[®] N tem atividade catalítica igual a 600 UHB/g e é comercializada na forma de um pó de coloração bege com cheiro característico. A Corolase[®] 7089, por sua vez, tem atividade mais elevada, igual a 840 UHB/g e é comercializada na forma de um líquido marrom claro com cheiro característico, com densidade igual a 1,15 g/mL (AB ENZYMES, 2001).

2.5.6 Corolase[®] LAP

Corolase[®] LAP é um preparado enzimático proteolítico, contendo exclusivamente atividade de exopeptidase, produzido pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil). Segundo dados do fabricante, a Corolase[®] LAP é um produto derivado do *Aspergillus sojae* (EC 3.4.11.1) sendo, portanto, uma metalo-protease.

Segundo a AB ENZYMES (2001), a Corolase[®] LAP é preferencialmente utilizada em conjunto com outras proteases para hidrólise de proteínas de origem animal e vegetal, como por exemplo caseína, proteína de soro de leite, soja, etc. Apresenta atividade de atuação ótima na faixa de pH entre 6 e 9 e temperatura de 50 a 70 °C (Tabela 6) . O produto é comercializado na forma de um líquido marrom claro com cheiro característico, com densidade igual a 1,2 g/mL.

2.5.7 Corolase® L10

Corolase® L10 é um preparado enzimático obtido a partir da *Papaya carica*, produzido pela AB ENZYMES, sendo, portanto, uma papaína. Possibilita uma hidrólise protéica de alta eficiência e baixo custo. Possui a vantagem de ter uma ampla faixa de pH de atuação (Tabela 6), adaptando-se aos mais diversos processos.

Segundo a AB ENZYMES (2003), a Corolase® L10 é uma cisteíno-protease (EC 3.4.22.2) e apresenta benefícios, tais como alta velocidade e especificidade para degradar proteínas e elevada solubilidade. O produto é comercializado sob a forma de um líquido amarelo claro com cheiro característico, com densidade igual a 1,2 g/mL.

3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Segundo JULIANO (1993), 77 a 80% das proteínas do arroz compõem a fração glutelina, solúvel em álcali, mas insolúvel em água. Desta forma, em alguns dos trabalhos encontrados na literatura utilizou-se a extração alcalina na obtenção de concentrados protéicos a partir de arroz ou de seus subprodutos (SAUNDERS et al., 1975; CONNOR et al., 1976; LINDSAY et al., 1977). Este tipo de procedimento foi igualmente desenvolvido no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, para extrair as proteínas do arroz em grãos (BIZZOTTO et al., 2006a, b). Entretanto, os métodos de extração química utilizam condições muito alcalinas, que podem causar reações secundárias indesejáveis e potencial toxicidade, tal como a formação de lisinoalanina, acarretando perda do valor nutritivo das proteínas (WANG et al., 1999).

Geralmente, concentrados protéicos são obtidos a partir de cereais por processamento úmido (SAUNDERS et al., 1975; CONNOR et al., 1976; LINDSAY et al., 1977; EUBER et al., 1991). Tendo em vista a crescente preocupação do consumidor com a segurança alimentar, em vários estudos, têm-se procurado extrair ou isolar as proteínas de diferentes cereais pela ação de diversos tipos de enzimas (EUBER et al., 1991; ANSHARULLAH & CHESTERMAN, 1997; SHIH & DAIGLE, 1997; FREITAS et al., 1998; LUMDUBWONG & SEIB, 2000; FISCHER et al., 2001; WANG & WANG, 2001; TANG et al., 2002; AGBOOLA et al., 2005; CAPOGIANGO et al., 2006a).

Um método desenvolvido e patenteado por EUBER et al. (1991) consiste na hidrólise enzimática do amido por meio de uma α -amilase (Termamyl, Novo Laboratories ou Takalite, Miles), seguido por aquecimento a 105-130 °C por 30 a 60 s.

A fração protéica insolúvel foi separada da fração líquida rica em carboidrato por um método físico como centrifugação, filtração ou decantação. A fim de solubilizar a fração protéica foi, então, adicionada uma enzima proteolítica. Os autores conseguiram um teor de proteína de 16 a 90% nos concentrados obtidos nesse método, dependendo dos parâmetros empregados.

ANSHARULLAH & CHESTERMAN (1997) utilizaram carboidrases comerciais isoladas ou em associação para extrair as proteínas do farelo de arroz. A amostra foi, inicialmente, moída até atingir uma granulometria de 40 mesh e foi, então, preparada uma suspensão com tampão acetato (pH 3,8 – 5,4) contendo uma ou as duas enzimas utilizadas (Viscozyme L e Celluclast 1.5L, Novo-Nordisk A/S). A mistura foi, então, incubada em um banho-maria com agitação por um tempo que variou entre 1 e 5 h a duas diferentes temperaturas, 40 e 50 °C. A temperatura e a faixa de pH selecionadas no estudo foram aquelas em que apresentavam condições ideais para as enzimas utilizadas. Esses autores obtiveram rendimentos que variaram de 25,94 a 57,89%, em termos de nitrogênio extraído.

O uso em associação de carboidrases para separar as proteínas de farinha de arroz, foi empregado por SHIH & DAIGLE (1997). As amostras de farinha de arroz foram agitadas, mecanicamente, com água deionizada em pH 6,5 e levadas a uma placa de aquecimento com temperatura controlada. Duas carboidrases foram testadas, Termamyl 120 L (Novo Nordisk A/S) e a Taka-Therm L340 (Elkhart), sendo que o período de incubação variou de 15 a 60 min e a temperatura de 50 a 90 °C dependendo de cada enzima utilizada. O pH da mistura foi então ajustado para 4 e outras carboidrases foram adicionadas separadamente, permanecendo incubada por 2 h a 55 °C. Ao final desta etapa, a amostra foi centrifugada por 15 min a 4 °C, e o resíduo obtido foi lavado com água e, finalmente, liofilizado, apresentando-se como uma fração rica em proteína. O resíduo foi, então, suspenso em água deionizada e algumas proteases foram testadas (Papain 300 e Pronase E, International Enzymes, e Pronase 2A, Sigma), mantendo a suspensão incubada por 4 h a 50 °C em pH neutro. Depois de resfriada, a suspensão foi centrifugada e o resíduo foi, então, liofilizado. Os resíduos ricos em proteína obtidos apresentaram teores que variaram de 46,9 a 76,4%, dependendo das condições empregadas.

FREITAS et al. (1998), estudando a incubação em meio aquoso do grão de soja extrusado, com enzimas celulolíticas e proteolíticas, obtiveram simultaneamente três produtos: o óleo livre, a torta e um efluente contendo proteína hidrolisada. Os autores conseguiram um rendimento de 74% de proteína no hidrolisado protéico. A análise por

eletroforese mostrou, ainda, que toda proteína do efluente (hidrolisado protéico) estava na forma de peptídeos com peso molecular distribuído em duas frações, uma com peso molecular abaixo de 3000 Da e outra entre 10000 e 20000 Da, o que torna o hidrolisado com potencial uso no preparo de alimentos e bebidas.

Em alguns estudos visando a obtenção do amido do arroz foram utilizados diferentes métodos de extração protéica. Assim, LUMDUBWONG & SEIB (2000) obtiveram um amido de arroz com teor protéico de 0,5%, quando trataram a farinha de arroz com uma protease alcalina (Optimase APL-440).

Da mesma maneira, WANG & WANG (2001) avaliaram diversas formas de isolar o amido da proteína: (1) usando uma etapa alcalina na qual uma quantidade de farinha de arroz ficou por 18 h em solução de hidróxido de sódio 0,1% na proporção 1:2, em seguida agitada por 2 min à alta velocidade, passada por uma peneira de 63 μm , e por fim centrifugada a 1400 x g por 10 min; (2) usando uma protease neutra, uma quantidade de farinha de arroz foi misturada com água deionizada na proporção 1:2, em pH 7 a 50 °C. A quantidade de enzima adicionada foi de 0,01, 0,03 e 0,05% em relação a quantidade de farinha e o tempo de extração foi de 1, 3 e 5 h sob agitação magnética constante. Após a digestão pela protease, a mistura foi agitada por 2 min a alta velocidade, passada por uma peneira de 63 μm , e por fim centrifugada a 1400 x g por 10 min; (3) pela combinação de uma protease neutra e o ultra-som de alta intensidade, introduzindo essa etapa após a incubação com a enzima utilizando diferentes intensidades de sonicação e tempo de ação. Em todos os casos, o conteúdo de proteína no amido não chegou a 1%.

FISCHER et al. (2001) avaliaram a extração de proteínas da farinha de soja desengordurada pelo uso de preparações enzimáticas contendo uma endoprotease (alcalase de grau alimentício do *Bacillus licheniformis*), um complexo de proteases (flavourzima do *Aspergillus oryzae*), seguido de uma preparação de carboidrase do *Aspergillus aculeatus* e do *Humicola insolens*. Diferentes condições de hidrólise foram testadas. A quantificação de proteínas e carboidratos do resíduo obtido foi utilizada para avaliar a extração. 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 de proteínas. Entretanto, os autores sugeriram que a extração incompleta das proteínas se deve à interferência da matriz, provavelmente devido às interações entre proteínas e outros constituintes da amostra.

TANG et al. (2002) extraíram as proteínas de farelo de arroz desengordurado utilizando a combinação, ou não, de processamentos físicos (congelamento-

descongelamento, sonicação, agitação em alta velocidade e tratamento à alta pressão) com tratamentos enzimáticos (amilase e protease isoladas ou combinadas). Nos experimentos utilizando apenas processamentos físicos, foram extraídas de 11 a 16% das proteínas, enquanto que, quando se utilizou somente o tratamento enzimático, o rendimento de extração protéica atingiu valores que variaram de 27,7 a 61,8%. A combinação de processamentos físicos com tratamentos enzimáticos permitiu extrair de 25,6 a 66,6% das proteínas do farelo de arroz desengordurado. De acordo com os autores, o trabalho desenvolvido possibilitou demonstrar que os tratamentos físicos auxiliam a extração pelos métodos enzimáticos, aumentando o rendimento de extração das proteínas.

AGBOOLA et al. (2005) fracionaram as proteínas do arroz de variedade Australiana (cv. Langi), após moído e desengordurado, utilizando o método de Osborne com algumas modificações. Os autores realizaram também um método em paralelo, em que o arroz foi submetido a uma etapa de modificação do amido, utilizando a α -amilase (BAN 240 L, Novozymes) e uma enzima desramificante (Promozyme 400 L, Novozymes), antes de realizar as etapas de Osborne. O procedimento de extração não afetou significativamente o rendimento e o conteúdo de proteína, exceto para a fração de albumina obtida após a etapa de modificação do amido, onde o rendimento praticamente triplicou.

Em estudo realizado no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, a extração enzimática foi utilizada na obtenção de concentrados protéicos de fubá de milho. Uma quantidade de amostra foi adicionada à água, na proporção 1:5, e agitada em ultraturrax a 19.000 rpm por 5 min. Após ajuste do pH para 9,5, com solução de NaOH a 3 mol/L, levou-se ao banho de óleo a 55°C ou 60°C. Uma enzima alcalina (Protemax® 580 L, Prozyn) foi adicionada na relação enzima:substrato (E:S) de 1:10, e a hidrólise foi realizada em diferentes tempos (1 h, 5 h, 15 h e 24 h). Em seguida, centrifugou-se a 1700 x g por 15 min, a 25°C. Separou-se o sobrenadante e o resíduo foi lavado duas vezes com água destilada, tendo sido centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente. Os resultados obtidos indicaram rendimentos de extração protéica que variaram de 71,5 a 86,8% (CAPOBIANGO et al., 2006a).

O conhecimento das características de solubilidade protéica são muito úteis na seleção das condições ótimas para extração das proteínas. A solubilidade de uma proteína depende grandemente do número e do arranjo de cargas na molécula, que por sua vez dependerá da composição em aminoácidos, particularmente do número de resíduos ácidos (aspartil, glutamil) e básicos (histidil, arginil e lisil). Partes não protéicas

da molécula como lipídeos, carboidratos, fosfatos, etc, também afetam a solubilidade das proteínas (SGARBIERI, 1996).

A solubilidade das proteínas poderá ser modificada pela influência de vários fatores como pH, força iônica e temperatura. O pH afeta a natureza e a distribuição de cargas das proteínas sendo, em geral, mais solúveis em valores baixos de pH (ácidos) ou elevados (alcalinos) por causa do excesso de cargas positivas ou negativas. Excesso de cargas de mesmo sinal produz repulsão das moléculas, que contribui para sua maior solubilidade (SGARBIERI, 1996).

Outro fator importante é a temperatura. A maioria das proteínas são solúveis à temperatura ambiente e a solubilidade tende a aumentar à medida que a temperatura se eleva até 40-50 °C. Acima deste valor, as proteínas começam a sofrer desnaturação e a solubilidade tende a diminuir (SGARBIERI, 1996). A temperatura também é importante, pois afeta a estabilidade de enzimas e, como consequência, a sua capacidade de ligação ao substrato e de transformá-lo em produto. De acordo com EUBER et al. (1991), a temperatura utilizada na extração enzimática das proteínas de cereais deve ser abaixo da temperatura de gelatinização do amido.

As proteínas podem sofrer desnaturação por agentes físicos (ultra-som, calor, etc) e químicos (solventes orgânicos, valores extremos de pH, etc). Segundo FREITAS et al. (1998), a extrusão do grão antes da incubação enzimática proporciona uma desnaturação parcial na proteína, deixando as ligações peptídicas mais susceptíveis à hidrólise. A sonicação, congelamento-descongelamento, agitação em alta velocidade e tratamento à alta pressão, são métodos usados para romper a parede celular do alimento expondo as proteínas para a ação das enzimas e sua consequente solubilização (TANG et al., 2002).

A presença de álcalis (elevado pH), ao mesmo tempo em que aumenta a solubilização das proteínas, promove o enfraquecimento e rompimento de ligações secundárias facilitando a desnaturação (SGARBIERI, 1996). Desta forma, o controle do pH deve ser muito bem estabelecido na extração das proteínas, a fim de que não prejudique o rendimento final do processo.

A função da enzima utilizada na extração de proteínas está relacionada diretamente ao tipo e forma de atuação. Geralmente, as carboidrases são empregadas diretamente para promover a maceração ou desintegração da parede celular do alimento facilitando, subsequente, a extração do nitrogênio (ANSHARULLAH & CHESTERMAN, 1997). O tratamento prévio com amilase para solubilizar o amido, sob a forma de sacarídeos de vários pesos moleculares, como glicose, maltose,

oligossacarídeos e dextrina, promove também a obtenção de uma fração insolúvel rica em proteína que, após ser separada por centrifugação, pode ser solubilizada pela ação de enzimas proteolíticas (EUBER et al., 1991).

As enzimas proteolíticas são empregadas para solubilização das proteínas, através do rompimento das ligações peptídicas (FURLAN & OETTERER, 2002). As proteínas são mais resistentes ao ataque de enzimas proteolíticas em sua forma nativa do que na forma desnaturada. A explicação para este fato está associada à mudança da conformação globular ou filamentosa compacta da forma ativa, para uma conformação mais aberta da proteína desnaturada,. Desta maneira, o acesso das enzimas proteolíticas a um maior número de ligações peptídicas é facilitado, aumentando assim o grau de hidrólise (SGARBIERI, 1996).

Em relação à forma em que deve se apresentar a matéria-prima nos processos de extração das proteínas, EUBER et al. (1991) relatam que a única restrição é que a matéria-prima seja suficientemente fragmentada para maximizar a área de superfície efetivamente exposta para ação da enzima. A matéria-prima pode ser submetida ao processo de moagem de maneira a obter tamanho desejável das partículas, que proporcione uma dispersão prévia em água.

4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

4.1 Importância

Os hidrolisados enzimáticos são usados na indústria alimentícia, paraquímica e farmacêutica (KONG et al., 2007). Geralmente são destinados a três grandes grupos: (1) formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo; (2) formulações especiais para adultos com função gastrointestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos; e (3) suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (MAHAN & STUMP, 1998; MIRA & MARQUEZ, 2000).

O valor nutricional dos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional e ao método de hidrólise que possibilite a obtenção de peptídeos de pesos moleculares diferentes (GRIMBLE et al., 1986; ANANTHARAMAN & FINOT, 1993)

Para romper as ligações peptídicas e preparar os hidrolisados são indicados três métodos principais: as hidrólises enzimática, alcalina e ácida. Cada uma apresenta vantagens e desvantagens, dependendo da sua utilização e dos objetivos a serem alcançados (BERNARDI, 2000).

A hidrólise ácida, com emprego de ácido clorídrico, é praticada industrialmente por meio do emprego de proteínas de origem vegetal, e é preferida devido ao seu custo relativamente reduzido, à rapidez e à produção de sabor agradável. Entretanto, na neutralização do ácido clorídrico com hidróxido de sódio, ocorre uma elevada produção de sal (NaCl) no hidrolisado (FURLAN & OETTERER, 2002).

No entanto, os processos químicos não são facilmente aceitos, principalmente devido à crescente preocupação do consumidor quanto à segurança alimentar. Assim sendo, a utilização de enzimas para hidrolisar peptídeos e proteínas apresenta várias vantagens: (1) a atuação das enzimas é específica e quebra ligações que são resistentes a catalisadores não específicos; (2) o método é não destrutivo, não apenas para os aminoácidos comuns, mas também para os grupos lábeis; (3) as enzimas agem rapidamente e, teoricamente, completam a hidrólise em apenas alguns minutos; (4) permite controlar o grau de hidrólise; (5) deixa menor conteúdo de sal no hidrolisado final; e (6) há formação mínima de subprodutos (PEARCE, 1995; BERNARDI, 2000).

Por outro lado, também há desvantagens no uso dessas enzimas proteolíticas. Entre elas, sua instabilidade ou atividade sob as condições de pH, temperatura e concentração de substrato, além da difícil recuperação após o uso, devido à dificuldade de separar o substrato do produto (FURLAN & OETTERER, 2002).

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 (ADACHI et al., 1991).

Além da melhoria das propriedades funcionais e sensoriais, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas pelo tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois sabe-se que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (VIJAYALAKSHIMI et al., 1986). 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 e apresentam elevado potencial para o preparo de formulações

hipoalergênicas (ANANTHARAMAN & FINOT, 1993; KOLETZCO & SCHIMDT, 1991; SIEMENSMA et al., 1993).

Vários trabalhos, realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, empregaram a hidrólise enzimática no intuito de elevar o teor de oligopeptídeos de hidrolisados protéicos (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2001, 2004; MORAIS et al., 2002, 2005; BARBOSA et al., 2004; LOPES et al., 2005a; SOARES et al., 2004b) ou de melhorar as propriedades funcionais de proteínas (SILVA & SILVESTRE, 2003; BIZZOTTO et al., 2005; CAPOBIANGO et al., 2006c).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise, o qual parece estar relacionado à liberação de aminoácidos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas ou devido ao tamanho dos peptídeos formados. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados. 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 àqueles responsáveis pelo desenvolvimento de sabor amargo.

Com o objetivo de evitar um possível desenvolvimento de sabor amargo durante a preparação de hidrolisados protéicos, é aconselhável a utilização de encapsulação de enzimas em lipoesferas e lipossomas, técnica esta que foi empregada anteriormente no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa em hidrolisados de caseína (MORAIS et al. 2004, 2005).

O uso direto de células microbianas na hidrólise de proteínas é um procedimento alternativo que tem sido investigado. Esse procedimento parece conferir características desejáveis ao produto, como uma superior funcionalidade da proteína, além da ausência de gosto amargo, favorecendo a incorporação do produto em formulações alimentares (DINIZ & MARTIN, 1999).

4.2 Fatores interferentes

De acordo com CÂNDIDO (1998), as reações enzimáticas devem ser controladas para se alcançar resultados confiáveis. Dentre as variáveis temos: pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima/substrato (E:S), inativação enzimática ao final do processo. Outro fator a ser

considerado é a escolha de um bom método para determinação do grau de hidrólise (SILVESTRE et al., 1993).

A fim de se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características sensoriais agradáveis ao consumidor, é importante controlar as condições hidrolíticas na digestão enzimática das proteínas (SVENNING et al., 1993; FREITAS et al., 1998).

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 e os aminoácidos que se quer deixar na forma livre (HAQUE & MOZAFFAR, 1992).

A associação de enzimas introduzidas na reação, simultânea ou sucessivamente, pode conduzir a um grau de hidrólise superior àquele obtido com uma única enzima, demonstrando um caráter de ação sinérgica ou complementar. Assim, na produção de hidrolisados, enzimas de ampla especificidade têm sido utilizadas em associações, levando a uma hidrólise extensa, com a obtenção de pequenos peptídeos e aminoácidos (SILVESTRE et al., 1993, 1994a, b).

O uso inicial de endopeptidases na obtenção de hidrolisados protéicos, facilita a ação das exopeptidases em uma segunda etapa, acarretando uma degradação mais completa (CLEMENTE, 2000). A associação de enzimas foi empregada em alguns estudos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, como por exemplo MORATO et al. (2000), que utilizaram a associação das enzimas tripsina e subtilisina; CARREIRA et al. (2001), que empregaram as enzimas tripsina, subtilisina e pepsina associadas; LOPES et al. (2005a) que associaram papaína e protease do *Aspergillus oryzae* e SOARES et al. (2006) que fizeram as associações papaína/protease do *Aspergillus oryzae* e pepsina/protease do *Aspergillus oryzae*.

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 a 90 °C, por 10 a 20 min (SILVESTRE et al., 1993; MORATO et al., 2000).

5 REMOÇÃO DE FENILALANINA

5.1 Importância da remoção

A hiperfenilalaninemia (HPA), nome genérico dado a elevados níveis de Phe no sangue, constitui uma desordem primária do sistema de hidroxilação da Phe, podendo ser causada pela deficiência da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH) ou das enzimas que sintetizam ou reduzem a coenzima tetrahidrobiopterina (BH₄) (ACOSTA & YANNICELLI, 1997, MIRA & MARQUEZ, 2000; HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MALLOY-DINIZ et al., 2004, HAMMAN et al., 2005; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; WASSERSTEIN et al., 2006).

Desde a década de 70, inúmeras variantes da fenilcetonúria (PKU) foram descobertas, exigindo freqüentemente exames laboratoriais adicionais que permitam uma perfeita diferenciação, para que o diagnóstico clínico e a prescrição do tratamento sejam adequados (MIRA & MARQUEZ, 2000).

As diferenças na capacidade de metabolização da Phe pela fenilalanina hidroxilase, variando entre a completa ausência de atividade e 5% de atividade residual, associada respectivamente a altas concentrações de Phe no plasma (1.200 mol/L) e concentrações normais, deram origem a diversos estudos para classificar as variantes da PKU. As HPA são, portanto, classificadas em PKU clássica, PKU leve, HPA permanente, HPA transitória, HPA materna e deficiências de BH₄ (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003; HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

O uso de substitutos protéicos é necessário para o controle dos níveis séricos de Phe em pacientes com PKU clássica. Dessa forma, o uso de misturas de aminoácidos livres e de hidrolisados protéicos, isentos ou com baixos teores de Phe, torna-se indispensável (ACOSTA & YANNICELLI, 1997; ACOSTA, 1998; MIRA E MARQUEZ, 2000). A característica básica dos produtos é a concentração de Phe em valores mínimos – não superior a 100 mg de Phe por 100 g de produto (BRASIL, 2002).

Misturas de L-aminoácidos isentas de Phe são essenciais para as necessidades de pacientes com PKU (ACOSTA, 1998), entretanto, por serem importadas, essas formulações são de alto custo, além de resultarem em uma dieta monótona e pouco palatável. Uma boa alternativa para o tratamento consiste no uso de formulações à base de hidrolisados protéicos isentos ou com baixo teor de Phe, pois apresentam melhor tolerância, sabor e odor mais agradáveis, menor osmolaridade, o que evita diarreia osmótica causada pelo uso de aminoácidos livres. Além disso, são

prontamente utilizáveis, pois os di- e tripeptídeos provenientes da hidrólise parcial de proteínas são absorvidos mais rápida e completamente que uma mistura de aminoácidos livres, e sua produção é economicamente mais viável do que as misturas sintéticas de aminoácidos (HENN & NETO, 1998; MIRA & MARQUEZ, 2000)

Segundo MIRA & MARQUEZ (2000), diversas formulações estão disponíveis no mercado de países desenvolvidos e no Brasil são importadas pelo governo; entre elas, podem ser citadas, o Lofenalac, Phenyl-free, PKU1, PKU2, PKU3 entre outros. Esses produtos contêm além de aminoácidos livres, com exceção de Phe, alguns minerais e vitaminas (HENDRIKSZ & WALTER, 2004). Do ponto de vista sensorial, essas misturas possuem odor e paladar desagradáveis e a sua ingestão, que deveria ocorrer em pequenas porções durante o decorrer do dia, freqüentemente é feita de uma só vez, com prejuízo na utilização biológica e com aumento da metabolização dos aminoácidos por via oxidativa (MIRA & MARQUEZ, 2000). O reconhecimento desses problemas faz com que países como a Inglaterra e os Estados Unidos recomendem investimentos em pesquisa e tecnologia para desenvolvimento de novos produtos de melhor aceitação (PRINCE et al., 1997).

As formulações especiais para fenilcetonúricos podem ser elaboradas através da utilização de hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe, como fonte de proteína (maior proporção de di- e tripeptídeos), acrescidos de lipídeos, carboidratos, minerais e/ou elementos-traço. Depois de misturados, a preparação passa por um processo de secagem em *spray-dryer*, e os aminoácidos lisina e cistina são adicionados à mistura em pó obtida, a fim de evitar possíveis reações que possam ocorrer durante o processo de secagem (TESMER et al. 1998).

5.2 Métodos de remoção

A Phe é um aminoácido presente em todas as proteínas animais e vegetais na proporção de 4 a 6% (OUTINEN et al., 1996). Assim, a dieta de fenilcetonúricos obriga a uma baixa ingestão de proteínas. Por isso, vários métodos foram desenvolvidos para remover esse aminoácido de hidrolisados protéicos (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Os métodos usados para a remoção de Phe baseiam-se na liberação deste aminoácido por hidrólise química ou enzimática, sendo posteriormente removido por tratamentos diferenciados (SHIMAMURA et al., 1999). Vários métodos são utilizados para a remoção, como adsorção em carvão ativado (CA) ou resinas de adsorção,

cromatografia de troca iônica, peneira molecular ou filtração em gel, além de desaminação deste aminoácido pela enzima fenilalanina amônia liase. 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 CA foi utilizado por diversos pesquisadores na remoção de Phe de hidrolisados protéicos. Cerca de 90% da Phe foi removida por MOSZCZYNSKI & IDZIAK (1993) de hidrolisados de caseína, após tratamento com CA. Para se obter estes hidrolisados, foi utilizada uma associação das enzimas quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase. Estes mesmos autores testaram também outros meios para a remoção de Phe, como resinas de troca iônica e de exclusão molecular, sendo a maior remoção obtida com o uso do CA.

Em estudo realizado no mesmo laboratório do presente trabalho, o uso do CA foi eficiente na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz em grão, obtidos pela ação da Corolase PP – 89 a 100% (BIZZOTTO et al., 2006a) e da pancreatina – 84 a 100% de remoção (BIZZOTTO et al., 2006b). Em outros trabalhos, do mesmo grupo, o CA também foi utilizado com eficiência para a remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de fubá de milho atingindo até 97,5% de remoção (CAPOBIANGO et al., 2006b), de leite desnatado, chegando a 99% de remoção (SOARES et al. 2006; LOPES et al., 2005b), e de soro de leite em pó, tendo atingido os níveis de remoção de até 97% (DE MARCO et al., 2005), 95% (SILVA et al., 2005b) e 99% (DELVIVO et al., 2005).

OUTINEN et al. (1996) utilizaram as resinas de adsorção XAD-4 e XAD-16, removendo de 92 a 100% da Phe de hidrolisados pancreáticos. Valor inferior de remoção (62,5%) foi encontrado por SANTOS et al. (2003), ao utilizar a resina XAD-4 para remover a Phe de hidrolisados de caseína. Este mesmo meio foi utilizado por DELVIVO et al. (2006) para remover 95% da Phe de hidrolisados de soro de leite em pó, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa.

5.3 Avaliação da eficiência da remoção

Vários métodos são descritos na literatura para se determinar a Phe, dentre eles pode-se citar: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa (ZEZZA et al., 1992), HPLC de troca iônica (FANG et al., 1992), HPLC interação hidrofílica

(CARREIRA et al., 2002), sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999) e espectrofotometria derivada segunda – EDS (SILVESTRE et al., 1993).

A EDS tem sido utilizada para separar o complexo espectro de absorção de proteínas nas contribuições individuais dos aminoácidos aromáticos Phe, Tyr e Trp, uma vez que esses apresentam bandas de absorção características na região do ultravioleta, entre 240 e 310 nm, assim como para quantificá-los (MICLO et al., 1995). A EDS é considerada um método simples, rápido e de custo relativamente baixo para mostrar diferenças espectrais entre proteínas nativas e desnaturadas.

Com relação à análise de hidrolisados protéicos, a EDS foi empregada por SILVESTRE et al. (1993) 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 tanto maior quanto mais próximo o grupamento aromático estiver da posição C-terminal ou N-terminal. Essa técnica já foi empregada no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa para a avaliação do grau de encapsulação de hidrolisados enzimáticos de caseína (MORAIS et al., 2004), como também para a determinação de Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó (SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2005a), de soro de leite (DELVIVO et al., 2005; SILVA et al., 2005a,b; DE MARCO et al., 2005), de arroz em grão (BIZZOTTO et al., 2006a,b) e de fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2006b).

TRABALHO EXPERIMENTAL

APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho está apresentada na forma de fluxogramas, nas Figuras 3 e 4. Os resultados foram divididos em dois capítulos e redigidos sob a forma de artigo científico.

No primeiro capítulo, uma farinha comercial de arroz foi inicialmente caracterizada quanto a sua composição centesimal. Em seguida, esta farinha foi submetida a um processo de extração enzimática das proteínas, visando a produção de suplementos dietéticos com diversas aplicações relevantes para as áreas de nutrição e saúde. Buscando aumentar o rendimento de extração, o efeito de alguns parâmetros foram estudados, tais como: tipo de enzima, temperatura, pH, tratamento físico, relação enzima:substrato (E:S) e concentração inicial de amostra. O rendimento de extração foi calculado utilizando-se os teores de proteínas da farinha de arroz e dos resíduos.

No segundo capítulo, o extrato protéico de farinha de arroz, obtido com os melhores parâmetros de extração, foi hidrolisado sob diversas condições. As variáveis empregadas foram tipo de enzima e relação E:S. O carvão ativado (CA) foi utilizado para a remoção de fenilalanina (Phe) dos hidrolisados, variando-se a relação proteína:CA, tipo e modo de emprego do CA. A eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor de Phe livre na farinha de arroz e nos hidrolisados após tratamento com CA.

CAPÍTULO 1

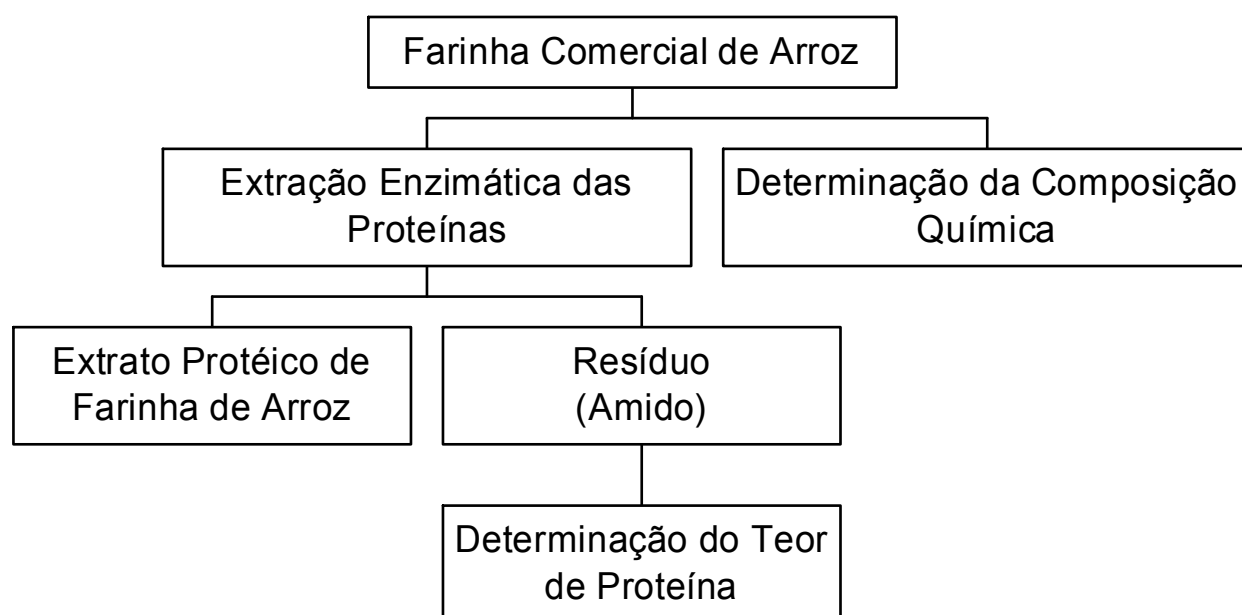


Figura 3 – Principais etapas do trabalho experimental do capítulo 1.

CAPÍTULO II

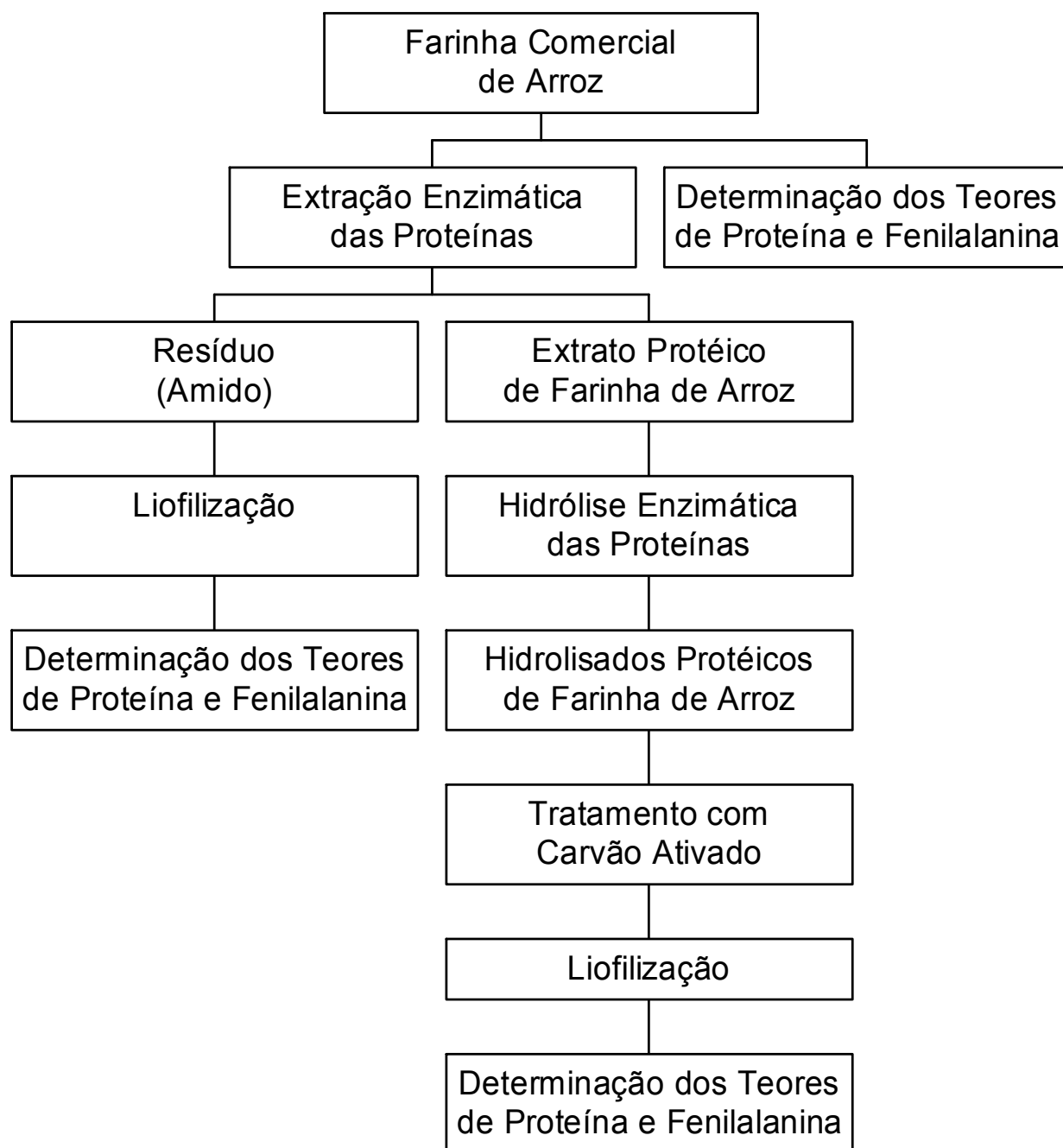


Figura 4 – Principais etapas do trabalho experimental do capítulo 2.

CAPÍTULO I

EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA FARINHA DE ARROZ

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo extrair enzimaticamente as proteínas de uma farinha comercial de arroz. Visando aumentar o rendimento de extração protéica (REP), os seguintes parâmetros foram avaliados: tipo de enzima (protease alcalina e neutra); temperatura (40, 50 e 60 °C); pH (9,5, 10,5 e 11,0); tratamento físico da amostra (sem tratamento, ultra-turrax à 16.000 rpm e ultra-som à 120W, ambos por 5, 10 e 15 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 arroz e dos resíduos foram determinados para se calcular o REP. Os resultados mostraram que a melhor condição de extração protéica que levou ao maior REP foi a que empregou a concentração inicial de matéria prima a 1:10 (p/v), sem tratamento físico, pH 10,5, com a protease alcalina na relação E:S de 10:100, a 50 °C; tendo atingido um REP de 63,4%.

Palavras-chave: Arroz; enzimas; extração; proteínas; rendimento.

ABSTRACT

ENZYMATIC EXTRACTION OF PROTEIN FROM RICE FLOUR. The enzymatic extraction of proteins from a commercial rice flour was studied in this work. In order to increase the protein extraction yield (PEY), the following parameters were evaluated: enzyme type (alkaline and neutral protease); temperature (40, 50 and 60 °C); pH (9.5, 10.5 and 11.0); physical treatment of the sample (with no treatment, ultra-turrax at 16.000 rpm and ultrasound at 120W, both for 5, 10 and 15 min.); enzyme:substrate ratio (E:S) of 5:100 and 10:100 and initial concentration of raw material (1:3, 1:5 and 1:10 w/v). The PEY was calculated using the protein contents of rice flour and the extraction residues. The results showed that the best condition of protein extraction which gave the highest PEY (63.4%) was that using the initial concentration of raw material of 1:10 (w/v), with no physical treatment, pH 10.5, the alkaline protease with the E:S of 10:100, at 50 °C.

Keywords: Rice; enzymes; extraction; protein; yield.

1 INTRODUÇÃO

Os grãos de cereais constituem uma fonte valiosa de proteínas para a alimentação humana. No Brasil, os cereais mais importantes, econômica e nutricionalmente, são o trigo, milho e arroz (SGARBIERI, 1996). O arroz é uma das maiores produções de grãos no mundo, sendo o Brasil o principal produtor entre os países ocidentais (BARATA, 2005).

O arroz pode ser utilizado para consumo humano sob diversas formas: arroz polido, parboilizado e integral; óleo e farinha comercial de arroz, entre outros. Grande parte do arroz polido é consumida diretamente após cozido, mas uma parte significativamente crescente tem sido usada industrialmente na produção de farinha de arroz que é, posteriormente, utilizada como aditivo em gel, pudins, sorvetes e outros produtos similares devido as suas propriedades nutricionais, hipoalergenicidade, por possuir sabor agradável e por não interferir na cor do produto final (BRASIL, 1978; CHRASTIL, 1992; SHIH & DAIGLE, 2000; JU et al., 2001).

O conteúdo de proteína na farinha comercial de arroz é relativamente baixo (7 a 9%). Entretanto, dentre os componentes do arroz, as proteínas têm sido consideradas de grande valor, pois são hipoalergênicas, particularmente saudáveis para o consumo humano e altamente nutritivas, em relação aos outros cereais. O conteúdo de lisina é de 3 a 4 %, aproximadamente 50% maior que a do trigo, por exemplo (SHIH & DAIGLE, 2000; JU et al., 2001).

As proteínas são classificadas na base de solubilidade em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em álcool) e glutelinas (solúveis em álcalis). A fração das glutelinas corresponde à maior parte das proteínas do arroz, o que representa cerca de 80% (JULIANO, 1993; SGARBIERI, 1996; HAMADA, 1997; JU et al., 2001).

A produção de isolados protéicos de arroz consiste, geralmente, em uma extração alcalina de seus subprodutos, como a farinha comercial de arroz, seguida pela precipitação das proteínas pelo ajuste do pH no ponto isoelétrico. Têm sido reportados na literatura, métodos descrevendo o uso de soluções alcalinas para extração de proteínas do arroz (CONNOR et al., 1976; LINDASY et al., 1977; BIZZOTTO et al., 2006a, b).

Entretanto, condições alcalinas usadas nesse processo de extração, podem causar reações secundárias indesejáveis e potencial toxicidade, tal como a formação de lisinoalanina, acarretando perda do valor nutritivo das proteínas. Outras conseqüências são a desnaturação protéica, a ocorrência de reação de Maillard que causam 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).

Em vários estudos têm-se procurado isolar as proteínas do arroz, a partir de seus produtos como a farinha e o farelo, pela remoção enzimática de conteúdos não protéicos. Diversas enzimas têm sido utilizadas, entre estas, encontram-se a pancreatina, as proteases alcalinas, fúngicas ou bacterianas em conjunto ou não com a ação de amilases e carboidrases (EUBER et al., 1991; SHAW & SHEU, 1992; ANSHARULLAH & CHESTERMAN, 1997; SHIH & DAIGLE, 1997, 2000; SHIH et al., 1999; WANG et al., 1999; FISCHER et al., 2001; TANG et al., 2002; AGBOOLA et al., 2005). Em outros casos, métodos enzimáticos foram desenvolvidos com o principal objetivo de isolar apenas o amido do arroz utilizando proteases alcalinas e/ou neutras; no entanto, os baixos conteúdos de proteína obtidos no amido indicam que é possível obter subprodutos ricos em proteína (LUMDUBWONG & SEIB, 2000; WANG & WANG, 2001, 2004a).

Alguns autores têm utilizado tratamentos físicos (ultra-som, agitação à alta velocidade, alta pressão, etc) na extração de proteínas do arroz e de seus produtos. Dependendo dos fatores e tipo de matéria-prima empregados, os resultados reportados na literatura associam uma correlação positiva do emprego de processos físicos com o rendimento de extração protéica (TANG et al., 2002; WANG & WANG, 2001, 2004a, b).

Levando-se em conta a posição relevante que ocupa o arroz na dieta do brasileiro, e a qualidade de suas proteínas, seria de grande interesse utilizá-lo como matéria-prima para a produção de alimentos para fins dietéticos especiais com diversas aplicações relevantes para as áreas de nutrição e saúde. O primeiro passo neste sentido consiste na extração das proteínas, que foi estudada no presente trabalho, empregando-se o método enzimático e verificando-se o efeito de diversos parâmetros neste processo, com o intuito de obter elevado rendimento de extração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A farinha comercial de arroz foi fornecida pela FERLA - L. FERENCZI Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, SP, Brasil). As proteases, 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) e a Protemax[®] N200 (EC 3.4.21.62, uma serino-endopeptidase de origem bacteriana – cepa do *Bacillus subtilis*, atividade 200 NU/g, estável em pH entre 4,7 e 7,5 com pH ótimo entre 7 e 7,5, temperatura ótima de 55°C e temperatura de inativação acima de 80°C por 20min), foram cedidas pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação da composição centesimal da matéria-prima

A farinha comercial de arroz foi acondicionada em potes de vidro, hermeticamente fechados e 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). O teor de umidade foi determinado por dessecação em estufa ventilada (Quimis Q-314M242 série 020, Diadema, SP) a 105° C até peso constante; o teor de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl; os lipídeos, por extração com éter etílico, pelo método de Soxhlet modificado (Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); os minerais, por incineração em mufla a 550° C; e os carboidratos, por diferença.

O fator utilizado na conversão do teor de nitrogênio em proteína foi de 5,95, baseado no teor de nitrogênio da fração glutelina do arroz (16,8 g N/100 g de proteína), como sugerido por SGARBIERI (1996). A energia está expressa em Kilocalorias (Kcal) e os valores foram calculados empregando-se os fatores de conversão de 4 Kcal/g para proteína e carboidratos e de 9 Kcal/g para lipídeos (USDA ,2006).

2.2.2 Extração enzimática das proteínas da farinha comercial de arroz

Empregou-se um método de extração enzimática das proteínas da farinha comercial de arroz, utilizando o procedimento descrito por WANG & WANG (2001) e modificado por CAPOBIANGO et al. (2006a). Algumas adaptações adicionais foram realizadas visando aumentar o rendimento de extração protéica (REP), tais como tipo de enzima, pH, tempo e temperatura empregados.

No preparo dos extratos protéicos de farinha arroz (EPFA), os seguintes parâmetros foram avaliados: tipo de enzima; pH; temperatura; tratamento físico; concentração da matéria-prima; e relação enzima:substrato (E:S).

2.2.2.1 Avaliação do efeito do tipo de enzima

Foram testadas duas enzimas: uma protease alcalina (Protemax[®] 580L – *Bacillus licheniformis*) e uma protease neutra (Protemax[®] N200 – *Bacillus subtilis*), que foram anteriormente utilizadas por CAPOBIANGO et al. (2006a) e por WANG & WANG (2001), na extração enzimática das proteínas do fubá de milho e para isolar o amido de arroz, respectivamente.

A farinha comercial de arroz foi suspensa em água destilada na proporção de 1:5 (p/v) e benzoato de sódio foi adicionado em quantidade necessária para uma concentração final de 0,1% (p/v). A suspensão foi agitada no ultra-turrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 16.000 rpm por 5 min, e as enzimas adicionadas na relação E:S de 10:100 em suas condições ótimas de pH e temperatura, ou seja, a protease alcalina, em pH 9,5 a 60 °C e a protease neutra, em pH 7,5 a 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 5 h com agitação constante. Após este tempo, a suspensão foi resfriada até 25 °C e centrifugada por 15 min a 1700 x g. O EPFA 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 EPFA no mesmo recipiente. O resíduo foi pesado e submetido à determinação do teor de proteína.

2.2.2.2 Avaliação do efeito da temperatura

Para avaliar esse parâmetro, três valores foram testados: 40, 50 e 60 °C, usando a enzima e as condições que proporcionaram o maior REP no item anterior. Os valores de temperatura empregados foram baseados em estudo realizado por EUBER et al. (1991), que empregaram a faixa de 35 a 60°C para verificar o efeito da temperatura na solubilização das proteínas por diversas proteases.

2.2.2.3 Avaliação do efeito do pH

Utilizando a condição em que se obteve o maior REP no item 2.2.2.2, três valores de pH foram testados: 9,5, 10,5 e 11,0, dentro da faixa usada por BIZZOTTO et al. (2006b). Os valores de pH dos extratos obtidos foram medidos após o término da extração.

2.2.2.4 Avaliação do efeito do tratamento físico

Baseado em estudo realizado por TANG et al. (2002), os tratamentos físicos avaliados foram ultra-turrax a 16.000 rpm e ultra-som a 120 W. Nos dois casos, variou-se o tempo de ação em 5, 10 e 15 min. Uma amostra controle, sem tratamento físico, foi também preparada. Os outros parâmetros utilizados nessa etapa foram aqueles que proporcionaram um maior REP no item anteriormente descrito (2.2.2.3).

2.2.2.5 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., 2006a) e 1:10 p/v (SHAW & SHEU, 1992), para a melhor condição encontrada no item 2.2.2.4. O efeito da relação E:S foi investigado no valor

utilizado por CAPOBIANGO et al. (2006a), igual a 10:100 e em um inferior, E:S de 5:100, para todas as três concentrações da matéria-prima.

2.2.2.6 Determinação do rendimento da extração protéica

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

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

sendo:

A = Teor de proteína na farinha de arroz.

B = Quantidade de farinha de arroz utilizada na extração.

C = Peso de resíduo obtido na extração.

D = Teor de proteína no resíduo.

2.2.3 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 arroz (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

Os dados referentes à composição química da farinha comercial de arroz estão apresentados na Tabela I.1. De uma forma geral, a composição centesimal da farinha comercial de arroz assemelha-se aos resultados das análises do fornecedor da

matéria-prima (FERLA, 2005)², bem como aos dados citados na literatura. Algumas diferenças encontradas podem ser explicadas pelo fato de que os fatores ambientais afetam a composição do grão de arroz. No caso das análises do fornecedor da matéria prima, acredita-se que os métodos empregados na determinação destes componentes podem ter influenciado nos resultados obtidos, embora não tenham sido mencionados na literatura consultada (JULIANO, 1993).

Observa-se que os valores encontrados para carboidratos são semelhantes aos citados em bases de dados, como USDA (2006) e USP (2005), e aos relatados por HAGENIMANA et al. (2006), MURTHY et al. (2007) e ILO et al. (1999). Quanto ao teor de lipídeos, estes ficaram próximos aqueles reportados por MURTHY et al. (2007) e ILO et al. (1999), enquanto de cinzas, se aproximam de alguns, como os reportados por ILO et al. (1999) e HAGENIMANA et al. (2006), sendo inferior aos demais.

Tabela I.1 – Composição química da farinha comercial de arroz

	Umidade (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Lipídeos (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Carboidratos (g/100 g)	Calorias (Kcal/100 g)
Resultados encontrados ¹	9,27	6,61 ³	0,82	0,42	82,88	365,3
FERLA (2005) ²	9,60	6,96 ⁴	0,90	0,60	81,94	363,7
HAGENIMANA et al. (2006)	12,40	6,71 ⁴	0,41	0,39	80,10	-
MURTHY et al. (2007)	11,00	7,50 ⁴	0,80	0,70	80,00	-
ILO et al. (1999)	-	8,13 ⁵	0,77	0,47	-	-
USDA (2006)	11,89	6,05 ⁶	1,42	0,61	80,13	366
USP (2005)	11,60	6,90 ⁴	1,10	0,70	79,70	354

¹ Valores obtidos no presente trabalho. ² Valores fornecidos pelo fornecedor da matéria-prima. ³ Fator de conversão do teor de nitrogênio em proteína igual a 5,95. ⁴ Fator de conversão do teor de nitrogênio em proteína não especificado. ⁵ Fator de conversão do teor de nitrogênio em proteína igual a 6,25. ⁶ Fator de conversão do teor de nitrogênio em proteína igual a 5,85.

² FERLA L. Ferenczi Indústria e Comércio Ltda. *Laudo técnico de análise de liberação N° 051/05*, São Paulo, 2005.

O teor de proteína observado no presente trabalho, está próximo de HAGENIMANA et al. (2006), USDA (2006) e USP (2005), sendo inferior ao de MURTHY et al. (2007) e ILO et al. (1999). Pode-se justificar tal diferença devido aos fatores de conversão do teor de nitrogênio em proteína, que não foram os mesmos usados no presente trabalho, bem como as condições de cultivo do arroz que contribuem para aumentar o teor de proteína, como solo, clima e possível aplicação de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados (JULIANO, 1993).

3.2 EFEITO DOS PARÂMETROS NA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS

3.2.1 Efeito do tipo de enzima

Para avaliar o efeito do tipo de enzima no REP, duas proteases foram testadas nas suas condições ótimas de temperatura e pH. O método que usou a protease alcalina obteve um REP (50,7%) significativamente superior aquele utilizando a protease neutra (28,6%).

Não foram encontrados na literatura, trabalhos em que se comparasse o efeito do tipo de protease na extração direta das proteínas do arroz. No entanto, EUBER et al. (1991), visando a obtenção de concentrado protéico solúvel de arroz, após tratamento prévio com uma alfa-amilase, utilizaram diversos tipos de proteases para solubilizar/extrair a proteína do resíduo obtido. Estes autores verificaram que, como obtido no presente trabalho, a ação de uma protease bacteriana alcalina foi mais eficiente que a protease bacteriana neutra, obtendo valores de rendimento protéico iguais a 47,0 e 33,5%, respectivamente.

A eficiência da ação de uma protease alcalina em relação à neutra na extração de proteínas do arroz deve estar relacionada ao meio alcalino utilizado, potencializando dessa forma a extração das glutelinas, maior fração protéica da matéria-prima, e que é relativamente solúvel em álcalis.

3.2.2 Efeito da temperatura

O método em que foi usada a protease alcalina foi escolhido para ser utilizado nessa etapa, uma vez que proporcionou um maior REP. Foram, então, fixados os

demais parâmetros de extração (relação E:S de 10:100, pH 9,5, concentração de matéria-prima de 1:5 p/v, tratamento físico com ultra-turrax a 16.000 rpm/5 min), variando apenas a temperatura utilizada.

Pode-se notar na Figura I.1, que a temperatura de 50 °C foi a mais vantajosa, pois levou ao maior REP (53,5%), sendo que não houve diferença significativa entre os outros dois valores de temperatura testados (49,4% para 40 °C e 50,7% para 60 °C). No caso de se usar a temperatura de 40 °C, o resultado inferior a 50 °C poderia ser explicado pelo fato de que o aquecimento foi insuficiente para a extração protéica. Enquanto que o resultado obtido com o emprego da temperatura de 60 °C, pode estar relacionado à proximidade da temperatura de gelatinização do amido do arroz, que está na faixa de 61 – 77 °C (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Neste processo, parte das proteínas ligadas às moléculas de amido, poderia estar inacessível à ação da enzima. Além disso, acima de 50°C, as proteínas começam a sofrer desnaturação e a solubilidade tende a diminuir (SGARBIERI, 1996).

Da mesma maneira, ANSHARULLAH & CHESTERMAN (1997), utilizando uma combinação de duas carboidrases, ao invés de proteases, na obtenção de concentrado protéico do arroz, observaram que a extração foi maior quando o processo foi conduzido à temperatura de 50 °C, em relação ao usado a 40 °C, tendo obtido REP de 54,42 e 51,17 % em termos de nitrogênio extraído, respectivamente.

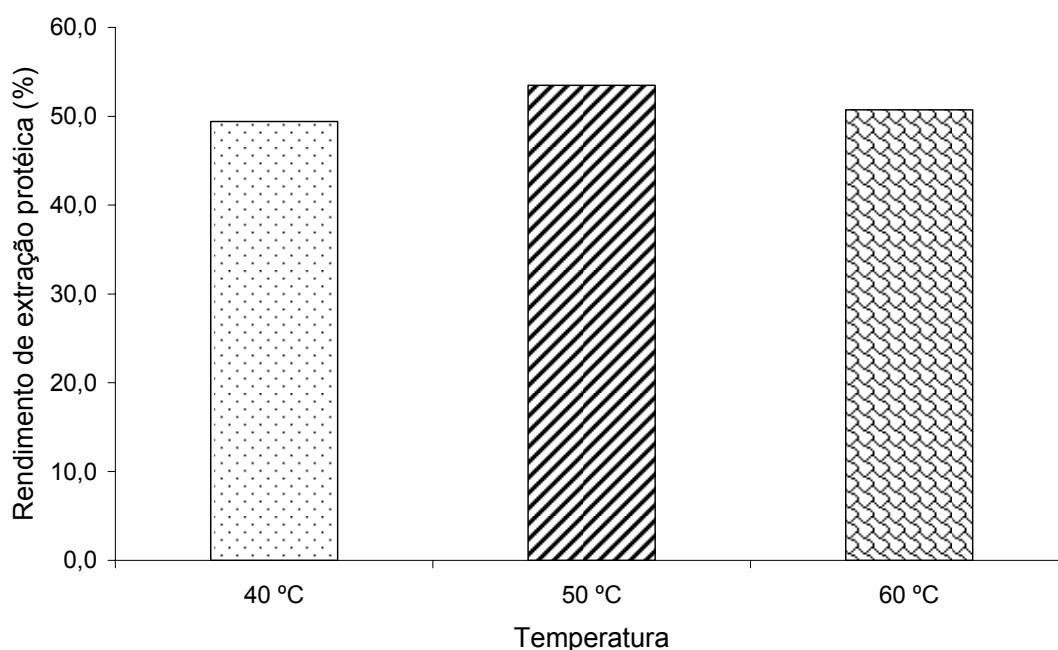


Figura I.1 – Efeito da temperatura no rendimento de extração protéica

CAPOBIANGO et al. (2006a) também observaram valor inferior do REP à temperatura de 60 °C (81,2%) em relação ao de 55 °C (83,8%). Segundo esses autores, esse efeito associando o emprego de temperatura inferior com um maior valor de rendimento é desejável, uma vez que proporciona a redução de custos do processo.

Resultados semelhantes foram observados por outros autores. Assim, EUBER et al. (1991), estudando o efeito da temperatura no REP, utilizaram a pancreatina para solubilizar as proteínas do resíduo de arroz obtido após a extração do amido pela ação de alfa-amilase. Os resultados mostraram que quanto maior a temperatura utilizada, maior foi o REP (72,0% para 35 °C e 75,8% para 45 °C). Entretanto, ao se utilizar a temperatura de 60 °C observou-se uma queda no REP (75,5% para 50 °C e 71,4% para 60 °C).

3.2.3 Efeito do pH

Para avaliar o efeito do pH, a temperatura de 50 °C foi escolhida por ter promovido um maior REP. Os outros parâmetros foram também fixados (protease alcalina na relação E:S de 10:100, concentração de matéria-prima de 1:5 p/v, tratamento físico com ultra-turrax a 16.000 rpm/5 min).

Na Figura I.2 pode ser notado que o pH 11,0 foi o que deu origem ao maior REP (63,6%), seguido do pH 10,5 (57,6%) e por último, o pH 9,5 (53,5%). Embora o pH ótimo de atuação da enzima seja igual a 9,5 (segundo informação do fornecedor), o emprego de um valor mais elevado pode ter provocado uma maior solubilização da fração glutelina, que corresponde à maior parte das proteínas do arroz, e que são relativamente solúveis em álcali, o que explica o valor mais elevado de REP. De acordo com JU et al. (2001), estudos realizados por outros autores demonstraram que 98% de extração da fração glutelina foi obtido em pH 11,8 e que em pH abaixo de 10,0, a solubilidade dessa fração reduz drasticamente.

BIZZOTTO et al. (2006b), buscando a otimização do método de extração alcalina para obtenção do extrato protéico bruto de arroz, relataram igualmente, que o emprego de valor mais elevado de pH foi benéfico para o rendimento de extração, sendo que no pH 12,0 extraiu-se 65% das proteínas e no pH 10, a extração atingiu apenas 59%.

Observou-se, ainda, no presente estudo que durante a extração enzimática, ocorreu uma queda no valor do pH. Isto se deve à hidrólise enzimática de proteínas, na

qual ocorre a quebra das ligações peptídicas e, conseqüentemente a liberação de grupamentos terminais dos peptídeos. Em soluções aquosas, estes grupos se encontram na forma ionizável ($\text{COO}^- + \text{H}^+$), e os prótons livres, neutralizam a alcalinidade do meio (LEHNINGER et al., 1995; GUADIX et al., 2000).

No caso dos valores de pH de 10,5 e de 9,5, o pH final ficou bem próximo à neutralidade, tendo atingido os valores de $7,4 \pm 0,1$ e $6,7 \pm 0,2$, respectivamente. Para o pH de 11,0 a queda foi menor, tendo o pH final ficado em $8,2 \pm 0,2$. Assim, embora em pH 11,0 tenha se obtido um maior REP, esta condição apresenta como desvantagem o fato de ser necessário proceder a neutralização, o que levaria à formação de sal no produto final (FURLAN & OETTERER, 2002).

Esse fenômeno do abaixamento do pH foi também constatado por EUBER et al. (1991) ao utilizar uma pancreatina, em pH 8,0, para solubilizar as proteínas do resíduo de arroz obtido após a extração do amido pela ação de alfa-amilase. Os autores relataram que ao final do processo o pH ficou entre 6,9 e 7,5. O mesmo foi relatado por CAPOBIANGO et al. (2006a) ao observarem que, na extração enzimática das proteínas do fubá de milho, o pH final, inicialmente ajustado no valor de 9,5, situava-se em torno de 7,0.

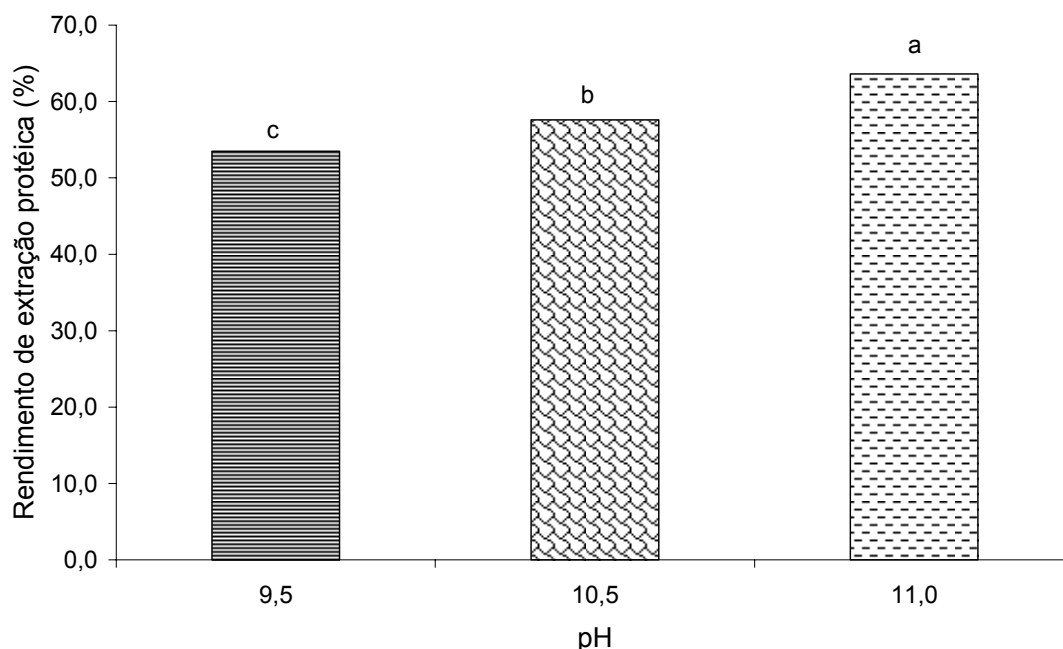


Figura I.2 – Efeito do pH no rendimento da extração protéica.

3.2.4 Efeito do tratamento físico

A avaliação desse parâmetro foi realizada fixando-se o pH em 10,5, uma vez que neste valor obteve-se a melhor condição de extração protéica. Desta forma, o efeito do tratamento físico no REP foi estudado fixando-se também os demais parâmetros (protease alcalina na relação E:S de 10:100, concentração de matéria-prima de 1:5 p/v, temperatura de 50 °C). O tratamento físico foi estudado utilizando ultra-turrax a 16.000 rpm e ultra-som a 120 W, ambos por 5, 10 e 15 min, sendo que em uma amostra não foi aplicado qualquer tipo de tratamento físico.

3.2.4.1 Efeito do tempo de tratamento

Como pode ser visto na Tabela I.2, o tempo de tratamento não influenciou o REP. Assim, ao se comparar os extratos para os quais foram utilizados diferentes tempos de ação do ultra-turrax, observa-se que não houve diferenças significativas nos valores de REP, cujo valor médio foi de 57,6%. O mesmo ocorreu quando comparados os extratos para os quais empregou-se o ultra-som com tempos diferentes de ação, tendo obtido o valor médio de 55,0%.

Tabela I.2 – Efeito do tratamento físico no rendimento de extração protéica

Tipo de Tratamento	Tempo (min)	Rendimento de extração Protéica (%)
Sem tratamento	-	60,3 ^a
Ultra-turrax	5	57,6 ^b
	10	57,2 ^b
	15	58,1 ^b
Ultra-som	5	55,1 ^c
	10	54,9 ^c
	15	55,1 ^c

Os resultados representam a média das repetições. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Resultados semelhantes (46,9% de rendimento) foram obtidos por WANG & WANG (2004b), ao estudarem o efeito do tempo de ação do ultra-som para aumentar o rendimento de extração do amido em farinha de arroz comercial, utilizando a uma potência de 187W e tempos de 30 e 60 min. Os autores observaram nesse experimento que o tempo de ação não alterou o rendimento.

3.2.4.2 Efeito do tipo de tratamento

Para avaliar esse parâmetro, deve-se comparar os extratos em que se utilizaram o ultra-turrax e o ultra-som no mesmo tempo de tratamento. Observa-se que, em todos os casos, os resultados obtidos com o ultra-turrax foram ligeiramente superiores que os do ultra-som (Tabela I.2).

TANG et al. (2002) também investigaram o efeito do tipo de tratamento físico sobre o rendimento de extração protéica do farelo desengordurado de arroz. Neste caso, as diferenças observadas foram mais acentuadas do que as do presente estudo, uma vez que o REP para o ultra-som foi de 26,3%, enquanto que para o liquidificador de alta velocidade foi de 52,8%.

3.2.4.3 Comparação: com e sem tratamento físico

Comparando entre si os melhores resultados de REP, obtidos com tratamento físico (ultra-turrax) e sem tratamento, mantendo-se as demais condições constantes, observa-se na Tabela I.2 que o emprego do tratamento físico não foi vantajoso, uma vez que a amostra sem tratamento apresentou resultado significativamente superior (60,3%) ao da amostra com tratamento (57,6%, em média).

Resultados semelhantes foram relatados por TANG et al. (2002), ao tratar o farelo desengordurado de arroz com ultra-som. De acordo com os autores, este tratamento não influenciou significativamente no REP. Por outro lado, também investigaram o emprego de um liquidificador de alta velocidade com o objetivo de aumentar a extração das proteínas, e verificaram que a extração protéica sem tratamento extraiu 48,4% das proteínas do farelo de arroz, enquanto que com a ação do tratamento físico, o rendimento aumentou para 52,8%.

3.2.5 Efeito da relação enzima:substrato e da concentração da matéria-prima

Para avaliar esses parâmetros, a extração protéica foi realizada sem tratamento físico, uma vez que este foi mais vantajoso para o REP. Os outros parâmetros empregados foram fixados (protease alcalina, pH 10,5 e temperatura de 50 °C) variando-se a relação E:S e a concentração de matéria-prima.

Fixando as mesmas concentrações de matéria-prima (1:3 p/v, 1:5 p/v e 1:10 p/v) entre os extratos estudados, pode-se avaliar o efeito da relação E:S comparando os extratos com valores E:S de 5:100 e 10:100. Verifica-se através da Tabela I.3 que, para todos os casos, o emprego de maior relação E:S foi mais vantajoso, pois levou ao maior REP, tendo os valores variado de 43,7 para 47,9%, de 53,6 para 60,3% e de 57,8 para 63,4% nas concentrações de matéria-prima de 1:3, 1:5 e 1:10 p/v, respectivamente.

Tabela I.3 – Efeito da concentração de matéria-prima e da relação enzima:substrato no rendimento de extração protéica

Concentração de matéria-prima (p/v)	Relação E:S	Rendimento de extração Protéica (%)
1:3	5:100	43,7 ^f
	10:100	47,9 ^e
1:5	5:100	53,6 ^d
	10:100	60,3 ^b
1:10	5:100	57,8 ^c
	10:100	63,4 ^a

Relação E:S = relação enzima:substrato. Os resultados representam a média das repetições. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

ANSHARULLAH & CHESTERMAN (1997), relataram o mesmo efeito benéfico relacionado ao aumento da 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 16,99 a 47,64% de nitrogênio.

EUBER et al. (1991) obtiveram resultados semelhantes ao estudar o efeito da concentração da enzima no REP. Quando os autores dobraram a concentração de pancreatina (de 1 para 2%), houve um aumento de 71,2 para 75,5% no REP.

Para avaliar o efeito da concentração de matéria-prima no REP, devem ser observados os extratos em que se utilizou a relação E:S de 10:100, visto que esta proporcionou um maior REP quando comparada com a relação E:S de 5:100.

Observa-se, na Tabela I.3, que quanto menor a concentração da matéria-prima, maior foi o REP, uma vez que os valores obtidos foram de 47,9, 60,3 e 63,4% nas concentrações de matéria-prima de 1:3, 1:5 e 1:10 p/v, respectivamente. Este resultado 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 a base de arroz.

3.3 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS

Os valores de REP obtidos no presente trabalho variaram de 28,6 a 63,6%, sendo que, na grande maioria das condições testadas, obteve-se um REP acima de 50%. O valor máximo para REP atingido ficou em torno de 63,5%, para os extratos em que se empregou a protease alcalina a 50 °C, no pH 10,5 ou 11,0, sem ou com ultraturrax a 16.000 rpm/5 min, nas relações E:S de 10:100 e concentrações de matéria-prima de 1:10 ou 1:5 (p/v), respectivamente. Como pode ser visto nos relatos abaixo, estes resultados estão dentro da faixa dos valores reportados para a maioria dos trabalhos encontrados na literatura, para o rendimento da extração enzimática das proteínas de arroz e de seus subprodutos (EUBER et al., 1991; ANSHARULLAH & CHESTERMAN, 1997; TANG et al., 2002).

EUBER et al. (1991), ao desenvolverem um método enzimático para produção de concentrado protéico solúvel de arroz utilizaram, primeiramente, uma alfa-amilase para solubilizar e isolar o amido para, em seguida, extrair enzimaticamente as proteínas usando diferentes tipos de proteases. Esses autores obtiveram rendimentos de extração que variaram de 17 a 75,5% dependendo do tipo de protease empregada (17% para papaína, 33,5% para protease bacteriana neutra, 47% para protease bacteriana alcalina e 75,0% para pancreatina). Embora o uso da pancreatina tenha proporcionado um rendimento mais elevado do que o do presente trabalho, o

tratamento prévio com amilase elevaria os custos do processo, especialmente quando adaptado para larga escala.

TANG et al. (2002) obtiveram um rendimento de extração protéica em torno de 53%, ao utilizarem uma protease de *Aspergillus* sp (Amano P), seguida de tratamento físico (liquidificador de alta velocidade) no farelo de arroz desengordurado. ANSHARULLAH & CHESTERMAN (1997), aplicando carboidrases isoladas ou combinadas, na extração de proteínas do farelo de arroz, também obtiveram rendimentos que variaram de 25,94 a 57,89% em termos de nitrogênio extraído, dentro da faixa da maioria dos valores aqui obtidos. Os resultados reportados por esses autores reforçam que os rendimentos de extração protéica em produtos de arroz são relativamente inferiores quando comparados a outros cereais.

Em pesquisa visando à utilização do fubá de milho como matéria-prima para a produção de suplementos nutricionais diversos, CAPOBIANGO et al. (2006a) extraíram enzimaticamente as proteínas usando a mesma protease alcalina empregada. Os resultados reportados pelos autores foram superiores aos aqui encontrados, tendo o rendimento de extração variado de 71,5 a 86,8%.

A extração incompleta das proteínas do arroz em relação às proteínas do fubá de milho, provavelmente se deve à interferência da matriz (FISCHER et al., 2001). No caso das proteínas do arroz, a presença de ligações dissulfídicas e interações não covalentes entre as cadeias polipeptídicas e/ou cadeias polipeptídicas e outros constituintes, como lipídeos e carboidratos, contribui para a sua baixa solubilidade, o que explicaria a dificuldade encontrada para a sua extração (WANG et al., 2000). Com relação à principal fração protéica do arroz, as glutelinas, pode-se, ainda acrescentar que a exata razão para a sua insolubilidade não é bem conhecida. Entretanto, muitas investigações sugerem que fatores, tais como a extensa agregação protéica, a presença de pontes de dissulfeto e a glicosilação podem ser responsáveis pela sua insolubilidade (HAMADA, 1997).

Quanto ao teor de proteínas do resíduo obtido na extração protéica, este variou de 2,87 a 5,59 %. Nos demais relatos encontrados na literatura, os valores obtidos para o teor de proteínas do resíduo foram inferiores aos do presente trabalho. Assim, LUMDUBWONG & SEIB (2000) e AGBOOLA et al. (2005), trabalhando com arroz em grão e WANG & WANG (2004a) com farinha de arroz, obtiveram 0,50, 0,15 e 0,55% de proteína em seus resíduos, respectivamente. CAPOBIANGO et al. (2006a) encontraram valores entre 1,2 e 2,3%, nos resíduos obtidos após a extração enzimática das proteínas de fubá de milho. As diferenças encontradas estão relacionadas às

variações de matéria-prima (tipo e forma em que se encontram), método de extração e enzima utilizada.

4 CONCLUSÃO

O método enzimático de extração das proteínas da farinha comercial de arroz, apresentou melhor performance ao se empregar a protease alcalina em relação à neutra. O estudo do efeito de diversos parâmetros mostrou que o emprego do tratamento físico da amostra não foi vantajoso para o REP, enquanto que a ação da temperatura, do pH, da concentração da amostra e da relação E:S influenciaram de forma variada no REP. O melhor resultado (63,4%) foi obtido ao se utilizar a concentração inicial de matéria prima a 1:10 (p/v), sem tratamento físico, pH 10,5, com a protease alcalina na relação E:S de 10:100, a 50 °C.

CAPÍTULO II

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

RESUMO

Visando o preparo de farinha de arroz, com baixo teor de fenilalanina (Phe), para ser introduzido na dieta de fenilcetonúricos, extraiu-se, inicialmente, as proteínas que foram, posteriormente, hidrolisadas pela ação de diversas proteases. O carvão ativado (CA) foi empregado como meio adsorvente e alguns parâmetros foram avaliados, tais como, tipo de enzima, relação enzima:substrato (ES), relação proteína:CA, tipo e modo de emprego do CA. A eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor de Phe livre na farinha de arroz e em seus hidrolisados, após tratamento com CA. O CA mostrou-se eficaz na remoção de Phe, obtendo-se percentuais de remoção acima de 70%, para a grande maioria das amostras. Para os diversos parâmetros estudados, o melhor resultado foi encontrado ao se empregar a papaína na relação E:S de 4:100; relação proteína:CA de 1:88; e o emprego de três tipos de CA, tendo atingido 94,1% de remoção e o teor final de Phe de 82,5 mg/100 g de hidrolisado.

Palavras-chave: Arroz; carvão; enzimas; fenilalanina; hidrolisados; proteínas.

ABSTRACT

PREPARATION OF RICE FLOUR PROTEIN HYDROLYSATES WITH LOW PHENYLALANINE CONTENT. With the aim of producing rice flour with low phenylalanine (Phe) content to be introduced in phenylketonuric's diet, the proteins were first extracted and then hydrolysed by the action of several proteases. The activated carbon (AC) was used as adsorbent and some parameters were evaluated, such as enzyme type; enzyme:substrate ratio (E:S); protein:AC ratio; type and mode of using AC. The efficiency of the removal was evaluated by second derivative spectrophotometry (SDS), measuring the free Phe content in the rice flour and in their hydrolysates after AC treatment. AC showed to be efficient for removing Phe, leading to values above 70% for most of the samples. The effect of different parameters were studied and the best result was found when papain was used in a E:S of 4:100; protein:AC of 1:88; using the three types of AC, obtaining 94.1% of removal and a final Phe content of 82.5 mg/100 g of hydrolysate.

Keywords: Rice; carbon; enzymes; phenylalanine; hydrolysates; protein.

1 INTRODUÇÃO

A produção de hidrolisados enzimáticos para formulações em nutrição clínica ganhou ênfase nos anos 70, como resultado de pesquisas que demonstravam as vantagens da absorção de di- e tripeptídeos sobre os grandes peptídeos ou proteínas intactas (HENN & NETO, 1998).

A inclusão de hidrolisados protéicos em formulações específicas é uma área que vem crescendo ao longo dos últimos anos. Essas formulações têm sido utilizadas em países desenvolvidos na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite e má-absorção. Pacientes com distúrbios digestivos, de absorção e metabólicos, com má-nutrição associada com câncer, trauma e encefalopatias hepáticas e idosos também têm, igualmente, feito uso dessas formulações. Além disso, hidrolisados protéicos são preferencialmente consumidos por pessoas com alergia a determinadas proteínas, visto que a redução no tamanho dos peptídeos está relacionada com a diminuição da imunogenicidade. Outra aplicação destes hidrolisados relaciona-se ao seu uso na dieta de pacientes que apresentam distúrbios no metabolismo de aminoácidos, como a fenilcetonúria (FREITAS et al., 1993; FRØKJAER, 1994; CLEMENTE, 2000; GUADIX et al., 2000).

O interesse do laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG em hidrolisados protéicos está associado à preparação de suplementos dietéticos para diversas finalidades. Neste sentido, diferentes fontes protéicas, enzimas e condições hidrolíticas têm sido testadas a fim de se obter um perfil peptídico apropriado do ponto de vista nutricional, ou seja, com elevado teor de oligopeptídeos (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2004; BARBOSA et al., 2004; DE MARCO et al., 2005; LOPES et al., 2005a; MORAIS et al., 2005; SILVA et al., 2005a; SOARES et al., 2006; DELVIVO et al., 2006; BIZZOTTO et al., 2006a, b).

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 Phe em Tyr. A elevação de Phe no sangue, acima de 10 mg/dl, permite a passagem em quantidade excessiva para o Sistema Nervoso Central, no qual o acúmulo tem efeito tóxico. O retardo mental é a mais importante seqüela dessa doença. O adequado aporte protéico não é conseguido pela alimentação convencional, sem que quantidades excessivas de Phe

sejam ingeridas por esses pacientes. A introdução de uma dieta reduzida em Phe na alimentação da criança, no primeiro mês de vida, pode evitar significativamente o retardo mental (MIRA & MARQUEZ, 2000; MALLOY-DINIZ et al., 2004, HAMMAN et al., 2005; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; WASSERSTEIN et al., 2006).

Os hidrolisados protéicos com teor reduzido de Phe são preparados a partir da ação de uma protease, que expõe a Phe, permitindo sua remoção por um meio adsorvente (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999). Diversos autores estudaram a produção desses hidrolisados em escala laboratorial, alguns em escala piloto (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDZIAK, 1993).

O CA e uma resina de adsorção foram testados, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, tendo sido eficientes na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de fontes diversas e empregando condições de hidrólises variadas (DE MARCO et al., 2005; LOPES et al., 2005b; SILVA et al., 2005a, b; BIZZOTTO et al., 2006a, b; CAPOBIANGO et al., 2006b; DELVIVO et al., 2005, 2006; SOARES et al., 2006).

A quantificação do teor de Phe final pode ser feita por diferentes métodos, destacando-se a espectrofotometria derivada segunda (EDS) (GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a, b; ROJAS et al., 1998). A EDS tem sido utilizada, em diversos estudos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, para a quantificação de Phe em hidrolisados protéicos obtidos pela ação de várias proteases e fontes protéicas (SILVESTRE et al., 1993; DELVIVO et al., 2005; DE MARCO et al., 2005; LOPES et al., 2005b; SILVA et al., 2005a, b; BIZZOTTO et al., 2006a, b; CAPOBIANGO et al., 2006b; SOARES et al., 2006).

Levando-se em conta que o arroz (*Oryza sativa* L.) não só é considerado um dos principais alimentos para a população brasileira, mas também para a população de vários outros países, além de ser uma das mais importantes fontes de nutrientes devido a seu consumo diário (HEINEMANN et al., 2005), seria importante remover grande parte da Phe de suas proteínas, de maneira a permitir a sua irrestrita utilização na dieta de fenilcetonúricos.

O presente trabalho representa um passo relevante neste sentido, uma vez que teve como objetivo otimizar a remoção de Phe de hidrolisados protéicos da farinha de arroz, verificando-se o efeito de diversos parâmetros neste processo, tais como, tipo de enzima, relação enzima:substrato (E:S), relação proteína:CA, tipo de CA e modo de emprego do CA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A farinha comercial de arroz (9,3% de umidade, 7,3% de proteína, 0,8% de lipídeos, 0,4% de cinzas e 83,0% de carboidratos) foi fornecida pela FERLA - L. FERENCZI Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, SP, Brasil). A protease de *Bacillus licheniformis* (Protemax[®] 580 L) cedida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil) é uma serina-endopeptidase (EC 3.4.21.14), atividade 580 KDU/g, pH ótimo de 9,5 e temperatura ótima de 60 °C³. A protease de *Bacillus stearothermophilus* (Corolase[®] TS) (metalo-endopeptidase – EC 3.4.24.28, atividade 220 UHB/g, pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 70 °C)⁴, 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)⁵, a papaína (Corolase[®] L10) (cisteína-endopeptidase de origem vegetal da *Carica papaya* – EC 3.4.22.2, atividade 850 UHB/g, pH ótimo entre 3 e 9, temperatura ótima entre 50 e 70 °C)⁶, a protease do *Bacillus subtilis* (Corolase[®] N) (metalo-endopeptidase – EC 3.4.24.28, atividade 600 UHB/g, pH ótimo entre 7 e 7,5, temperatura ótima de 55 °C)⁴, a protease do *Bacillus subtilis* (Corolase[®] 7089) (metalo-endopeptidase – EC 3.4.24.28, atividade 800 UHB/g, pH ótimo entre 7 e 7,5, temperatura ótima de 55 °C)⁴ e a protease do *Aspergillus sojae* (Corolase[®] LAP) (amino-exopeptidase – EC 3.4.11.1, atividade 350 LAP/g, pH ótimo entre 6 e 9, temperatura ótima entre 55 e 70 °C) foram doadas pela 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). Os demais reagentes foram de grau analítico.

³ PROZYN. Especificações técnicas de enzimas. s.n., 2005. 2p

⁴ AB ENZYMES. Corolase[®] TS: *Description and Specification*. Rev. Nr. 00. 2002, 2p.

⁵ AB ENZYMES. Corolase[®] PP, Corolase[®] 7089, Corolase[®] LAP, Corolase[®] N: *Description and Specification*. Rev. Nr. 02. 2001, 8p.

⁶ AB ENZYMES. Corolase[®] L 10: *Description and Specification*. Rev. Nr. 03. 2003, 2p.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Extração das proteínas

Nesta etapa, foi utilizado o método de extração enzimática das proteínas da farinha de arroz desenvolvido no capítulo 1, que proporcionou as melhores condições de extração. Assim, a farinha de arroz foi suspensa em água destilada na proporção de 1:5 (p/v) e benzoato de sódio foi adicionado em uma quantidade tal para se obter uma concentração final de 0,1% (p/v). Após o ajuste do pH da suspensão para 10,5, utilizando uma solução de NaOH a 3 mol/L, esta foi levada a um banho de vaselina líquida a 50 °C, sobre agitador magnético, com agitação constante. Estabilizada a temperatura da suspensão, adicionou-se a enzima Protamax[®] 580 L (*Bacillus licheniformis*) na relação enzima:substrato (E:S) de 1:10, e a extração enzimática foi realizada por 5 h. A suspensão foi, então, resfriada até 25 °C e centrifugada por 15 min a 1700 x g. O extrato protéico de farinha de arroz (EPFA) 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 EPFA no mesmo recipiente. O EPFA e o resíduo foram acondicionados em recipientes hermeticamente fechados sob refrigeração, até o momento de análise.

Para se determinar os teores de Phe (LOPES et al., 2005b) e de proteína (AOAC, 1995) do resíduo, o mesmo foi submetido ao processo de liofilização (Liofilizador Freezone, modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA).

2.2.2 Preparo dos hidrolisados

Foram preparados 17 hidrolisados enzimáticos, tendo sido variado os seguintes parâmetros: tipo de enzima; relação enzima:substrato (E:S), relação proteína:CA e tipo de CA (Tabela II.1).

Inicialmente, 100 mL do EPFA foram colocados em um erlenmeyer e o pH foi medido ($7,4 \pm 0,1$). O EPFA foi levado em banho de vaselina líquida a 50 °C, sobre agitador magnético, com agitação constante. Estabilizada a temperatura, a enzima foi adicionada para se obter a relação E:S desejada (Tabela II.1). Após 5 h, a reação foi interrompida por aquecimento em banho-maria a 80 °C, por 20 min.

Para as determinações dos teores de Phe (LOPES et al., 2005b) e de proteína (AOAC, 1995) nos hidrolisados, os mesmos foram submetidos ao processo de liofilização (Liofilizador Freezone, modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, EUA).

Tabela II.1 – Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos da farinha de arroz e na remoção de fenilalanina

Hidrolisados	Hidrólise enzimática		Remoção de Phe	
	Protease	E:S	Relação proteína:CA	Tipo de CA
01	Papaína	4:100	1:88	A
02	Papaína	4:100	1:88	B
03	Papaína	4:100	1:88	C
04	Papaína	4:100	1:88	A e B
05	Papaína	4:100	1:88	A e C
06	Papaína	4:100	1:88	B e C
07	Papaína	4:100	1:88	A, B e C
08	Papaína	3:100	1:88	A, B e C
09	Papaína	2:100	1:88	A, B e C
10	Papaína	1:100	1:88	A, B e C
11	Papaína	4:100	1:44	A, B e C
12	Papaína	4:100	1:22	A, B e C
13	<i>B. stearothermophilus</i>	4:100	1:88	A, B e C
14	<i>B. subtilis</i> (600UHB/g)	4:100	1:88	A, B e C
15	<i>B. subtilis</i> (840 UHB/g)	4:100	1:88	A, B e C
16	Pancreatina	4:100	1:88	A, B e C
17	<i>A. sojæ</i>	4:100	1:88	A, B e C

E:S = Relação enzima:substrato; CA = Carvão ativado; Tipos de CA = A: 20x 50 mesh, B: 12 x 25 mesh, e C: 6 x 12 mesh.

2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos de farinha de arroz pela utilização do CA, como meio adsorvente. Foi empregado o procedimento de passagem por coluna, descrito por SOARES et al. (2004a). Dois gramas de CA foram hidratados com água purificada 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 seqüência, 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. Alguns dos parâmetros empregados na remoção de Phe, estão apresentados na Tabela II.1.

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 arroz e seus hidrolisados, após tratamento com CA, empregando-se a espectrofotometria derivada segunda (LOPES et al., 2005b). As amostras foram submetidas à hidrólise ácida (HCl a 5,7 mol/L, 110 °C, 24 h) e, após ajuste do pH para 6,0, com solução de fosfato de sódio bibásico (1 mol/L), foram submetidas às leituras de absorvância na faixa de 250 a 280 nm. Foram traçados os espectros de derivada segunda (Espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Hanslope, Inglaterra) e a área do terceiro pico negativo foi usada para calcular a quantidade de Phe presente nas amostras, empregando-se a curva padrão. O software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, EUA) foi utilizado para traçar os espectros da derivada segunda.

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

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

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

sendo,

A = Teor de Phe na farinha de arroz.

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

C = Teor de proteína na farinha de arroz.

D = Teor de proteína no hidrolisado protéico.

2.2.5 Efeito de alguns parâmetros sobre a remoção de fenilalanina

O efeito do tipo de enzima foi testado empregando-se quatro diferentes proteases de microorganismos, uma pancreatina e uma papaína (Tabela II.1). Para o estudo da influência da relação E:S foram testados os valores de 4:100, 3:100, 2:100 e 1:100. O efeito da relação proteína:CA foi estudado nas seguintes proporções 1:88, 1:44 e 1:22. Finalmente, estudou-se para relação proteína:CA de 1:88, o efeito do tipo de CA e do modo de emprego do CA. Assim, cada tipo de CA foi empregado da seguinte maneira: isoladamente (A ou B ou C), em associação dois a dois (A e B; A e C; B e C) e em associação com os três tipos (A, B e C), mantendo a mesma quantidade total de CA (2g). Para a montagem da coluna contendo mais de um tipo de CA, colocou-se na parte superior o de maior granulometria.

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. A mesma análise foi empregada para comparar, separadamente, o efeito dos parâmetros utilizados na remoção de fenilalanina. Não tendo sido observada nenhuma diferença na estatística das duas análises realizadas, optou-se por utilizar apenas a análise estatística dos dados consolidados. A curva padrão foi obtida por análise de regressão (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Na Tabela II.2, estão apresentados os resultados obtidos para a remoção de Phe dos diferentes hidrolisados protéicos da farinha comercial de arroz. Os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de

Phe (mg Phe/100 g de HPFA), 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 (ANVISA, 2003). O teor de Phe na farinha de arroz foi de 283,1 mg Phe/100 g (com 6,61% de proteína).

Tabela II.2 – Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de farinha de arroz.

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg Phe/100 g de HPFA) ¹
01	82,6 ^e	243,2 ^m
02	73,0 ^h	377,3 ^h
03	25,7 ^p	1038,4 ^a
04	86,1 ^c	194,3 ^o
05	76,8 ^g	324,2 ⁱ
06	63,8 ^m	505,9 ^d
07	94,1 ^a	82,5 ^q
08	90,7 ^b	130,0 ^p
09	71,7 ⁱ	395,5 ^g
10	62,7 ⁿ	521,3 ^c
11	78,4 ^f	301,9 ^j
12	44,0 ^o	782,6 ^b
13	66,1 ^l	473,8 ^e
14	76,3 ^g	331,2 ⁱ
15	79,2 ^f	290,7 ^l
16	69,1 ^j	431,8 ^f
17	85,1 ^d	208,2 ⁿ

HPFA = Hidrolisado protéico de farinha de arroz. ¹ Teor de Phe, em matéria úmida, nos hidrolisados, após liofilização. Os valores referem-se ao teor de Phe, em matéria úmida, nos hidrolisados, após liofilização. 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.

Como pode ser observado na Tabela II.2, o uso do CA mostrou-se eficaz na remoção de Phe dos hidrolisados protéicos de farinha de arroz, tendo o percentual de remoção variado de 25,7 a 94,1%, e o teor final de Phe de 82,5 a 1038,4 mg Phe/100 g de HPFA, dependendo dos parâmetros empregados. Estes seriam os teores de Phe

numa formulação dietética contendo apenas hidrolisados protéicos de farinha de arroz. Neste caso, o HPFA 07 (82,5 mg Phe/100 g de HPFA) poderia ser utilizado, uma vez que o seu teor de Phe estaria dentro do limite permitido pela legislação brasileira, que é de 100 mg Phe/100 g de produto (BRASIL, 2002).

Considerando que os suplementos nutricionais, de uma maneira geral, contêm 15% de proteína (dieta hipercalórica com 1,5 kcal/mL e elevado teor protéico), que poderiam ser fornecidas pelos hidrolisados protéicos de farinha de arroz liofilizados, o teor de Phe cairia para 37,9 a 477,3 mg/100 g de produto. Neste caso, os hidrolisados 04, 07, 08 e 17 poderiam representar a base protéica destes suplementos nutricionais, uma vez que as formulações preparadas com estes hidrolisados apresentaram teores de Phe de 89,3, 37,9, 59,7 e 95,7 mg/100 g de produto, respectivamente, valores estes situados dentro do limite máximo fixado pela legislação brasileira (BRASIL, 2002).

Quando o interesse for o de reconstituir a farinha de arroz, a partir da mistura de um hidrolisado protéico com baixo teor de Phe com o resíduo (amido) obtido da extração protéica, deve-se levar em consideração a composição da farinha de arroz (USP, 2006), a fim de reproduzir o mais próximo possível suas características químicas e nutricionais. Sendo assim, deve-se considerar também, os teores de proteína e de Phe que foram de 2,87 g/100 g e 122,9 mg Phe/100 g no resíduo de extração protéica e 32,63 g/100 g e 82,5 mg Phe/100 g no HPFA 07 (hidrolisado com menor teor de Phe dentre os obtidos), respectivamente, após serem submetidos ao processo de liofilização. Levando-se em conta que o teor máximo de Phe permitido pela legislação brasileira para pacientes fenilcetonúricos é de 0,1 g por 100 g de produto (BRASIL, 2002), sugere-se para reconstituição de 100 g de farinha de arroz, a utilização de 70 g do resíduo (amido) da extração protéica, contribuindo neste caso com um valor protéico de 2,01 g/100 g e um teor de Phe de 86,0 mg Phe/100 g. A este resíduo, poderiam ser incorporados 15 g do HPFA 07 (teor protéico de 4,89 g/100 g e teor de Phe de 12,4 mg/100 g), para não ultrapassar o limite permitido de Phe, obtendo-se, assim, 6,9 g/100 g de proteínas, valor este que se encontra próximo aos teores de proteína na farinha de arroz de acordo com os reportados pela USP (2005) e um teor de Phe de 98,4 mg/100 g do produto final. Para complementar os outros constituintes da farinha de arroz, propõe-se a adição de lipídeos, fibras, minerais e vitaminas em quantidades próximas às reportadas pela tabela da USP (2005), cujos valores são iguais a 0,8, 0,5, 0,4 e 0,01%, respectivamente. Por fim, para complementar os 100 g da formulação, poderia ser adicionado o amido modificado.

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 (LOPES et al., 2005b; SOARES et al., 2006).

Em estudos realizados no laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, o CA foi utilizado com eficiência para a remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (93,6 a 99%) (SOARES et al., 2004a; LOPES et al., 2005b), de soro de leite em pó (75 a 99 %) (DE MARCO et al., 2005; DELVIVO et al., 2005, 2006; SILVA et al., 2005a), de arroz (85 a 100%) (BIZZOTTO et al., 2006a,b) e de fubá de milho (68,63 a 97,55%) (CAPOBIANGO et al., 2006b). Nestes estudos, foram utilizadas diferentes enzimas e condições hidrolíticas, além de ter sido empregado apenas um tipo de CA de menor granulometria (20 x 60 mesh), com exceção de CAPOBIANGO et al. (2006b), que utilizaram os mesmo tipos de CA (A, B e C) utilizados neste trabalho, isolados ou em associação e BIZZOTTO et al. (2006a,b) que utilizaram o mesmo carvão tipo A, isoladamente. Apesar das variações nas condições utilizadas, os resultados aqui encontrados foram semelhantes aos dos citados acima, exceto para os hidrolisados 03 e 12, cujas remoções de Phe foram de apenas 25,7 e 44,0%, respectivamente.

Outros autores também relataram níveis de remoção de Phe próximos aos obtidos no presente trabalho para os hidrolisados 07 e 08. Assim, LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) removeram 92% de Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio obtidos pela ação de uma protease do *Aspergillus oryzae* (Enzimas y Productos Químicos S.A.) seguida da papaína (Hervi S.A.), tratados com CA. Empregando um sistema de três enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase, Sigma-Aldrich), MOSZCZYNSKI & IDZIAK (1993) removeram, através do CA, 89,5% de Phe de hidrolisados de caseína. Por outro lado, COGAN et al. (1981) alcançaram uma remoção de Phe de 36%, em hidrolisados de caseína preparados pela ação da enzima Rhozima 62 (Rhom and Hass), valor este, que está mais próximo dos hidrolisados 03 e 12 aqui obtidos.

3.2 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

3.2.1 Efeito do tipo de enzima

Para a avaliação do efeito do tipo de enzima, foram comparados os hidrolisados 07, 13, 14, 15, 16 e 17. Na Tabela II.2, pode ser notado que o uso da papaína (HPFA 07) proporcionou o maior percentual de remoção de Phe (94,1%) e, portanto, o menor teor de Phe final (82,5 mg Phe/100 g de HPFA), enquanto que a protease de *B. stearothermophilus* (HPFA 13) promoveu a menor remoção de Phe (66,1%) e, portanto, o maior teor final de 477,3 mg Phe/100 g de HPFA. Este melhor desempenho da papaína poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que as condições empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos (pH $7,4 \pm 0,1$) estão dentro de suas faixas de pH (3 – 9) e temperatura (50 – 70 °C) ótimos, ao contrário do que aconteceu para as demais enzimas, para as quais o pH (*B. stearothermophilus* – pH ótimo = 8 e pancreatina – pH ótimo = 9) ou a temperatura (*A. sojae* – temperatura ótima = 55 a 70 °C, *B. stearothermophilus* – temperatura ótima = 70 °C e *B. subtilis* – temperatura ótima = 55°C) utilizados, não correspondem aos seus valores ótimos.

Quanto ao emprego do mesmo tipo de enzima (*B. subtilis*), apresentando, entretanto, atividades enzimáticas distintas (Hidrolisados 14 e 15), observa-se na Tabela II.2 que a remoção de Phe foi maior para aquela com maior atividade (HPFA 15). Isto já era esperado, uma vez que uma maior atividade enzimática pode levar a uma maior exposição de Phe o que facilitaria a sua posterior remoção pelo CA.

Em estudo realizado no laboratório de Bromatologia/Pesquisa, SOARES et al. (2004a), também avaliaram o efeito do tipo de enzima na remoção de Phe em hidrolisados protéicos de leite em pó pelo emprego do CA. Ao utilizar a papaína (BIOBRÁS) e pepsina (Sigma-Aldrich), esses autores não encontraram diferenças estatísticas nos percentuais de remoção de Phe, que foram de 97,6 e 97,1%, respectivamente.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores relacionando o tipo de enzima com a remoção de Phe de hidrolisados protéicos.

3.2.2 Efeito da relação enzima:substrato

Visando manter constantes os demais parâmetros, para se avaliar o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe, foram comparados entre si, os seguintes hidrolisados: HPFA 07 (E:S = 4:100), HPFA 08 (E:S = 3:100), HPFA 09 (E:S = 2:100) e HPFA 10 (E:S = 1:100). Pode-se observar na Tabela II.2 que quanto maior a relação E:S utilizada (4:100), maior foi também a remoção de Phe (94,1%).

Resultados semelhantes aos citados acima foram obtidos, anteriormente, em estudos com cereais realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa. Assim, BIZZOTTO et al. (2006a) trabalhando com arroz em grãos e com uma pancreatina (Corolase® PP, AB Enzymes), mostraram que o emprego da relação E:S de 2:100 levou a uma remoção de Phe (99%) bem superior da que foi obtida para uma E:S de 1:100 (90%). O mesmo foi observado por CAPOBIANGO et al. (2006b), que estudaram esse parâmetro em hidrolisados protéicos obtidos a partir do fubá de milho utilizando também uma pancreatina (Corolase® PP, AB Enzymes). Esses autores relataram que o percentual de remoção foi de 68,72% e de 82,52% quando se utilizou uma relação E:S de 1:100 e de 2:100, respectivamente.

Além dos cereais, outras fontes protéicas foram estudadas anteriormente no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, tais como leite em pó desnatado e soro de leite em pó. Diversas enzimas e condições de hidrólise protéica foram testadas nestes trabalhos, e os valores reportados foram bastante variados sendo que, em alguns casos, o emprego de maior relação E:S levou a uma maior remoção de Phe como aconteceu no presente trabalho. Entretanto, em outros casos, este tratamento foi prejudicial ou não afetou a remoção de Phe (SOARES et al., 2004a; DELVIVO et al., 2005, 2006; DE MARCO et al., 2005; LOPES et al., 2005b; SILVA et al., 2005a).

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

Não foram encontrados na literatura trabalhos de outros autores estudando o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz.

3.2.3 Efeito da relação proteína:CA

A avaliação do efeito da proteína:CA sobre a remoção de Phe foi realizada comparando-se entre si, os hidrolisados 07 (proteína:CA = 1:88), 11 (proteína:CA = 1:44) e 12 (proteína:CA = 1:22). Pode-se observar na Tabela II.2 que, quanto menor a relação proteína:CA (maior quantidade de carvão) utilizada, maior foi o percentual de remoção de Phe, sendo os valores obtidos de 94,1% (1:88), 78,4% (1:44) e 44,0% (1:22).

De todos os trabalhos encontrados na literatura, apenas dois, desenvolvidos no laboratório de Bromatologia/Pesquisa, avaliaram o efeito da relação proteína:CA sobre a remoção de Phe. Assim, resultados semelhantes ao do presente trabalho foram relatados por CAPOBIANGO et al. (2006b), ao utilizar uma pancreatina (Corolase® PP, AB Enzymes) para o preparo de hidrolisados protéicos a partir do fubá de milho. Estes autores observaram que o emprego da relação de 1:88,5, 1:16 e 1:8, levou a remoção de Phe da ordem de 84,0, 62,4 e 54,1%, respectivamente. No entanto, SOARES et al. (2004a) observaram que, ao se utilizar as relações de 1:118, 1:90 e 1:60 em hidrolisados de leite em pó preparados pela ação de duas proteases (*Aspergillus oryzae*, tipo XXIII, Sigma-Aldrich, e papaína, BIOBRÁS), não houve diferença significativa nos seus resultados, com uma média de remoção de Phe de 97%.

3.2.4 Efeito do tipo e modo de emprego do carvão ativado

O efeito do tipo de CA pode ser melhor avaliado na Tabela II.3. Comparando-se os hidrolisados 01, 02 e 03, nos quais foram utilizados os três tipos de CA isoladamente, nota-se que quanto menor a granulometria do CA, maior foi a remoção de Phe, sendo os valores obtidos de 82,6% (tipo A), 73,0% (tipo B) e 25,7% (tipo C). Este resultado poderia ser explicado pelo fato de que o emprego de grânulos menores propiciaria uma maior superfície de contato entre o CA e as amostras, além de aumentar o tempo de contato, pois a velocidade de passagem dos hidrolisados pela coluna de CA é retardada.

Tabela II.3 – Efeito do tipo e do modo de emprego de carvão ativado sobre a remoção de fenilalanina

Hidrolisados	Tipo de CA	Remoção de Phe	Teor final de Phe
		(%)	(mg Phe/100 g de HPFA)
01	A	82,6 ^c	243,2 ^e
02	B	73,0 ^e	377,3 ^c
03	C	25,7 ^g	1038,4 ^a
04	A e B	86,1 ^b	194,3 ^f
05	A e C	76,8 ^d	324,2 ^d
06	B e C	63,8 ^f	505,9 ^b
07	A, B e C	94,1 ^a	82,5 ^g

HPFA = Hidrolisado protéico de farinha de arroz; CA = Carvão Ativado; Tipos de CA = A: 20x 50 mesh, B: 12 x 25 mesh, C: 6 x 12 mesh. 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.

Para a associação de 2 tipos de CA na coluna, observa-se na Tabela II.3 que a que empregou o tipo A com o tipo B foi a mais vantajosa, tendo levado à maior remoção de Phe (86,1%) do que a do tipo A com o tipo C (76,8%) e a do tipo B com o tipo C (63,8%). Comparando-se o melhor resultado desta associação (A e B) com o obtido para a associação dos 3 tipos de CA (A, B e C), fica evidente a vantagem deste último sistema, pois levou a uma remoção de Phe de 94,1%. Além disso, comparando-se este melhor resultado das associações estudadas com o melhor obtido ao se empregar isoladamente apenas um tipo de CA (tipo A = 82,6%), pode-se concluir que o modo mais vantajoso de emprego do CA consiste na associação dos 3 tipos na coluna (A, B e C).

Em trabalho realizado, anteriormente, no laboratório de Bromatologia/Pesquisa, CAPOBIANGO et al. (2006b), ao utilizarem condições experimentais semelhantes às do presente trabalho (relação E:S = 4%; temperatura de hidrólise = 50 °C; ação do calor para interromper a hidrólise e relação proteína:CA = 1:88,5), também relataram que o menor teor de Phe (149,27 mg/100 g) foi observado ao se empregar a associação dos 3 tipos de CA (A, B e C) em hidrolisados protéicos de fubá de milho. Por outro lado, estes autores não observaram diferenças significativas entre os resultados obtidos ao se empregar o tipo A isoladamente e a associação de A com B.

Deve-se ressaltar que, apesar do emprego de apenas um tipo de carvão ser economicamente mais viável, o uso da associação dos 3 tipos de CA é a que deve apresentar melhor performance prática, no caso de produção em larga escala, uma vez que reduziria a pressão em uma coluna de grande porte.

4 CONCLUSÃO

Empregando-se várias proteases para a hidrólise das proteínas da farinha de arroz, e o CA como meio adsorvente, foi possível obter hidrolisado protéico com baixo teor de Phe (82,5 mg Phe/100 g), que poderia ser utilizado na reconstituição da farinha de arroz permitindo a sua introdução na dieta de fenilcetonúricos. O melhor resultado obtido foi o que se utilizou a papaína na relação E:S de 4:100; relação proteína:CA de 1:88; e o emprego de três tipos de CA; tendo atingido 94,1% de remoção de Phe.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As condições do método enzimático empregadas na primeira etapa deste estudo permitiram extrair, em sua grande maioria, mais de 50% das proteínas da farinha de arroz. Embora em estudo realizado, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, tenha se conseguido extrair aproximadamente 85% das proteínas de arroz em grãos através do método químico, o método enzimático se torna vantajoso sob o ponto de vista de segurança alimentar, uma vez que a utilização de enzimas permite o emprego de condições mais brandas de pH e temperatura, tendo em vista que estes parâmetros são responsáveis pela formação de componentes indesejáveis com potencial toxicidade, além de perda nutricional. Sugere-se a realização de estudos que envolvam a utilização deste método em escala piloto, com o objetivo de se avaliar a sua aplicação industrial.

A melhor condição de extração enzimática testada foi aquela em que se utilizou a concentração inicial de matéria prima a 1:10 (p/v), sem tratamento físico, pH 10,5, com a protease alcalina (*Bacillus licheniformis*) na relação E:S de 10:100, a 50 °C; tendo extraído 63,4% das proteínas da farinha de arroz. Contudo, o resíduo de extração protéica, ainda apresentou um teor de proteína relativamente alto (2,87%), para que se possa ser utilizado em sua totalidade na reconstituição do arroz com baixo teor de Phe. Desta forma, propõe-se otimizar a extração das proteínas de maneira a reduzir, ao máximo, o teor protéico do resíduo.

Dando continuidade ao estudo de extração enzimática de proteínas, novas pesquisas podem, ainda, ser realizadas empregando-se outras fontes protéicas. Além disso, outras proteases, isoladas ou em associação, podem, igualmente, ser estudadas com o objetivo de aumentar o rendimento de extração e diminuir os custos do processo.

Na segunda etapa deste trabalho, o CA mostrou ser um meio eficaz para a remoção de Phe de hidrolisados de farinha de arroz, obtidos pela ação de diversas proteases, tendo atingido 94,1% de remoção. Entretanto, a quantidade necessária para obter essa remoção foi muito elevada. Sendo assim, seria de grande interesse econômico, a realização de um estudo sobre a recuperação e reutilização do CA. Além disso, o emprego de outros meios adsorventes podem ser testados para remoção de Phe, visando a redução dos custos do processo.

Durante a remoção de Phe pelo CA, os outros aminoácidos aromáticos, tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), também podem ser removidos. Propõe-se, primeiramente, que estas perdas sejam quantificadas, para que, posteriormente, pesquisas sejam realizadas para minimizar tais perdas ou que seja reincorporada ao produto final, a quantidade perdida. Propõe-se a realização do aminograma desses hidrolisados, para verificar possíveis perdas de outros aminoácidos, assim como para avaliar, com mais detalhe, o valor nutricional dessas preparações.

Sugere-se, também, a análise do perfil péptico dos hidrolisados obtidos dos extratos protéicos, empregando-se os métodos de SE-HPLC e ACF desenvolvidos por SILVESTRE et al (1994a, b), para se avaliar o teor de oligopeptídeos, importante para a qualidade nutricional destas preparações.

Dentre as condições testadas para a remoção de Phe nos hidrolisados, o melhor resultado foi obtido ao se empregar a papaína na relação E:S de 4:100; relação proteína:CA de 1:88; e o emprego de três tipos de CA, tendo atingido 94,1% de remoção e o teor final de Phe de 82,5 mg/100 g de hidrolisado. Uma vez que este hidrolisado apresenta um teor de Phe dentro do limite máximo fixado pela legislação brasileira (100 mg/100 g de produto), sugere-se uma avaliação sensorial deste produto, a fim de que o mesmo possa ser utilizado como ingrediente de uma bebida nutritiva à base de farinha de arroz, podendo futuramente, ser disponibilizado no mercado.

Tendo como finalidade a reconstituição da farinha de arroz, a partir da mistura de um hidrolisado protéico com baixo teor de Phe com o resíduo (amido) obtido da extração protéica, propõe-se que seja estudada a viabilidade de se liofilizar esta mistura a fim de se obter uma farinha de arroz com baixo teor de Phe. Propõe-se, também, um estudo de suas propriedades reológicas a fim de que a mesma possa ser utilizada em produtos de panificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, P.B. Nutrient intake and grow of infants with phenylketonuria undergoing therapy. *J. Ped. Gastr. Nutr.*, v.27, n.3, p.287-291, 1998.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S. *Protocol 1 - Phenylketonuria (PKU)*. In: CAMERON, A.M., RUSSEL, C. Ross metabolic nutrition support protocols. 3.ed. Columbia: Keziaz Strvat, 1997. p. 1-12.
- 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.
- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *J. Cereal Sci.*, v.41, n.3, p.283-290, 2005.
- ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P.A. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. *Food Rev. Int.*, v.9, n.4, p.629-655, 1993.
- 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.
- ANTONOV, V.K. *Chemistry of Proteolysis*. Berlim: Springer-Verlag, 1993. 495p.
- ANVISA (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 dez. 2003. 33p.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*. 16. ed. 3. rev. Arlington: AOAC International, 1995. 1141p.
- 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.
- BARATA, T.S.B. Caracterização do consumo de arroz no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 43, 2005, Ribeirão Preto. *Anais...* Disponível em: <<http://www.arroz.agr.br>>. Fevereiro 2005. Acesso em: 12 jul. 2005.
- 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.
- BERNARDI, C.R. *Preparo de hidrolisados protéicos e análise de aminoácidos por duas metodologias*. Santa Catarina: Centro de Ciências Agrárias da UFSC, 2000. 131p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- BEYNON, R.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes*. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 340p.

- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluation of functional properties of a blood protein. *J. Nutr.*, v.4, n.1, p.11-16, 2005.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase PP e uso do carvão ativado. *Cienc. Agrotec.*, v.30, n.2, p.308-316, 2006a.
- BIZZOTTO, C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Uso da pancreatina e do carvão ativado no preparo de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. *Rev. Tecno-Lóg.*, v.10, n.1, p.9-30, 2006b.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 222 p.
- BOYER, P.D. *The enzymes*. 3 ed. v.3. New York: Academic Press, 1971. 886p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 04 nov. 2002, p. 83.
- BRASIL. Resolução nº 12, de 12 de março de 1978. Comissão nacional de normas e padrões para alimentos – CNNPA: aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 jul. 1978, p.11499-11528.
- 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, 207p. (Tese, Doutorado em Engenharia de Alimentos).
- CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SANTIAGO E SILVA, A.L.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.26, n.5, p.884-890, 2006a.
- CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; MACHADO, M.A.A.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da corolase pp e uso do carvão ativado na obtenção de hidrolisados protéicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina. *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, v.21, n.4, p.259-266, 2006b.
- CAPOBIANGO, M.; BIZZOTTO, C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Action of pepsin on emulsifying properties of globin. *Int. J. Food Prop.*, v.9, n.2, p.357-364, 2006c.
- 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.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Otimização na produção de di e tripeptídeos em hidrolisados de caseína pela associação de enzimas: pepsina, tripsina e subtilisina. *Braz. J. Food Technol.*, v.4, p. 103-108, 2001.
- 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.
- CHRASTIL, J. Correlations between the physicochemical and functional properties of rice. *J. Agric. Food Chem.*, n.40, n.9, p.1683-1689, 1992.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, v.11, n.7, p.254-262, 2000.
- COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.*, v.32, n.5, p.459-466, 1981.
- CONNOR, M.A.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. *Cereal Chem.*, v.53, n.4, p.488-496, 1976.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v.8, n.3, p.210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; FIGUEIREDO, A.F.S.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE M.P.C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v.20, n.3, p.117-126, 2005.
- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v.1, n.2, p.94-104, 2006.
- DICKEY, L.C.; MCALOON, A.; CRAIG, J.C.; PARRIS, N. Estimating the cost of extracting cereal protein with ethanol. *Ind. Crops Prod.*, v.10, p.137-143, 1999.
- DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. *Hidrolisado protéico de pescado*. In: OGAWA, M.; MAIA, E.L. Manual de Pesca. São Paulo: Varela, 1999, 430p.
- 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.
- FANG, F.W.; AGUILAR, M.I.; HEARN, T.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXX. Evaluation of bandwidth behaviour of proteins chromatographed on tentacle-type anion exchangers. *J. Chromatogr. A*, v.599, n.1-2, p.163-170, 1992.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Amino-acid content of foods and biological data on proteins. 3 ed., 1981. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T00.htm#TOC>>. Acesso em: 17 Dez. 2006.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Rice and human nutrition - international year of rice 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004/index_en.htm>. Acesso em: 12 jul. 2006.
- 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.
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, v.48, n.10, p.86-88, 1994.
- 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, n.9, p.1432-1438, 1993.
- 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.
- FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. *Rev. Ciênc. Tecnol.*, v.10, n.19, p.79-89, 2002.
- 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.; 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.
- 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 Pharm.*, v.41, n.1, p.79-89, 2000.
- HAGENIMANA, A.; DING, X.; FANG, T. Evaluation of rice flour modified by extrusion cooking. *J. Cereal Sci.*, v.43, n.1, p.38-46, 2006.
- 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.
- 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.

- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v.5, n.6, p.559-571, 1992.
- HEINEMANN, R.J.B.; FAGUNDES, P.L.; PINTO, E.A.; PENTEADO, M.V.C.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. *J. Food Comp. Anal.*, v.18, n.4, p.287-296, 2005.
- HENDRIKSZ, C.J.; WALTER, J.H. Update on phenylketonuria. *Current Paediat.*, v.14, p.400-406, 2004.
- HENN, R.L.; NETTO, F.M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, v.46, n.8, p.3009-3015, 1998.
- HIBINO, K.; KIDZU, T.; MASAMURA, T.; OHTSUKI, K.; TANAKA, K.; KAWABATA, K.; FUJII, S. Amino acid composition of rice prolamin peptides. *Agric. Biol. Chem.*, v.53, n.2, p.513-518, 1989.
- HINSBERGER, A.; SANDHU, B.K. Digestion and absorption. *Current Paediat.*, v.14, p.605-611, 2004.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em: 15 Jan. 2007.
- 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.
- ILO, S.; LIU, Y.; BERGHOFER, E. Extrusion cooking of rice flour and amaranth blends. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v.32, n.2, p.79-88, 1999.
- IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Enzyme Nomenclature, 6 ed., 1992. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>. Acesso em: 15 Jan. 2007.
- 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.

- 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. 2006.
- KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S.; SOARES, R.D.L.; REIS, D.G. *Receitas especiais para fenilcetonúria*. Belo Horizonte: Folium, 2001. 65p.
- KOLETZKO, B.; SCHIMIDT, E. Nutritional and dietetic aspects of food allergy and food intolerance in childhood. *Bibl. Nutr. Dieta*, v.48, p.116-126, 1991.
- KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem.*, v.101, p.615-620, 2007.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995. 761p.
- LINDSAY, G.W.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Protein concentrates from wheat shorts, rice bran, and soy flour by extraction with cheese wheys. *J. Food Sci.*, v.42, n.5, p.1365-1369, 1977.
- 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, 2005a.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Technol.*, v.38, n.5, p. 447-453, 2005b.
- 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.
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v.56, n.4, p.938-942, 1991.
- LUMDUBWONG, N.; SEIB, P.A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour. *J. Cereal Sci.*, v.31, n.1, p.63-74, 2000.
- MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. *Krause - Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9. Ed. São Paulo: Roca, 1998. 1179p.
- 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.
- 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. *Inter. J. Pep. Prot. Res.*, v.46, p.186-192, 1995.

- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Públ.*, 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.; BARBOSA, C.M.S.; LOPES, D.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.52, n.1, p.77-83, 2002.
- 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.1, p.21-42, 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. 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.
- MURTHY, K.V.R.; REY, L.; BELON, P. Photoluminescence and thermally stimulated luminescence characteristics of rice flour. *J. Lumin.*, v.122-123, n.1, p.279-283, 2007.
- 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.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.50, n.1, p.15-23, 1995.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba: Livraria Nobel S/A, 2000. 477p.
- PRINCE, A.P.; MSMURRY, M.P.; BUIST, N.R.M. Treatment products and approaches of phenylketonuria: improved palatability and flexibility demonstrate safety, efficacy and acceptance in US clinical trials. *J. Inherit Metabol. Dis.*, v.20, n.4, p.486-498, 1997.
- REED, G. *Food Science and Technology*. 2 ed. New York: Academic Press, 1975. 573p.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v.35, n.10, p.753-761, 1998.

- 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.
- SAUNDERS, R.M.; CONNOR, M.A; EDWARDS R.H.; KOHLER, G.O. Preparation of protein concentrates from shorts and wheat millrun by a wet alkaline process. *Cereal Chem.*, v.52, n.1, p.93-101, 1975.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em Alimentos Protéicos*. São Paulo: Varela,1996. 520p.
- 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.
- SHIH, F.F.; CHAMPAGNE, E.T.; DAIGLE, K.W.; ZARINS, Z. Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. *Nahrung*, v.43, n.1, p.14-18, 1999.
- SHIH, F.F.; DAIGLE, K.W. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour. *Cereal Chem.*, v.74, n.4, p.437-441, 1997.
- SHIH, F.F.; DAIGLE, K.W. Preparation and characterization of rice protein isolates. *JAOCS*, v.77, n.8, p.885-889, 2000.
- 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*, sep. 14. 1999.
- SIEMENSMA, A.D.; WEIJER, W.J.; BAK, H.J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Technol.*, v.4, p.16-21, 1993.
- SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Sci. Technol.*, v. 37, n.7, p. 709-718, 2003.
- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. *Alim. Nutr.*, v.16, n.1, p.21-31, 2005a.
- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Imobilização da pancreatina em carvão ativado e em alumina, visando sua utilização no preparo de formulações dietéticas. *Acta Sci. Health Sci.*, v.27, n.2, p.163-169, 2005b.
- SILVESTRE, M.P.C.; DAUPHIN, D.; HAMON, M. Application Of UV absorbance and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysatesc. *Anal. Chim. Acta*, v.82, n.3, 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.*, v.42, p.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.*, v.42, p.2783-2789, 1994b.
- SOARES, R.D.L.; DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L.M.; AGUIAR, M.J.B.; JUNQUEIRA, R.G.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego do carvão ativado para a remoção de fenilalanina de leite em pó. *Bol. Centro Pesq. Process. Alim.*, v.22, n.1, p.65-84, 2004a.
- SOARES, R.D.L.; SILVA, V.D.M.; LOPES, D.C.F.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, v.40, n.3, p.353-362, 2004b.
- 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.
- STORCK, C.R.; SILVA, L.P.; FAGUNDES, C.A.A. Categorizing rice cultivars based on differences in chemical composition. *J. Food Comp. Anal.*, v.18, p. 333–341, 2005.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000p.
- SUGIMOTO, T.; TANAKA, K.; KASAI, Z. Molecular species in the protein body II (PB-II) of developing rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.*, v. 50, n.12, p. 3031-3035, 1986.
- SUJATHA, S.J.; AHMAD, R.; BHAT, P.R. Physicochemical properties and cooking qualities of two varieties of raw and parboiled rice cultivated in the costal region of Dakshina Kannada, India. *Food Chem.*, v.86, n.2, p.211-216, 2004.
- SVENNING, C.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E.A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: IDF (International Dairy Federation) Seminar on Protein & Fat globule modifications, p. 96-106, 1993.
- TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA – UNICAMP, versão II, 2 ed., Campinas: NEPA – UNICAMP, 2006. 113p.
- 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*, apr. 7. 1998.
- 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. 2006.

- 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.
- 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, n.16, p.3559-3576, 1986.
- 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, S.H.; FERNANDES, S.M.; CABRAL, L.C. Solubilidade de nitrogênio, dispersibilidade de proteína e propriedades emulsificantes dos extratos hidrossolúveis desidratados de arroz e soja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.20, n.1, p.12-17, 2000
- 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.
- 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, 2004a.
- WANG, L.; WANG, Y.-J. Application of high-intensity ultrasound and surfactants in rice starch isolation. *Cereal Chem.*, v.81, n.1, p.140-144, 2004b.
- 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.
- WHITAKER, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Science*. 2. ed. California: Marcel Dekker, 1994, 625p.
- WRIGLEY, C.W.; BEKES, F. *Cereal-grain proteins*. In SIKORSKI, Z.E. (Ed.) *The Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. Lancaster: Technomic Publishing, 2001, p. 373-406.
- ZEZZA, F.; KERNER, J.; PASCALE, M.R.; GIANNINI, R.; MARTELLI, E.A. Rapid determination of amino acids by high-performance liquid chromatography; release of amino acids by perfused rat liver. *J. Chromatogr. A*, v.593, n.1-2, p.99-101, 1992.

OUTRAS PUBLICAÇÕES

1 PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS ESPECIALIZADOS

- CAPOBIANGO, M.; **VIEIRA, C.R.**; SANTIAGO E SILVA, A.L.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. *Ciê. Tecnol. Alim.*, v.26, n.4, p.884-890, 2006.
- DELVIVO, F.M.; **VIEIRA, C.R.**; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates (In press). *Am. J. Food Tech.*, v.1, n.2, p.94-104, 2006.
- 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. Bona.*, v.25, n.3, p. 325-32, 2006.

2 PUBLICAÇÕES EM ANAIS DE CONGRESSOS E SIMPÓSIOS

- BIZZOTTO, C.S.; **VIEIRA, C.R.**; SANTIAGO E SILVA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da corolase pp e do carvão ativado na produção de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 6., 2005, Campinas, SP. *Resumos...* CD 1, Campinas, 2005.
- CAPOBIANGO, M.; **VIEIRA, C.R.**; SANTIAGO E SILVA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. Efeito do tempo na extração enzimática das proteínas do fubá de milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, SBCTA, Curitiba, PR. *Anais ...* CD1, Curitiba, 2006. p. 0746
- SANTIAGO E SILVA, A.L.; CAPOBIANGO, M.; **VIEIRA, C.R.**; SILVESTRE, M.P.C. Otimização da extração das proteínas do fubá de milho. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 15, Belo Horizonte. *Anais...*, 2006.
- SILVA, V.D.M.; **VIEIRA, C.R.**; AZEVEDO, K.V.; SILVESTRE, M.P.C. Estudo de alguns parâmetros de imobilização da pancreatina em carvão ativado. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 6., 2005, Campinas, SP. *Resumos...* CD 1, Campinas, 2005.
- VIEIRA, C.R.**; CAPOBIANGO, M.; SANTIAGO E SILVA, A.L.; AMORIM, A.C.P.; SILVESTRE, M.P.C. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. 1. Efeito do tipo de enzima, da temperatura e do pH no rendimento de extração. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, SBCTA, Curitiba, PR. *Anais ...* CD1, 2006. p. 1169.
- VIEIRA, C.R.**; SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; RAMOS, C.S.; SILVESTRE, M.P.C. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. 2. Efeito do tratamento físico no rendimento de extração. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, SBCTA, Curitiba, PR. *Anais ...* CD1, 2006. p. 1168.