

**CARLOS DE OLIVEIRA LOPES JUNIOR**

**EXTRAÇÃO PROTÉICA E OBTENÇÃO DE  
HIDROLISADOS PROTÉICOS DE FEIJÃO COM  
BAIXO TEOR DE FENILALANINA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de Farmácia**

**Belo Horizonte, MG**

**2008**

**CARLOS DE OLIVEIRA LOPES JUNIOR**

**EXTRAÇÃO PROTÉICA E OBTENÇÃO DE  
HIDROLISADOS PROTÉICOS DE FEIJÃO COM  
BAIXO TEOR DE FENILALANINA**

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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Marialice Pinto Coelho Silvestre

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de Farmácia**

**Belo Horizonte, MG**

**2008**



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

**CARLOS DE OLIVEIRA LOPES JUNIOR**

**“EXTRAÇÃO PROTÉICA E OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS  
DE FEIJÃO COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA”**

**APROVADA EM 19 DE MARÇO DE 2008**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. ANA LÚCIA PIMENTA STARLING

Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA

Prof. Dr. JOSÉ VIRGÍLIO COELHO  
Co-Orientador

Profa. Dra. MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE  
Orientadora

Aos meus pais que dedicaram suas vidas a  
educar e criar os filhos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar mais esta vitória.

Aos meus pais, Carlos de Oliveira Lopes e Glace Mary Melo Franco Lopes, exemplos de amor e dedicação aos filhos, por terem feito, sempre, tudo o que estava ao alcance. Saibam que todas as minhas conquistas serão dedicadas a vocês. Obrigado mais uma vez, e espero um dia retribuir ao menos um pouco do que fazem por mim. Amo Vocês!

Aos meus irmãos Paulo Henrique e Marcus Vinícius. Obrigado por estarem sempre presentes!

À toda minha família que acompanha todas as minhas conquistas. É muito bom poder contar com vocês.

À Professora Dr<sup>a</sup> Marialice Pinto Coelho Silvestre por ter me dado a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, pela orientação deste trabalho, pela amizade consolidada, e pelo exemplo de competência e amor ao trabalho.

Ao Professor Dr. José Virgílio Coelho, co-orientador, pelo acompanhamento e pelas importantíssimas contribuições na execução deste trabalho

Aos membros da banca examinadora, professora Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Abreu Glória (FAFAR/UFMG) e a professora Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Pimenta Starling (Faculdade de Medicina/UFMG) pelas contribuições e valiosas idéias finais.

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

Às funcionárias da secretaria de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pela presteza e colaboração. Ao funcionário Marcos pela ajuda.

Aos amigos do Laboratório Bromatologia/Pesquisa, pela convivência, amizade e ajuda constante. Em especial à Aline, que foi a minha “equipe de laboratório”, pela contribuição na execução do trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Clube Atlético Mineiro. Parabéns pelo centenário (1908 – 2008)!!!

*“...Ana Carolina, não sou capaz, com palavras, de agradecer por tudo que você fez e faz por mim. Entretanto, pretendo estar ao seu lado todos os dias, e em cada um deles, ao menos com um sorriso, alegrá-la e demonstrar meus sinceros agradecimentos...”*

*O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.*

*Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

*Fernando Pessoa.*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	12
<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 <b>HIPERFENILALANINEMIA</b> .....	17
2.1.1 Fenilcetonúria.....	18
2.1.2 Aspectos bioquímicos .....	18
2.1.3 Perfil epidemiológico .....	21
2.1.4 Efeitos adversos do aumento no nível sérico de fenilalanina.....	22
2.1.5 Diagnóstico.....	22
2.1.6 Tratamento.....	22
2.2 <b>FEIJÃO</b> .....	24
2.2.1 Proteínas do feijão .....	25
2.2.2 Fatores antinutricionais.....	27
2.3 <b>ENZIMAS</b> .....	28
2.3.1 Enzimas proteolíticas .....	28
2.3.2 Enzimas comerciais .....	29
2.4 <b>MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS</b> .....	32
2.5 <b>HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS</b> .....	35
2.6 <b>REMOÇÃO DE FENILALANINA</b> .....	38
2.7 <b>AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA</b> .....	39
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1 <b>MATERIAL</b> .....	41
4.2 <b>MÉTODOS</b> .....	41
4.2.1 Determinação da composição centesimal do feijão .....	41
4.2.2 Extração enzimática das proteínas do feijão .....	42
4.2.3 Avaliação do efeito de alguns parâmetros sobre o rendimento da extração protéica .....	43
4.2.4 Preparo dos hidrolisados protéicos isentos de fenilalanina.....	44
4.2.5 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados.....	46
4.2.6 Efeito de alguns parâmetros sobre o preparo dos hidrolisados protéicos isentos de fenilalanina .....	46
4.2.7 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina .....	46
4.2.8 Análise estatística .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
5.1 <b>COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO FEIJÃO</b> .....	48

<b>5.2</b>	<b>EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO FEIJÃO</b> .....	49
5.2.1	Efeito do método de extração protéica .....	49
5.2.2	Efeito da variação da velocidade de centrifugação sobre a precipitação do extrato protéico .....	51
5.2.3	Efeito do tempo de reação .....	52
5.2.4	Efeito da variação do pH inicial .....	53
5.2.5	Efeito da utilização de diferentes proteases.....	55
<b>5.3</b>	<b>EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA</b> .....	57
<b>5.4</b>	<b>EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA</b> .....	60
5.4.1	Efeito do tipo de protease .....	60
5.4.2	Efeito da relação proteína:carvão ativado .....	61
5.4.3	Efeito da temperatura de reação.....	63
5.4.4	Efeito do pH inicial .....	64
5.4.5	Efeito da relação enzima:substrato .....	65
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68

## LISTA DE TABELAS

1 - Classificação das hiperfenilalaninemias de acordo com o nível sérico de fenilalanina .....	17
2 - Ocorrência mundial de fenilcetonúria por região ou grupo étnico. ....	21
3 - Composição química de alguns cultivares de feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	25
4 - Perfil de aminoácidos nas proteínas de alguns cultivares de feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	26
5 - Subdivisão das peptidases baseada no mecanismo catalítico.....	29
6 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de feijão e remoção de fenilalanina .....	45
7 - Comparação do resultado da composição química do feijão utilizado no presente trabalho e de diferentes cultivares de feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	48
8 - Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão.....	57
9 - Comparação entre os valores de pH e temperatura ótimos e os utilizados para as diferentes enzimas .....	61

## LISTA DE FIGURAS

1 - Estrutura química da fenilalanina. ....	18
2 - Via de oxidação da fenilalanina.....	19
3 - Estrutura da enzima fenilalanina-hidroxilase .....	19
4 - Vias alternativas para o catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria.....	20
5 - Efeito de diferentes métodos sobre o rendimento da extração protéica do feijão.. ..	49
6 - Efeito do tempo de reação sobre o rendimento da extração das proteínas do feijão.....	52
7 - Efeito da variação do pH inicial no rendimento da extração das proteínas do feijão.....	53
8 - Efeito da utilização de diferentes proteases sobre o rendimento da extração das proteínas do feijão.....	56
9 - Efeito do tipo de protease sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão.. ..	60
10 - Efeito da relação proteína:carvão ativado sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão. ....	62
11 - Efeito da temperatura de reação sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão. ....	63
12 - Efeito do pH inicial da reação de hidrólise sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão. ....	64
13 - Efeito da relação enzima:substrato sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão. ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BH<sub>2</sub></b>	– Dihidrobiopterina
<b>BH<sub>4</sub></b>	– Tetrahidrobiopterina
<b>CA</b>	– Carvão ativado
<b>DHPR</b>	– Dihidrobiopterina redutase
<b>EDS</b>	– Espectrofotometria Derivada Segunda
<b>EPF</b>	– Extrato protéico de feijão
<b>E:S</b>	– Relação enzima e substrato
<b>FAO</b>	– Food and Agriculture Organization
<b>FCC</b>	– Food Chemical Codex
<b>HPA</b>	– Hiperfenilalaninemia
<b>HPLC</b>	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>PKU</b>	– Fenilcetonúria
<b>PAH</b>	– Fenilalanina hidroxilase
<b>Phe</b>	– Fenilalanina
<b>REP</b>	– Rendimento de extração protéica
<b>Tyr</b>	– Tirosina
<b>WHO</b>	– World Health Organization

## RESUMO

Considerando a importância do feijão na dieta do brasileiro e seu elevado teor protéico, este trabalho teve o objetivo de promover a extração e a hidrólise das proteínas do feijão, e posterior remoção da fenilalanina (Phe), etapas do processo de desenvolvimento de um feijão contendo baixo teor de Phe para ser utilizado na dieta de fenilcetonúricos. Para isso, foram estudadas diversas condições enzimáticas de extração e hidrólise das proteínas, além da remoção da Phe. Para verificar o rendimento de extração protéica (REP), foram, primeiramente, testados dois métodos. Definido aquela em que se obteve maior rendimento, diversos parâmetros (velocidade de centrifugação, tempo de reação, pH inicial e o tipo de enzima) foram avaliados a fim de otimizar o processo. O melhor REP (93,14%) foi obtido utilizando-se uma enzima de *Bacillus licheniformis* na relação enzima:substrato (E:S) de 10:100, com velocidade de centrifugação igual a 10.640 g, tempo de reação de 3 h e pH inicial de 10,5. O extrato protéico obtido foi, então, submetido a diversas condições de hidrólise enzimática, e o carvão ativado (CA) utilizado como meio adsorvente na remoção da Phe. Com o objetivo de obter um hidrolisado com teor reduzido de Phe, alguns parâmetros (pH inicial, relação E:S, temperatura, tipo de protease e a relação proteína:CA) foram estudados, e o teor de Phe dosado no hidrolisado por espectrofotometria derivada segunda. A maior remoção de fenilalanina (87,93%) foi obtida empregando-se a protease de *Papaya carica* na relação E:S de 10:100, sem ajuste de pH, e ainda, com temperatura de 50 °C e relação proteína:CA de 1:88. Este ensaio originou um hidrolisado com teor final de 433,7 mg de Phe/100 g, permitindo sua utilização parcial no desenvolvimento de um feijão modificado com baixo teor de Phe, ou ainda, como fonte de proteínas de suplementos alimentares destinados a fenilcetonúricos.

**Palavras-chave:** feijão, proteínas, extração, hidrólise, fenilalanina, fenilcetonúria.

## ABSTRACT

**PROTEIN EXTRACTION AND PREPARATION OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM BEANS WITH LOW PHENYLALANINE CONTENT.** Considering the importance of beans in the diet of Brazilian people and its high protein content, the aim of this work was to promote the extraction and hydrolysis of its proteins, and further phenylalanine (Phe) removal. These steps are part of the process to development of a beans with low Phe content to be used in the phenylketonurics' diet. Thus, several enzymatic conditions of protein extraction and hydrolysis, as well as phenylalanine removal were studied. Using the condition wich produced the highest extraction yield (EY), some paramaters (velocity of centrifugation, reaction time, initial pH and type of enzyme) were evaluated in order to optimize the process. The highest EY (93.14%) was achieved using the enzyme from *Bacillus licheniformis* in an enzyme:substrate ratio (E:S) of 10:100, with a velocity of centrifugation of 10,640 g, reaction time of 3h and initial pH of 10.5. Then the protein extract was hydrolysed using varied hydrolysis conditions and the activated carbon (AC) was used as adsorbent for Phe removal. Aiming the preparation of a reduced Phe, some parameters (initial pH, enzyme:substrate ratio (E:S), temperature, type of proteolytic enzyme and protein:AC ratio) were studied. The Phe content was evaluated by second derivative spectrophotometry after passing through an AC column. The highest Phe removal (87.93%), was achieved using the enzyme from *Papaya carica* with an E:S ratio of 10:100, with no pH adjustment, temperature of 50 °C and a protein:CA ratio of 1:88. This assay produced a hydrolysate with a final Phe content of 433.7 mg/100 g, which could be used, partially, in the development of beans with low Phe content or as source of proteins in nutritional supplements for phenylketonurics.

**Key words:** beans, proteins, extraction, hydrolysis, phenylalanine, phenylketonuria.

# 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte da Linha de Pesquisa “Propriedades nutricionais e funcionais de proteínas alimentares”, criada em 1994 pela orientadora 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), 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 a saúde dos pacientes, as indústrias alimentícias e farmacêuticas.

A fenilcetonúria (PKU) é um dos mais comuns erros inatos do metabolismo causada pela deficiência parcial ou total da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Esta enzima, ativa no fígado, é responsável por catalisar a oxidação do aminoácido fenilalanina (Phe) à tirosina (Tyr). A deficiência parcial ou total da atividade desta enzima leva a um acúmulo de Phe e de outros metabólitos que ocasionam um grave dano cerebral e conseqüentemente retardo mental (RAMASWAMI & SMITH, 1997; HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; GIOVANNINI et al., 2007).

O tratamento da PKU, que deve ser iniciado até o 20º dia de vida preconiza um rigoroso controle da ingestão protéica, de forma a manter os níveis de fenilalanina dentro de limites que previnam o dano cerebral (SMITH et al., 1990; HENDRIKSZ & WALTER, 2004). Devido a severa restrição a proteínas naturais, os fenilcetonúricos necessitam de uma fonte complementar de aminoácidos para garantir crescimento e desenvolvimento normais. Esta complementação envolve dois tipos de substitutos protéicos, a mistura de aminoácidos livres e os hidrolisados protéicos, sendo que no Brasil apenas a mistura de aminoácidos está disponível por meio de importação e com elevado preço (CLEMENTE, 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000; SPRONSEN et al., 2001; SANTOS et al., 2003).

As leguminosas são importantes fontes protéicas, principalmente para a população de países em desenvolvimento, sendo o feijão (20 – 25% de proteína) a mais importante e mundialmente utilizada na alimentação humana (SGARBIERI, 1980; BROUGHTON et al., 2003; THARANATHAN & MAHADEVAMMA, 2003;

SANGRONIS et al., 2006).

Sabe-se que substitutos protéicos com elevados teores de oligopeptídeos, principalmente di-tripeptídeos são mais efetivamente absorvidos, e conseqüentemente, utilizados pelo organismo do que proteínas intactas e misturas de aminoácidos livres (KEOHANE et al., 1985, GRIMBLE et al., 1986; RÉRAT, 1993; BOZA et al., 2000).

Considerando a importância do feijão na alimentação e o valor nutricional superior dos hidrolisados protéicos frente às misturas de aminoácidos, seria de grande importância utilizá-lo no desenvolvimento de novos produtos destinados à alimentação de fenilcetonúricos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que abordassem a extração enzimática das proteínas do feijão, tampouco, a hidrólise desta e a remoção da fenilalanina. Entretanto, diversos autores utilizaram diferentes matérias-primas com o objetivo de desenvolver produtos destinados a fenilcetonúricos e, para isso, promoveram a extração das proteínas, seguida pela hidrólise e posterior remoção deste aminoácido por carvão ativado (DE MARCO et al., 2004; LOPES et al., 2005b, 2006; BIZZOTTO et al., 2006a,b; DELVIVO et al., 2006; SOARES et al., 2006; CAPOBIANGO et al., 2007; VIEIRA, 2007).

Dando seqüência ao desenvolvimento de novas opções de alimentos para os pacientes fenilcetonúricos, o presente trabalho teve como objetivo realizar a extração enzimática das proteínas do feijão (*Phaseolus vulgaris*), seguida da hidrólise enzimática destas e posterior remoção da Phe, de forma a obter um hidrolisado protéico de feijão com teor reduzido deste aminoácido que possa ser utilizado na reconstituição da matéria-prima no desenvolvimento de um feijão modificado com baixo teor de fenilalanina, destinado aos pacientes fenilcetonúricos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HIPERFENILALANINEMIA

A hiperfenilalaninemia (HPA) pode ser causada pela mutação no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), a qual converte diretamente a fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr), ou, apesar de extremamente raro, pela mutação no gene de enzimas envolvidas no metabolismo do cofator desta enzima, a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (HENDRIKSZ & WALTER, 2004; GIOVANNINI et al., 2007).

A mutação no gene que codifica, ou a PHA, ou as enzimas envolvidas no *turnover* do BH<sub>4</sub>, levam a um aumento no nível sérico da fenilalanina. As hiperfenilalaninemias são classificadas de acordo com o nível de fenilalanina sanguíneo. Sabendo-se que a concentração normal de Phe no sangue está usualmente entre 50 e 120 μmol/L, as diferentes formas de hiperfenilalaninemias são classificadas em Fenilcetonúria clássica, Fenilcetonúria leve e Hiperfenilalaninemia não fenilcetonúria (PKU) (RAMASWAMI & SMITH, 1997; HANLEY, 2004; HEDRIKSZ & WALTER, 2004). Essa classificação pode ser vista na Tabela 1.

**Tabela 1 - Classificação das hiperfenilalaninemias de acordo com o nível sérico de fenilalanina**

Desordem	Nível de Fenilalanina Sanguíneo	
	μmol/L	mg/dL
Fenilcetonúria Clássica	≥ 1200	≥ 20
Fenilcetonúria Leve	600 < 1200	10 < 20
Hiperfenilalaninemia não PKU	240 < 600	3 < 10

## 2.1.1 Fenilcetonúria

Fenilcetonúria clássica, ou PKU como é mundialmente conhecida, é um dos mais comuns erros inatos do metabolismo (alterações metabólicas geneticamente determinadas), com uma incidência superior a 1:10.000 em muitas populações. É uma doença que, quando não tratada, tem como consequência retardo mental e epilepsia (HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; GIOVANNINI et al., 2007).

A PKU foi primeiramente descrita em 1934 por Asbörn Fölling como uma desordem no metabolismo do aminoácido fenilalanina causadora de retardo, chamada *imbecilitas phenylpyrouvica* (CENTERWALL & CENTERWALL, 2000).

## 2.1.2 Aspectos bioquímicos

A L-fenilalanina, Figura 1, é um aminoácido essencial, e por isso, uma quantidade mínima é necessária para o crescimento e desenvolvimento normal do indivíduo. O excesso da Phe não requerido para o anabolismo é hidroxilado a Tyr pela enzima PAH. Essa reação de hidroxilação requer a presença de BH<sub>4</sub> como cofator (HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

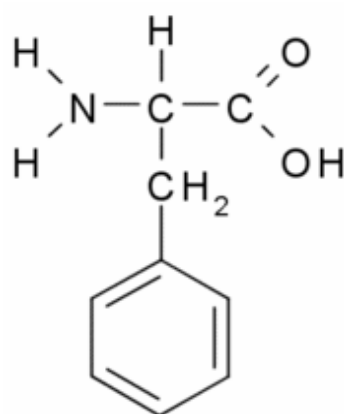
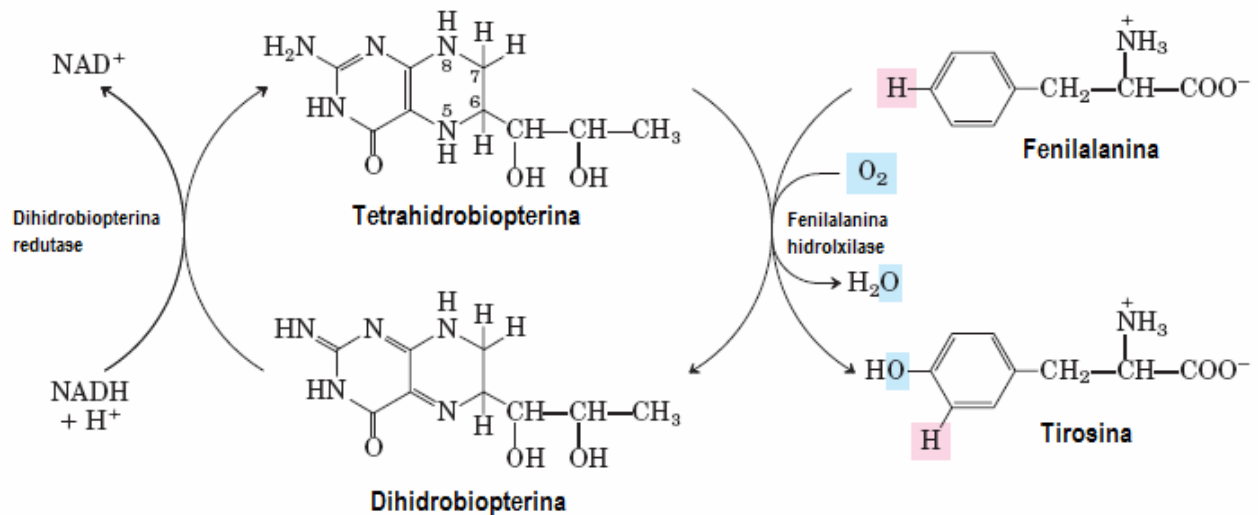


Figura 1 - Estrutura química da fenilalanina.

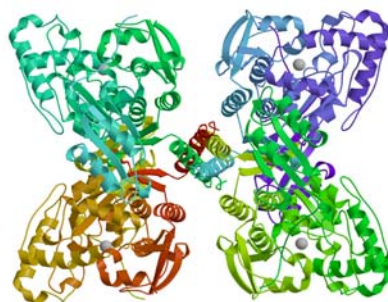
A reação de hidroxilação da fenilalanina, mostrada na Figura 2, é um passo obrigatório e limitante na via catabólica que leva à completa oxidação da fenilalanina a  $\text{CO}_2$  e a água. A reação requer PAH e  $\text{BH}_4$ . O  $\text{BH}_4$  é formado a partir do GTP e é reciclado da dihidrobiopterina ( $\text{BH}_2$ ) pela enzima dihidrobiopterina redutase (DHPR). Portanto, defeitos em qualquer desses passos pode resultar em um aumento de fenilalanina sangüínea (HENDRIKSZ & WALTER, 2004).



**Figura 2 - Via de oxidação da fenilalanina**

Fonte: LEHNINGER, 2006.

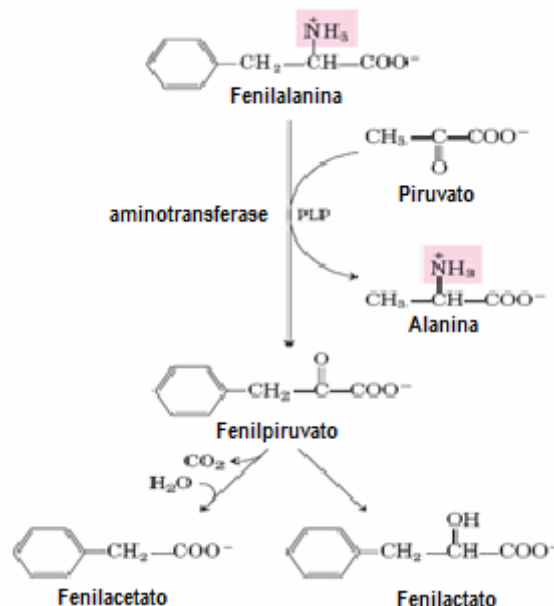
A enzima PAH, ativa no fígado, mostrada na Figura 3, é um tetrâmero formado por quatro subunidades idênticas, regulada por fosforilação/desfosforilação de suas subunidades, com ativação pela fenilalanina (HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006).



**Figura 3 - Estrutura da enzima fenilalanina-hidroxilase**

Fonte: ERLANDSEN & STEVENS, 1999.

A diminuição na atividade da enzima PAH leva a um aumento na concentração de Phe em relação à Tyr, e aumenta a produção de metabólitos (Figura 4), tais como, fenilactato, fenilpiruvato e fenilacetato. A Phe inibe competitivamente, o seu próprio transporte através da membrana celular podendo causar uma deficiência no *turnover* de dopamina, serotonina e provavelmente da melatonina. A patogênese do dano neurológico devido à deficiência parcial ou total da atividade da PAH não é bem compreendida, entretanto, parece ser devido ao efeito do acúmulo da fenilalanina, mais do que de seus metabólitos, no metabolismo intermediário, importante no crescimento e desenvolvimento cerebral precoce. Segundo RAMASWAMI et al. (1997), possíveis causas do dano neurológico ocasionado pela fenilcetonúria estão relacionadas com a estabilidade da mielina, com a síntese protéica e com o *turnover* de dopamina.



**Figura 4 - Vias alternativas para o catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria**  
 Fonte: LEHNINGER, 2006.

Mais de 460 mutações no gene da PAH foram descritas, sendo a maioria com um único gene defeituoso, entretanto, não há nenhuma mutação que prevaleça, embora certas mutações sejam mais comuns em diferentes populações étnicas. O gene para PHA está localizado no cromossomo 12, sua seqüência genômica completa mede mais do que 90 Kb, contendo 13 éxons e códigos para um RNA mensageiro maduro de 2,4 Kb com 450 aminoácidos (HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

### 2.1.3 Perfil epidemiológico

A ocorrência da PKU varia entre os diferentes grupos étnicos. É aproximadamente a mesma em europeus e asiáticos, mas é muito mais rara em japoneses e quase desconhecida em africanos. A incidência de formas mais brandas de HPA em algumas populações parece ser menos comum do que a própria PKU (RAMASWAMI & SMITH, 1997; HENDRIKSZ & WALTER, 2004). Essa variação é exemplificada na Tabela 2.

Em levantamento feito no Brasil em 2001, por CARVALHO (2003), foram triadas 1,251 milhões de crianças, constatando-se 79 casos positivos para fenilcetonúria, e prevalência de aproximadamente 1:15.000. Já em 2002, em levantamento realizado pelo mesmo autor, foram triadas 1,382 milhões de crianças, constatando 56 casos positivos e prevalência de aproximadamente 1:24.000. Ainda, segundo informações do NUPAD (Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG) a incidência no estado de Minas Gerais é de 1:21.000.

**Tabela 2 - Ocorrência mundial de fenilcetonúria por região ou grupo étnico.**

<b>Regiões geográficas ou grupos étnicos</b>	<b>Incidência (casos/ milhões de nascimentos)</b>	<b>Prevalência</b>
Turquia	385	1:2.597
Judeus lemenitas	190	1:5.263
Escócia	190	1:5.263
Tcheco Eslováquia	150	1:6.666
Polônia	130	1:7.692
Hungria	90	1:11.111
Dinamarca	85	1:11.764
França	75	1:13.330
Noruega	70	1:14.285
Inglaterra	70	1:14.285
Itália	60	1:16.666
China	60	1:16.666
Canadá	45	1:22.222
Brasil	40	1:24.780
Suécia	25	1:40.000
Japão	7	1:142.857
Judeus Asquenazes	5	1:200.000
Finlândia	5	1:200.000

Fonte: CARVALHO, 2003.

#### **2.1.4 Efeitos adversos do aumento no nível sérico de fenilalanina**

O desenvolvimento natural da PKU não tratada leva a um retardo mental progressivo e irreversível que ocorre durante a infância. Crianças com PKU são assintomáticas ao nascer, mas no período de 3 a 6 meses eles apresentam retardo mental e microcefalia. Apresentam, ainda, uma grave dificuldade de aprendizado, irritabilidade, falta de atenção, distúrbios comportamentais, hiperatividade e crises convulsivas entre os 6 e 18 meses de vida. Entretanto, o efeito prejudicial torna-se progressivamente menor com o aumento de idade, e é mínimo após os 12-14 anos de idade (BEASLE et al., 1994; WAITZBERG, 2000; HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

#### **2.1.5 Diagnóstico**

O diagnóstico da PKU é baseado na detecção da hiperfenilalaninemia. O nível de fenilalanina é normal em crianças fenilcetonúricas ao nascerem, já que o fígado materno protege o feto, mas aumenta rapidamente nos primeiros dias de vida. Ensaios para determinação de fenilalanina em sangue coletados de crianças recém nascidas 24 h após o nascimento são sensíveis e confiáveis (SARKISSIAN & GÁMEZ, 2005).

No Brasil a fenilcetonúria é detectada pelo “teste do pezinho”, que é obrigatório em todo o território brasileiro, conforme o Estatuto da Criança e do Adolescente, inciso III do Artigo 10 da Lei nº. 8069, de 13/07/1990 (BRASIL, 1990).

#### **2.1.6 Tratamento**

Em 1951, Woolf e Vulliamy, citados por HENDRIKSZ & WALTER (2004), sugeriram que uma dieta restrita em fenilalanina poderia ser efetiva na prevenção das desordens neurológicas causadas pela fenilcetonúria. Ao utilizar um hidrolisado de caseína restrito em fenilalanina, BICKEL (1996), observou melhoras clínicas e bioquímicas em pacientes com dois anos de idade com PKU.

O tratamento iniciado após o reconhecimento do retardo no desenvolvimento é apenas parcialmente bem sucedido, conseqüentemente, é necessário que o diagnóstico seja realizado durante a fase pré-sintomática da desordem. Para se obter

um melhor resultado, a criança deve iniciar o tratamento dietético até os 20 dias de idade (SMITH et al., 1990; HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

O objetivo do tratamento é manter o nível de fenilalanina sanguíneo dentro de um limite seguro (i.e. 120-360 mmol/L) para prevenir o dano cerebral e ao mesmo tempo prover uma dieta nutricionalmente adequada para garantir o crescimento e uma vida normal. Isto é alcançado por meio de uma restrição a proteínas naturais e fornecimento de uma fonte artificial de aminoácidos essenciais e não essenciais, minerais e vitaminas. A severa restrição a proteínas naturais é necessária, pois, a maioria das crianças com fenilcetonúria pode tolerar menos do que 500 mg de fenilalanina em 24 h (HENDRIKSZ & WALTER, 2004; GIOVANNINI et al., 2007).

Uma rotulagem adequada de alimentos é essencial para a identificação de fontes de fenilalanina na dieta. Um problema particular é encontrado com um adoçante comum utilizado em alimentos, o aspartame<sup>®</sup>, que é hidrolisado a fenilalanina livre, ácido aspártico e metanol. Apenas 330 mL de uma bebida adoçada com aspartame<sup>®</sup> pode conter a quantidade diária total de fenilalanina permitida a uma criança (HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

A conduta dietoterápica dos pacientes com PKU inclui dois tipos de substitutos protéicos: a mistura de aminoácidos livres e os hidrolisados protéicos (CLEMENTE, 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000; SPRONSEN et al., 2001; SANTOS et al., 2003), entretanto, no Brasil apenas a mistura de aminoácidos encontra-se disponível, através da importação.

Diversas preparações comerciais de aminoácidos, livres de fenilalanina, são capazes de prover as exigências necessárias para um crescimento normal. Algumas dessas contêm minerais e vitaminas, mas em outras é necessário um suplemento adicional. O restante da dieta consiste em produtos que contêm menores teores de fenilalanina (zero a 20 mg de Phe/100 g de alimento) que podem ser consumidos de forma controlada. As formulações contendo misturas de aminoácidos, disponíveis no mercado são caras. Dentre elas, encontram-se: PKU-1, PKU-2 e PKU-3, importadas fornecidas pela Support Produtos Nutricionais e Rilla-I, Rilla-II e Rilla-III, nacionais distribuídas pela Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Vittafix Ltda (GUADIX et al., 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000; MaCDONALD et al., 2003).

## 2.2 FEIJÃO

As leguminosas ocupam um importante lugar na nutrição humana, especialmente na dieta padrão de países em desenvolvimento, por possuírem teores bastante altos de proteína (20-40%) (SGARBIERI, 1980; THARANATHAN & MAHADEVAMMA, 2003).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa nativa das Américas Central e do Sul. Possui grande adaptabilidade a diversos tipos de cultivo, solo, quantidade de chuva, temperatura e altitude, sendo encontrado desde o nível do mar até altitudes de 3000 m, sendo cultivado em monocultura, associação ou sistema de rotação. É uma importante fonte de proteína, calorias, fibras alimentares, vitaminas do complexo B e minerais na dieta de um grande segmento da população mundial. (SGARBIERI, 1980; BROUGHTON et al., 2003; SANGRONIS et al., 2006).

Acrescenta-se, ainda, que o feijão é a leguminosa mais importante mundialmente utilizada na alimentação humana. A produção mundial excede 23 milhões de toneladas, das quais 7 milhões são produzidas na América Latina e África (BROUGHTON et al., 2003).

No Brasil, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é considerado como o alimento básico de maior importância, sendo a leguminosa mais consumida diretamente na alimentação tanto da população rural quanto da urbana. As duas regiões que mais o consomem são o nordeste (20,8 Kg/ano – per capita) e sudeste (18,2 Kg/ano – per capita), as quais são, respectivamente, as regiões menos e mais desenvolvidas (BROUGHTON et al., 2003; COSTA et al., 2006). Além disso, no Brasil, o feijão é a principal leguminosa fornecedora de proteínas, fazendo parte da dieta diária das classes sócio-econômicas menos favorecidas (ANTUNNES et al., 1995).

Com relação à composição química do feijão, alguns trabalhos foram encontrados na literatura tais como os de SHIMELIS & RAKSHIT (2005) e ANTUNNES et al. (1995). A título de ilustração, estão apresentados na Tabela 3 os teores dos principais componentes desta leguminosa.

**Tabela 3 - Composição química de alguns cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*)**

Componentes (% base seca)	Cultivares			
	Rico 23	Rosinha-G2	Carioca	Piratã-1
Proteína	25,53	25,77	23,37	23,62
Nitrogênio não protéico	4,88	3,75	3,99	3,38
Cinzas	4,2	3,79	4,18	3,58
Extrato etéreo	2,12	1,85	1,45	1,25
Fibra bruta	5,67	4,57	3,82	4,13
Carboidratos	62,48	63,92	67,18	67,42

Fonte: ANTUNES et al., 1995

### 2.2.1 Proteínas do feijão

O feijão contém proteínas que ocupam um lugar essencial na nutrição humana por complementarem outros alimentos tais como o milho na região montanhosa da América Latina e Leste da África, assim como o arroz no Brasil, que são fontes primárias de carboidratos. Possui em suas sementes entre 20 e 25% de proteína (BROUGHTON et al., 2003).

Em feijões, como em outras leguminosas, as proteínas de reserva, que representam cerca de 80% das proteínas totais das sementes, localizam-se em corpúsculos protéicos no citoplasma. O feijão praticamente não contém prolaminas e apresenta um teor relativamente baixo de glutelinas, predominando as globulinas e depois as albuminas (SGARBIERI, 1996; BROUGHTON et al., 2003).

Grande parte das albuminas do feijão é composta por glicoproteínas, que são proteínas que contêm quantidades variáveis de carboidrato associado à molécula. Uma característica das globulinas do feijão é a resistência que essas proteínas oferecem à proteólise quando não desnaturadas. As proteínas do feijão, como um todo, apresentam digestibilidade aparente inferior às de cereais, e mesmo às de algumas leguminosas. As verdadeiras causas da baixa digestibilidade aparente das proteínas do feijão não estão totalmente esclarecidas, acreditando-se resultar da combinação da resistência que algumas proteínas oferecem à proteólise e de efeitos fisiológicos que estimulam uma maior perda de proteínas endógenas ou corporais. O valor nutricional das proteínas do feijão é, também, diminuído pela quantidade limitante dos

aminoácidos sulfurados como a metionina, e pela biodisponibilidade desses aminoácidos que, também é considerada baixa (SGARBIERI, 1996). O perfil de aminoácidos de alguns cultivares de feijão estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Perfil de aminoácidos nas proteínas de alguns cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*)**

Aminoácidos (g/16 g N)*	Cultivares			
	Rico 23	Rosinha-G2	Carioca	Piratã-1
Lisina	8,77	8,80	6,84	6,54
Histidina	2,27	2,23	2,53	2,94
Amônia	1,73	2,18	1,85	1,56
Arginina	4,97	6,40	6,22	5,14
Triptofano**	1,02	1,03	1,17	1,32
Ácido aspártico	13,80	14,51	12,47	14,12
Treonina	4,70	5,17	4,21	4,53
Serina	6,63	6,62	5,97	5,92
Ácido glutâmico	20,74	19,53	18,32	19,41
Prolina	4,05	3,86	3,34	3,67
Glicina	4,40	4,35	3,65	3,99
Alanina	4,81	4,52	3,86	4,23
1/2 Cistina***	1,51	1,11	1,12	1,31
Valina	5,57	6,15	4,06	4,35
Metionina***	1,42	1,30	1,13	1,22
Isoleucina	4,75	4,62	3,26	3,50
Leucina	9,94	9,70	7,27	7,75
Tirosina	2,47	2,56	2,37	2,60
<b>Fenilalanina</b>	<b>5,52</b>	<b>5,87</b>	<b>5,00</b>	<b>5,62</b>

\* Troca iônica segundo SPACKMAN et al., 1958, Analisador beckman 120 °C.

\*\* Método colorimétrico de SPIES, 1967.

\*\*\* Determinados como ácido cistéico e metionina sulfona, respectivamente.

FONTE: ANTUNES et al., 1995.

## 2.2.2 Fatores antinutricionais

As proteínas do feijão possuem baixa digestibilidade, atribuída, dentre outros fatores, à presença de fatores antinutricionais, alguns dos quais podem também diminuir a biodisponibilidade de elementos e proteínas. Os fatores antinutricionais (inibidores de proteínas, ácido fítico, saponinas, fitohemaglutininas, taninos e lectinas) e os  $\alpha$ -galactosídeos (rafinose, estaquiose, verbascose) são alguns dos componentes indesejáveis do feijão, pois podem limitar a utilização de suas proteínas e carboidratos. Entretanto, todos estes fatores antinutricionais podem ser eliminados pelo tratamento térmico. A inativação e/ou remoção dos componentes indesejáveis é essencial, podendo melhorar a qualidade nutricional, aceitabilidade e aumentar efetivamente o potencial de utilização do feijão na alimentação humana e animal (MORALES-DE LEÓN, et al., 2007; SHIMELIS & RAKSHIT, 2007). O processamento das leguminosas, segundo THARANATHAN & MAHADEVAMMA (2003), melhora os atributos sensoriais (aroma e palatabilidade) e nutricionais, pois aumenta a biodisponibilidade de nutrientes.

Segundo SGARBIERI (1996), as lectinas, dentre as proteínas do feijão, são uma das que têm o maior interesse e, portanto, têm sido mais estudadas. As lectinas do feijão são glicoproteínas que se ligam a determinados sacarídeos ou glicopeptídios de modo muito específico, e representam de 2-10% das proteínas do feijão, o que sugere que elas devam desempenhar alguma função importante na planta. Vários autores têm sugerido as seguintes funções para as lectinas: 1) anticorpos no combate às bactérias do solo; 2) proteção contra ataques de fungos; 3) transporte e armazenamento de açúcares; 4) ataque a enzimas que são glicoproteínas; 5) diferenciação de células embrionárias; e 6) desempenham papel fundamental na relação simbiótica entre células das raízes de plantas leguminosas e bactérias formadoras de nódulos. As lectinas do feijão são tóxicas e, quando ingeridas em seu estado nativo, podem causar a morte em animais de laboratório e intoxicação em humanos. A toxidez se manifesta tanto em nível intestinal como em nível sistêmico. Em nível intestinal as lectinas agem principalmente sobre a mucosa. Ligando-se às membranas das vilosidades intestinais, acabam por produzir a ruptura das microvilosidades e da própria vilosidade. Neste processo verifica-se a interferência com os mecanismos de ingestão e absorção de nutrientes, estímulos às perdas de proteínas e de outros materiais celulares de origem endógena. Já, em nível sistêmico, parte das lectinas ingeridas pode ser absorvida intacta e, passando para a circulação, haverá interação com o sistema imunológico e

hormonal, provocando alterações do metabolismo geral no sentido de estimular o catabolismo protéico e lipídico, elevando a excreção urinária de nitrogênio. Todavia, a ação tóxica da lectina é eliminada pela sua desnaturação o que ocorre pela ação do calor, no preparo doméstico ou industrial.

## **2.3 ENZIMAS**

As enzimas têm sido utilizadas há muitos anos no processamento de alimentos, e na produção de queijos e vinhos, e esta utilização tem expandido rapidamente, principalmente nas duas últimas décadas, sendo as hidrolases e oxirredutases as que possuem maior utilização (WONG, 1995).

### **2.3.1 Enzimas proteolíticas**

As enzimas proteolíticas, peptidases, pertencem à subclasse 4 da classe das hidrolases. As proteases são divididas em sub-subclasses de acordo com seu mecanismo catalítico, conforme representado na Tabela 5. Os dois maiores grupos dessas sub-subclasses compreendem as exopeptidases e as endopeptidases (BEYOND & BOND, 2001).

As exopeptidases são enzimas que atuam próximo às extremidades N-terminal ou C-terminal das cadeias polipeptídicas. Dentre aquelas que atuam na extremidade N-terminal encontram-se as: aminopeptidases (EC 3.4.11.) – as quais liberam um único resíduo de aminoácido, e as dipeptidil-peptidase ou tripeptidil-peptidase (EC 3.4.14.) – as quais liberam dipeptídeos ou tripeptídeos, respectivamente. Agora, dentre as enzimas que atuam na extremidade C-terminal livre estão as carboxipeptidases (EC 3.4.16-18) – as quais liberam um único resíduo, e as peptidil-dipeptidases (EC 3.4.15.) – as quais liberam dipeptídeos. As carboxipeptidases são agrupadas ainda em três grupos, as serino-carboxipeptidases (EC 3.4.16), as metalocarboxipeptidases (EC 3.4.17.) e por último as cisteino-carboxipeptidases (EC 3.4.13.). Há também as omega-peptidases (EC 3.4.19), as quais removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas (BEYOND & BOND, 2001).

As endopeptidases são enzimas as quais clivam as ligações internas da cadeia polipeptídica e são divididas baseadas no mecanismo catalítico e especificidade em: serino endopeptidases (EC 3.4.21.) – as quais possuem um centro ativo envolvido na catálise da serina; cisteino endopeptidases (EC 3.4.22.) – as quais possuem o centro ativo específico para a cisteína; aspartico endopeptidases (EC 3.4.23.) – as quais são dependentes de resíduos de ácido aspártico, e por último as metaloendopeptidases (EC 3.4.24.) – aquelas que utilizam metais em suas reações catalíticas, e por último as treonina endopeptidases (EC 3.4.25.). Geralmente a cadeia polipeptídica resultante da clivagem de uma endopeptidase pode ter vários tamanhos (BEYOND & BOND, 2001).

**Tabela 5 - Subdivisão das peptidases baseada no mecanismo catalítico**

<b>Código</b>	<b>Tipo de peptidase</b>	<b>Número de enzimas pertencentes</b>	
3.4.11	Aminopectidases	19	
3.4.13	Dipeptidases	12	
3.4.14	Dipeptidil-peptidases	8	
3.4.15	Exopeptidases	Peptidil-dipeptidases	3
3.4.16		Serina carboxipeptidases	4
3.4.17		Metalocarboxipeptidases	19
3.4.18		Cisteina carboxipeptidase	1
3.4.19		Omega peptidases	11
3.4.21		Serina endopeptidases	75
3.4.22		Cisteína endopeptidases	26
3.4.23	Endopeptidases	Aspártico endopeptidases	32
3.4.33		Metaloendopeptidases	69
3.4.99		Endopeptidases de tipos desconhecidos	2

Fonte: BEYOND & BOND, 2001.

### **2.3.2 Enzimas comerciais**

Estão disponíveis comercialmente, diversas enzimas provenientes de microorganismos e vegetais, aprovadas pela FAO/WHO e FCC (Food Chemical Codex) para serem utilizadas no processamento de alimentos. Abaixo, estão descritas algumas características das proteases comerciais utilizadas no presente estudo.

### **Protemax<sup>®</sup> 580 L**

Protemax<sup>®</sup> 580 L é uma preparação enzimática comercial a base de proteases alcalinas de grau alimentício, derivadas de uma cepa selecionada de *Bacillus licheniformis*, produzida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil), com especificações de pureza recomendadas para as enzimas de grau alimentício definidas pela FAO e pela FCC. Tem sido largamente utilizada em processos de hidrólise e extração de diferentes tipos de proteína. A faixa de pH recomendada é de 7 a 10, com um ótimo em 9,5. Entretanto, o valor de pH para se atingir a melhor performance depende de parâmetros como temperatura, tempo de reação, natureza do substrato e sua concentração. É efetiva nas temperaturas de 25 a 75 °C, com um ótimo em 60 °C. Da mesma forma que o pH, a temperatura ótima para o processo também depende de variáveis como o tempo de reação, pH, natureza do substrato e concentração. Está disponível na forma líquida e apresenta coloração marrom, com densidade igual a 1,1 g/mL (PROZYN, 2005)<sup>1</sup>.

### **Corolase<sup>®</sup> TS**

A Corolase<sup>®</sup> TS é um preparado enzimático proteolítico que possui atividade exclusiva de endopeptidase, derivado de *Bacillus stearothermophilus*, produzido pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil), que atende às especificações da FAO e FCC. É utilizada na hidrólise controlada de várias proteínas e apresenta melhor desempenho em valores de pH neutro a ligeiramente alcalino, com pH ótimo igual a 8,0. Devido a sua excelente estabilidade térmica pode ser utilizada em reações com temperatura elevada e apresenta atividade ótima a 80 °C. É comercializada sob a forma líquida, apresentando coloração marrom clara e cheiro característico, com densidade igual a 1,15 g/mL (AB ENZYMES, 2002)<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> PROZYN. Especificações técnicas de enzimas. s.n., 2005. 2p

<sup>2</sup> AB ENZYMES. Corolase<sup>®</sup> TS: *Description and Specification*. Rev. Nr. 00. 2002, 2p.

### **Protemax<sup>®</sup> N200**

Protemax<sup>®</sup> N200 é um produto constituído por proteases neutras derivadas de uma cepa selecionada do *Bacillus subtilis* capaz de hidrolisar diferentes fontes protéicas em peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos, produzido pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). É estável em uma faixa de pH de 4,5 a 7,5 com um valor ótimo entre 7 e 7,5, e temperatura ótima de atuação de 55 °C (PROZYN, 2005)<sup>3</sup>.

### **Corolase<sup>®</sup> 7089**

Corolase<sup>®</sup> 7089 é um produto constituído de enzimas proteolíticas, obtidas de culturas de *Bacillus subtilis*, contendo atividade exclusiva de endopeptidase produzida pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil), que atende às especificações da FAO e FCC. A Corolase<sup>®</sup> 7089 é utilizada na hidrólise de proteínas de diferentes fontes como, gelatina, peixe e proteínas do leite. Os valores de pH e temperatura ótimos de atuação são, respectivamente, 7,0 e 55 °C (AB ENZYMES, 2001)<sup>4</sup>.

### **Corolase<sup>®</sup> LAP**

A Corolase<sup>®</sup> LAP é um preparado enzimático proteolítico, contendo exclusivamente atividade de exopeptidase, produzido pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil) que atende às especificações da FAO e Food Chemical Codex (FCC). Segundo dados do fabricante, é um produto derivado de culturas de *Aspergillus sojae*, que apresenta atividade ótima no pH 9 e temperatura de 70 °C. É comercializada sob forma de líquido marrom claro com cheiro característico e densidade igual a 1,2 g/mL (AB ENZYMES, 2001)<sup>4</sup>.

---

<sup>3</sup> PROZYN. Especificações técnicas de enzimas. s.n., 2005. 2p

<sup>4</sup> AB ENZYMES. Corolase<sup>®</sup> 7089, Corolase<sup>®</sup> LAP, Corolase<sup>®</sup> L10: *Description and Specification*. Rev. Nr. 02. 2001, 6p.

## **Corolase® L10**

Corolase® L10 é um preparado enzimático obtido a partir da *Papaya carica* (EC 3.4.22.2), sendo, portanto, uma papaína. É produzida pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil), atende às especificações da FAO e FCC e possibilita uma hidrólise protéica de alta eficiência e baixo custo. Possui a vantagem de ter uma ampla faixa de pH de atuação, adaptando-se aos mais diversos processos. Segundo a AB ENZYMES (2003), a Corolase® L10 apresenta elevada solubilidade, sendo comercializada sob a forma de um líquido amarelo claro com cheiro característico, com densidade igual a 1,2 g/mL. Possui atividade ótima sob uma larga faixa de pH (3 a 9) e temperatura (50 – 70 °C)<sup>4</sup>.

## **2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS**

Diferentes procedimentos para a extração química das proteínas do feijão são relatados na literatura. Segundo SUN & HALL (1975) e MARQUEZ & LAJOLO (1981), a maioria das proteínas dos vegetais é usualmente fracionada com base em suas diferentes solubilidades em água (fração albumina) e em solução salina (fração globulina).

Segundo SGARBIERI (1996), cerca de 80% das proteínas dos grãos de feijão podem ser extraídas em solução 0,3 N de NaCl. ISHINO & D ORTEGA (1975), utilizaram solução de NaCl 0,5 M para extrair as proteínas do feijão e obtiveram rendimento de 88,4%. CHANG & SATTERLEE (1981) também utilizaram NaCl 0,5 M e obtiveram um rendimento de 84%.

SHEHATA & THANNOUN (1981) utilizaram diferentes soluções salinas e obtiveram os seguintes rendimentos: 87,58% com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 N), 82,22% com sulfito de sódio (0,025 N), 79,93% com citrato de sódio (0,05 N) e 78,78% com NaCl (0,5 N). Estes autores também utilizaram soluções de HCl e de NaOH variando pH, tempo e temperatura de reação, e obtiveram os melhores resultados entre 77,63 e 85,28%. SATHE & SALUNKHE (1981), ao utilizarem extração seqüencial, alcançaram rendimento de 87,6% (ácido/base) e 88,5% (água/ácido/base). Já MARQUEZ & LAJOLO (1981) utilizaram para a extração solução de NaCl (0,5 N) com ascorbato (0,25 M) obtendo 62% de extração .

A utilização de condições alcalinas na extração de proteínas pode causar reações secundárias indesejáveis e potencial toxicidade, tal como a formação de

lisinoalanina, acarretando perda do valor nutritivo das proteínas. Outras conseqüências são, a ocorrência de reação de Maillard, a qual causa o escurecimento dos produtos, e a maior extração de componentes não protéicos que co-precipitam com a proteína e diminuem a qualidade do isolado protéico (WANG et al., 1999).

Com o objetivo de aumentar o rendimento do processo de extração protéica de diversas matérias primas, é importante controlar variáveis como: tempo e temperatura de reação, tamanho de partículas da matéria-prima moída, agitação mecânica, além da concentração e do tipo de solvente (DICKEY, 1999).

Não foram encontrados na literatura trabalhos abordando a utilização de enzimas na extração das proteínas do feijão. Entretanto, várias enzimas têm sido utilizadas na extração de proteínas. Entre estas, encontram-se a pancreatina, proteases alcalinas, fúngicas ou bacterianas (EUBER et al., 1991); um complexo de proteases (Flavourzima do *Aspergillus oryzae*) seguido de uma preparação de carbohidrase e amilase (TANG et al., 2002);  $\alpha$ -amilase (BAN 240 L) e protease (Prozyme 400 L) (AGBOOLA et al., 2005). No mesmo laboratório do presente estudo, CAPOBIANGO et al. (2007) utilizaram a enzima de *Bacillus licheniformis* (Protemax<sup>®</sup> 580L) na extração das proteínas do fubá de milho, e VIEIRA (2007) utilizou além desta enzima uma de *Bacillus subtilis* (Protemax<sup>®</sup> N200), na extração das proteínas da farinha de arroz.

FREITAS et al. (1998), estudando a incubação em meio aquoso do grão de soja extrusado, com enzimas celulolíticas e proteolíticas, obtiveram um rendimento de 74% na extração das proteínas. A análise por eletroforese mostrou, ainda, que toda esta proteína 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 uso potencial no preparo de alimentos e bebidas.

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 carbohidrase do *Aspergillus aculeatus* e do *Humicola insolens*. O uso das proteases mostrou-se eficiente na obtenção de 89 a 94% das proteínas da farinha de soja, já as carbohidrases não contribuíram na extração das 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.

O conhecimento da solubilidade das proteínas é importante na seleção das

condições ótimas para sua extração. 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. Segundo SGARBIERI (1996), o excesso de cargas de mesmo sinal produz repulsão das moléculas, que contribui para sua maior solubilidade. Portanto, em geral, as proteínas são mais solúveis em meio ácido ou alcalino, por causa do excesso de cargas positivas ou negativas.

Outro fator importante é a temperatura. A maioria das proteínas é solúvel à temperatura ambiente e a solubilidade tende a aumentar à medida que a temperatura é elevada até 40-50 °C. Acima deste valor, as proteínas começam a sofrer desnaturação e a solubilidade tende a diminuir (SGARBIERI, 1996). No processo de extração enzimático, 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.

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

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

Diversas preparações enzimáticas têm sido utilizadas na obtenção de extratos protéicos de soja, arroz e trigo (EUBER et al., 1991; FISCHER et al., 2001; TANG et al., 2002; WANG & WANG, 2004; AGBOOLA et al., 2005). Com objetivo de produzir suplementos nutricionais para fenilcetonúricos, CAPOBIANGO et al. (2007) e

VIEIRA (2007) extraíram enzimaticamente as proteínas do fubá de milho e da farinha de arroz, respectivamente. CAPOBIANGO et al. (2007) utilizaram a enzima Protemax<sup>®</sup> 580L e obtiveram percentuais de extração entre 71,5 e 86,8% e verificaram que o tempo e a temperatura influenciaram no rendimento da extração. VIEIRA (2007) avaliou o tipo de enzima, pH, temperatura, tratamento físico, concentração de matéria-prima e relação enzima-substrato na extração das proteínas obtendo resultados de extração que variaram de 28,6 a 63,6%.

## 2.5 HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS

A hidrólise de proteínas é basicamente o resultado da clivagem de suas ligações peptídicas, liberando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. 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 utilização e dos objetivos a serem alcançados. Os métodos que utilizam pH alcalino e ácido são de difícil controle, originam produtos com reduzida qualidade nutricional, podem destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar racemização dos aminoácidos. Entretanto, também há desvantagens no processo enzimático. Entre elas, podem-se destacar: a instabilidade enzimática, a influência das condições de pH e temperatura, e a concentração do substrato (ADLER-NISSEN, 1981; LAHL & BRAUN, 1994; BERNARDI, 2000; CLEMENTE, 2000; FURLAN & OETTERER, 2002).

No entanto, segundo PEARCE (1995) e BERNARDI (2000), os processos alcalinos e ácidos 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) especificidade na atuação das enzimas; (2) o método é não destrutivo; (3) as enzimas agem rapidamente e, teoricamente, completam a hidrólise em apenas alguns minutos; (4) permite o controle do grau de hidrólise; (5) deixa menor conteúdo de sal no hidrolisado final; e (6) há formação mínima de subprodutos (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995; BERNARDI, 2000; CLEMENTE, 2000; GUADIX et al., 2000).

Um efeito freqüente da hidrólise enzimática, e que representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados, constitui o desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise. Este parece estar relacionado, pelo menos em parte, à liberação de aminoácidos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas ou devido ao tamanho dos peptídeos formados (ROLAND et al., 1978; ADLER NISSEN, 1981; COGAN et al., 1981; STANLEY, 1981; UMETSU et al., 1983; MINAGAWA et al., 1989; NAKAMURA et al., 1993; YEOM et al., 1994; LIN et al., 1997). Várias alternativas como, tratamento com carvão ativado, extração com álcool, precipitação isoelétrica, cromatografia em sílica gel, cromatografia de interação hidrofóbica, adição de polifosfatos, glicina ou ciclodextrina durante o processo de hidrólise e aplicação/tratamento de exopeptidases, têm sido utilizadas na tentativa de prevenir, eliminar ou mascarar, esse efeito (COGAN et al., 1981; PEDERSEN, 1994; SAHA & HAYASHI, 2001). Outra possibilidade para reduzir o sabor amargo dos hidrolisados protéicos, é a encapsulação do hidrolisado em lipoesferas e lipossomas, técnica esta empregada por MORAIS et al. (2004, 2005) em hidrolisados de caseína produzidos pela ação da papaína.

Algumas variáveis devem ser controladas durante a reação enzimática para se alcançar os resultados desejados, como a escolha da enzima, o pH, tempo e temperatura de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima:substrato e inativação enzimática ao final do processo. Deve-se ter, também, um método eficiente para a determinação do grau de hidrólise (SILVESTRE et al., 1993; CÂNDIDO, 1998).

A escolha e o controle da quantidade da enzima proteolítica são de extrema importância, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e ao teor de aminoácidos livres, os quais influenciam no desenvolvimento do sabor amargo (CHATAUD et al., 1988; FREITAS et al., 1998; CLEMENTE, 2000).

Na produção de hidrolisados, associações de enzimas de ampla especificidade têm também sido empregadas, levando a uma hidrólise extensa, com maior porcentagem de pequenos peptídeos e aminoácidos (REED, 1975; GUADIX et al., 2000). Para obter hidrolisados a serem usados em formulações especiais, tem-se utilizado, preferencialmente, uma reação seqüencial de endopeptidases e exopeptidases. O uso inicial de endopeptidases facilita a ação das exopeptidases em uma segunda etapa, acarretando uma degradação mais completa (CLEMENTE, 2000).

Ao final do processo deve-se interromper a reação pela inativação da enzima. Para isto, geralmente são empregadas mudanças no valor de pH ou temperaturas suficientemente altas, entre 80 e 90 °C, por 10 a 20 min, para provocar a desnaturação da molécula enzimática (LOOSEN et al., 1991; BOBBIO & BOBBIO, 1992; NAKAMURA et al., 1993; SILVESTRE et al., 1994a,b; MORATO et al., 2000). Além disto, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é freqüentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (REED, 1975).

O processo de hidrólise enzimática tem propiciado uma melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL, 1993; SILVA & SILVESTRE 2003; VIANA et al., 2004, 2005; VIEIRA et al., 2006; CAPOBIANGO et al., 2007). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise das proteínas da soja e de outros vegetais, para a solubilização de concentrados protéicos de peixes, para amaciar carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor nutritivo dos produtos (CHEFTEL et al., 1989).

Dietas baseadas em peptídeos em substituição a proteínas são largamente utilizadas na nutrição de pacientes com desordens metabólicas específicas (DE FREITAS et al., 1993). Tais formulações constituem a base de alimentos especiais empregados no tratamento de diferentes doenças tais como, fenilcetonúria, fibrose cística, doença de Crohn e intolerância ou alergia alimentar (WEAVER et al., 1993).

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (GRIMBLE et al., 1986; VIJAYALAKSHIMI et al., 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE et. al., 1985; GRIMBLE et al., 1986; RÉRAT, 1993; BOZA et al., 2000). Além disso, o fato de os aminoácidos dos hidrolisados estarem, em grande parte, agrupados em peptídeos, proporciona uma menor osmolaridade possibilitando boa absorção de outros componentes da dieta, reduzindo a incidência de diarreia osmótica e permitindo sua utilização de forma enteral (ADIBI, 1989; FURST et al., 1990;

PARRADO et al., 1991; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994).

Alguns pesquisadores têm apontado os hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe como o substituto protéico mais adequado no tratamento dos fenilcetonúricos. Para a produção de tais hidrolisados, o processo enzimático vem sendo o mais indicado, não somente por sua viabilidade de produção em larga escala e custo moderado, mas também pela alta qualidade dos produtos. Comumente é utilizada nessa etapa, no mínimo duas enzimas, uma das quais com especificidade para aminoácidos aromáticos (pepsina, carboxipeptidases) e outra com especificidade ampla, agindo sobre a maioria das ligações peptídicas, como a papaína e proteases de diversas origens (MONCHI & RERAT, 1993; CLEMENTE et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

## 2.6 REMOÇÃO DE FENILALANINA

A fenilalanina é um aminoácido comum que usualmente está presente em todas as proteínas de origem animal ou vegetal na proporção de 3 a 6%. Considerando que o tratamento da PKU é essencialmente dietético, o qual preconiza a baixa ingestão de proteínas naturais, vários métodos têm sido propostos com o intuito de reduzir este aminoácido em alimentos (OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

A hidrólise enzimática expõe a Phe, possibilitando sua posterior remoção. Vários métodos têm sido utilizados para a remoção de fenilalanina, 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. Na escolha do método de remoção deve ser levado em consideração a praticidade, a reprodutibilidade e a relação custo/eficiência de cada tratamento (CONNOR et al., 1976; EUBER et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; BOBBIO & BOBBIO, 1992; OUTINEN, et al., 1996; DICKEY et al., 1999; SHIIMAMURA et al., 1999).

O carvão ativado vem sendo utilizado por vários autores para a remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos. Assim, KITAGAWA et al. (1987) utilizaram carvão ativado e obtiveram 97% de remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) removeram 92% de Phe de hidrolisados de caseína e leite em pó desnatado utilizando o mesmo meio adsorvente, e MOSZCZYNSKI & IDIZIAK (1993) removeram cerca de 90% de Phe de hidrolisado de

caseína também utilizando carvão ativado.

Em estudos realizados 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% 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 na remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de fubá de milho atingindo até 97,5% de remoção (CAPOBIANGO et al., 2007), de leite desnatado chegando a 99% de remoção (SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2006), 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., 2006, 2007) e 99% (DELVIVO et al., 2006).

## **2.7 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA**

Vários métodos estão 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 de 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 é um método quantitativo e qualitativo, que baseia-se na derivação do espectro de absorção normal dos compostos analisados, sendo considerada uma técnica analítica simples, rápida e de custo relativamente baixo (ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981; O'HARVER, 1979; RAGONE et al., 1984; ROJAS et al., 1988).

SILVESTRE et al. (1993) utilizaram a EDS para avaliar a pureza de hidrolisados comerciais e observaram 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 foi empregada para determinar a Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó (LOPES et al., 2005a,b; SOARES et al., 2006), de soro de leite (DE MARCO et al., 2005; DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007), de arroz em grão

(BIZZOTTO et al., 2006a,b), de fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), e de farinha de arroz (VIEIRA, 2007).

A EDS foi empregada por SILVESTRE et al. (1993) para analisar hidrolisados de caseína. Com este método, os autores estimaram o grau de hidrólise e a homogeneidade do hidrolisado (presença de hidrolisado protéico ou mistura de aminoácidos). Além disso, essa técnica foi utilizada para avaliar a taxa de encapsulação de hidrolisados enzimáticos de caseína (BARBOSA et al., 2004; MORAIS et al., 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GERAL**

Obter um hidrolisado protéico de feijão com teor reduzido de fenilalanina que possa ser utilizado no desenvolvimento de um feijão destinado a fenilcetonúricos.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a composição química do feijão.
- Extrair enzimaticamente as proteínas do feijão.
- Obter, por método enzimático, hidrolisados protéicos de feijão.
- Remover a fenilalanina dos hidrolisados por meio do carvão ativado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) foi adquirido no comércio de Belo Horizonte, MG, Brasil. Foram utilizados três pacotes de 1 kg do mesmo lote do feijão carioca tipo 1 (PINK, Belo Horizonte, MG, Brasil). As proteases, Protemax<sup>®</sup> 580 L proveniente do *Bacillus lichenformis*, e a Protemax<sup>®</sup> N200 de origem de *Bacillus subtilis* foram cedidas pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). As proteases, Corolase<sup>®</sup> LAP proveniente de *Aspergillus sojæ*, Corolase<sup>®</sup> 7089 proveniente de *Bacillus subtilis*, a Corolase<sup>®</sup> L10 proveniente de *Papaya carica* e a Corolase<sup>®</sup> TS de origem de *Bacillus stearothermophilus* foram doadas pela AB Enzymes Brasil Comércio Ltda (Barueri, SP, Brasil). Carvão ativado com três diferentes granulometrias (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.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Determinação da composição centesimal do feijão

Foi feito um “pool” dos três pacotes de feijão adquiridos, que em seguida foi moído em moinho (Marconi – TE 020, série 870348, Piracicaba, SP) e passado em tamis de 42 Mesh para se obter uma farinha homogênea. O feijão moído foi acondicionado em potes de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração até o momento de uso.

A composição química do feijão foi determinada segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), sendo todas as análises realizadas em triplicatas. 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 utilizando 6,25 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína total

(GREENFIELD & SOUTHGATE, 1992); 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. O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteínas, lipídeos totais e cinzas, e inclui a fibra alimentar total.

#### **4.2.2 Extração enzimática das proteínas do feijão**

No preparo do extrato protéico de feijão foram testados dois métodos enzimáticos de extração, já utilizados no mesmo laboratório do presente trabalho por CAPOBIANGO et al. (2007) e VIEIRA (2007), originalmente empregados na extração das proteínas do fubá de milho e farinha de arroz, respectivamente. Destes dois métodos testados, o que levou ao maior rendimento de extração protéica (REP) foi utilizado para avaliar os demais parâmetros.

Ao utilizar o método otimizado por CAPOBIANGO et al. (2007), o feijão moído foi suspenso em água na proporção de 1:5 (p/v). A suspensão foi agitada em ultra-turrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 19.000 rpm por 5 min, e a enzima (Protemax<sup>®</sup> 580L – *Bacillus lichenformis*) adicionada na relação enzima:substrato (E:S), de 1:10. Utilizou-se pH de 9,5, temperatura de 55 °C e tempo de reação de 5 h. 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. Após 5 h de reação sob agitação constante, a suspensão foi resfriada a 25 °C e centrifugada por 15 min a 1700 g. O extrato protéico do feijão (EPF) foi recolhido 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 EPF no mesmo recipiente. O resíduo foi pesado e submetido à determinação do teor de proteína.

No método otimizado por VIEIRA (2007), que utiliza a mesma enzima, o processo foi semelhante, diferenciando-se por utilizar, o pH inicial em 10,5, a temperatura de 50 °C, a suspensão em água na proporção 1:10 (p/v) e não utilizar agitação em ultra-turrax.

### **4.2.3 Avaliação do efeito de alguns parâmetros sobre o rendimento da extração protéica**

Após determinar qual dos métodos foi o mais eficiente, os parâmetros velocidade de centrifugação, tempo, pH, temperatura de reação e o emprego de diferentes tipo de protease foram avaliados, visando otimizar o processo e aumentar o rendimento de extração protéica (REP).

#### ***Velocidade de centrifugação***

Utilizando a condição em que se obteve o maior REP no item 3.2.2, ao final da extração protéica, verificou-se que mesmo após a centrifugação, ocorreu uma precipitação do EPF. Visando eliminar ou diminuir esta precipitação, variou-se a velocidade de centrifugação em 425, 1 700, 3 800, 6 800 e 10 640 g. Para avaliar este efeito após a extração, o extrato protéico foi colocado em fracos de mesma dimensão e guardado na geladeira e, após um mesmo período de tempo (6 dias), a altura do precipitado formado foi medida com régua, sendo a velocidade de centrifugação em que se formou o menor precipitado considerada a melhor.

#### ***Tempo de reação***

Para estudar o efeito do tempo de reação sobre a extração enzimática das proteínas do feijão, foi utilizada a melhor condição obtida no item anterior (3.2.3.1) e variou-se o tempo de reação em 2 h, 3 h, 5 h e 6 h.

#### ***pH inicial***

Para avaliar este parâmetro foram testados diferentes valores de pH inicial (9,0; 9,5; 10,0; 10,5 e 11,0), com o tempo de reação em que se obteve o maior REP. Os valores de pH dos extratos obtidos foram medidos após o término da extração.

### ***Efeito da utilização de diferentes proteases***

Definidos os parâmetros acima, foram testadas cinco enzimas sendo quatro de origem microbiana (uma de *Bacillus licheniformis*, duas de *Bacillus subtilis* e uma de *Aspergillus sojae*) e uma de origem vegetal (*Papaya carica*). Todas as enzimas foram testadas na mesma relação E:S (10:100).

### ***Determinação do rendimento da extração protéica***

Para cada parâmetro estudado, exceto para a avaliação do efeito da velocidade de centrifugação, o rendimento da extração protéica (REP) foi determinado, conforme a Equação 1:

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

sendo:

A = Teor de proteína no feijão (g/100 g de feijão).

B = Quantidade de feijão utilizado na extração (g).

C = Peso do resíduo obtido na extração (g).

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

#### **4.2.4 Preparo dos Hidrolisados Protéicos Isentos de Fenilalanina**

Foram preparados 15 hidrolisados enzimáticos, tendo sido variados os seguintes parâmetros: temperatura, pH, relação enzima:substrato, emprego de diferentes proteases e relação proteína:carvão ativado (CA) (Tabela 6).

No preparo dos hidrolisados, 40 mL do extrato protéico de feijão foi colocado em erlenmeyer e o pH medido. Em seguida, levou-se ao banho de vaselina líquida, sobre agitador magnético, com agitação constante, para que fosse atingida a temperatura a ser avaliada. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se a enzima a ser analisada na quantidade suficiente para atingir a relação E:S desejada. Ao final da reação, o processo foi interrompido por aquecimento em banho-maria a 80 °C por 20 min.

No caso dos hidrolisados H1 a H8, 40 mL do extrato protéico de feijão foi colocado em erlenmeyers e o pH medido. O erlenmeyer com o extrato protéico foi, então, levado ao banho de vaselina líquida a 50 °C, sobre agitador magnético, com agitação constante. Estabilizada a temperatura, as diferentes enzimas foram adicionadas em quantidades suficientes para se obter a relação E:S desejada (4:100). Após 5 h, a reação foi interrompida por aquecimento em banho-maria a 80 °C, por 20 min. Ressalta-se, ainda, que nos hidrolisados H7 e H8 a relação proteína:CA utilizada foi de 1:44 e 1:16, respectivamente, enquanto em todos os outros a relação foi de 1:88.

Para o preparo do hidrolisado H9, seguiu-se o mesmo procedimento acima, exceto que a temperatura de reação utilizada foi de 25 °C. Quanto ao preparo dos hidrolisados H10, H11 e H12, foi utilizado o mesmo processo dos hidrolisado H1 a H8, entretanto variou-se o pH inicial da reação em 8,0, 9,0 e 11,0 respectivamente. E os hidrolisados H13, H14 e H15, os quais também tiveram o mesmo procedimento de preparo citado anteriormente, diferiram quanto à relação E:S, que foi de 5:100, 7:100 e 10:100, respectivamente.

**Tabela 6 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de feijão e remoção de fenilalanina**

Hidrolisados	Hidrólise enzimática				Remoção de Phe
	Protease	pH	E:S	Temperatura (°C)	Relação proteína:CA
H1	<i>B. licheniformes</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H2	<i>B. stearothermophilus</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H3	<i>B. subtilis (PROZYN)</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H4	<i>B. subtilis (AB ENZIMES)</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H5	<i>Aspergillus sojae</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H6	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H7	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:44
H8	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:16
H9	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	25	1:88
H10	<i>Papaya carica</i>	8,0	4:100	50	1:88
H11	<i>Papaya carica</i>	9,0	4:100	50	1:88
H12	<i>Papaya carica</i>	11,0	4:100	50	1:88
H13	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	5:100	50	1:88
H14	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	7:100	50	1:88
H15	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	10:100	50	1:88

E:S = Relação enzima substrato; CA = Carvão ativado; pH sem ajuste = 8,4.

#### **4.2.5 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados**

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos de feijão pela utilização do CA, como meio adsorvente. Foi empregado o procedimento de passagem por coluna, descrito por SOARES et al. (2006). O CA foi hidratado 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. A coluna de carvão ativado foi montada colocando-se primeiro o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por último o de maior granulometria. 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.

#### **4.2.6 Efeito de alguns parâmetros sobre o preparo dos hidrolisados protéicos isentos de fenilalanina**

O efeito do tipo de enzima foi testado empregando-se cinco diferentes proteases de microorganismos, e uma papaína (H1 a H6). O efeito da relação proteína:CA, foi estudado nas seguintes proporções 1:88, 1:44 e 1:16 (H6, H7 e H8, respectivamente). Para avaliar o efeito da temperatura foram testados os valores de 50 e 25 °C (H6 e H9). Para o estudo da influência do pH foram utilizados os seguintes valores iniciais; sem ajuste (8,4), e com ajuste para 8,0, 9,0 e 11,0 (H6, H10, H11 e H12, respectivamente). Finalmente, para o estudo da influência da relação enzima:substrato foram utilizadas as relações de 4:100, 5:100, 7:100 e 10:100 (H6, H13, H14 e H15, respectivamente).

#### **4.2.7 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, no feijão 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 (2):

$$(2) \quad \% \text{ Remoção de Phe} = \frac{[A - (B \times C/D)]}{A} \times 100$$

sendo,

A = Teor de Phe no feijão (g/100 g de feijão)

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

C = Teor de proteína no feijão (g/100 g de feijão), e

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

#### 4.2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em três repetições e as análises foram realizadas em triplicata. Para comparar o REP em relação à variação dos parâmetros empregados na extração enzimática das proteínas do feijão e a porcentagem de remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan para comparação de médias, ambos a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 2000).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO FEIJÃO

Os dados referentes à composição química do feijão *Phaseolus vulgaris* estão apresentados na Tabela 7. De uma forma geral, a composição do feijão assemelha-se a dados encontrados na literatura. Algumas diferenças encontradas podem ser explicadas pelo fato de que diferentes cultivares apresentam diferenças em sua composição química e que fatores ambientais afetam a composição do grão.

**Tabela 7 - Comparação do resultado da composição química do feijão utilizado no presente trabalho e de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*)**

Componentes (% em base seca)	Cultivares			
	Carioca <sup>1</sup>	Carioca <sup>2</sup>	Carioca <sup>3</sup>	Diversos <sup>4</sup>
Proteínas	<b>23,68</b>	23,37	23,26	21,08
Lipídeos	<b>1,66</b>	1,45	1,51	1,53
Cinzas	<b>3,40</b>	4,18	4,07	4,14
Carboidratos	<b>71,26</b>	71,00	71,16	73,24

<sup>1</sup>Feijão utilizado no trabalho

<sup>2</sup>ANTUNNES et al., (1995).

<sup>3</sup>Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. 2ª edição, Campinas, SP, 2006.

<sup>4</sup>USP, 1998. Valores referentes a Feijão, tipos diversos, *Phaseolus vulgaris*.

Observa-se que os valores encontrados para proteínas, lipídeos e carboidratos foram muito próximos aos encontrados por ANTUNNES et al. (1995), e aos relatados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006). Considerando que ambos utilizaram a mesma cultivar, estas diferenças podem ser devidas a efeitos de fatores ambientais e condições de cultivo, pois segundo SGARBIERI (1996), a composição química do feijão depende do cultivo e da cultivar. Os valores obtidos são também semelhantes aos valores da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA (USP, 1998). As diferenças entre os valores encontrados e os relatados na tabela podem ser justificadas pelo fato destes últimos representarem não apenas a cultivar carioca, mas sim valores obtidos de diversos tipos de feijão

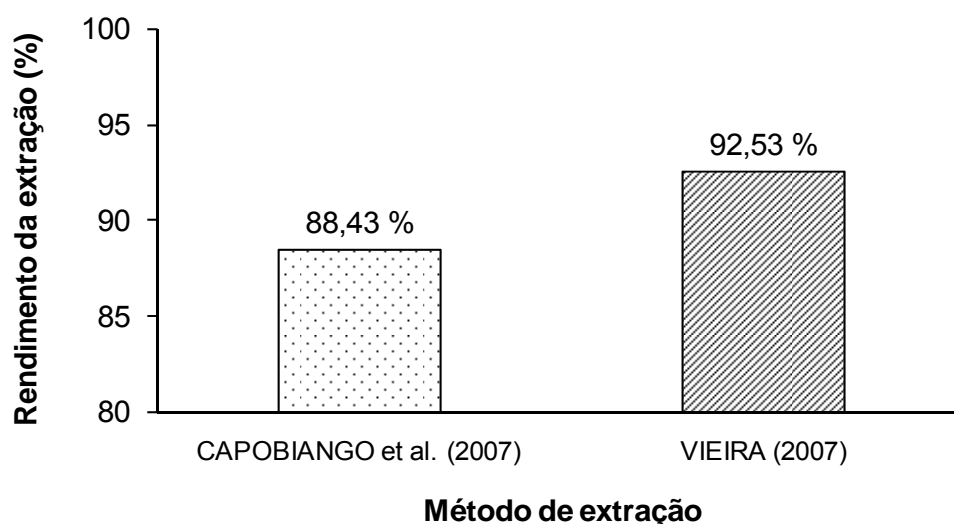
*Phaseolus vulgaris*.

Os teores obtidos de proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos também se assemelham aos valores encontrados por BERRIOS et al. (1999), SHIMELIS & RAKSHIT (2005) e COSTA et al. (2006). As diferenças encontradas podem ser devido ao fato de estes autores utilizarem diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris* em seus experimentos.

## 5.2 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO FEIJÃO

### 5.2.1 Efeito do método de extração protéica

Na Figura 5, estão apresentados os percentuais de rendimento da extração das proteínas do feijão, obtidos pelos métodos utilizados por CAPOBIANGO et al. (2007) e VIEIRA (2007), em trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho.



**Figura 5 - Efeito de diferentes métodos sobre o rendimento da extração protéica do feijão.** Os valores diferem entre si a 5% de probabilidade pela análise de variância (ANOVA fator único).

Pode-se observar que ambos os métodos foram eficientes na extração das proteínas do feijão, entretanto, o método de extração enzimático utilizado por VIEIRA (2007), foi mais eficiente e significativamente diferente, pela análise de Variância (ANOVA fator único), a 5% de probabilidade, do que o método utilizado por CAPOBIANGO et al. (2007), na extração das proteínas do feijão.

Apesar dos dois métodos utilizarem a mesma enzima proveniente de *Bacillus licheniformis* (Protamax<sup>®</sup> 580 L), e a mesma relação E:S (10:100), a utilização de um maior valor de pH inicial, maior volume de água, e ainda, uma menor temperatura de reação, e a não agitação em ultra-turrax, no método de VIEIRA (2007), levaram a um aumento no REP do feijão de 88,43% para 92,53%.

A maior eficiência obtida ao utilizar o método de VIEIRA (2007), pode ser explicada pela composição das proteínas do feijão. Segundo SGARBIERI (1996), o feijão praticamente não possui prolaminas, proteínas solúveis em soluções alcoólicas (70 a 80% de etanol); apresenta um teor relativamente baixo de glutelinas, as quais são solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas; predominando as globulinas, solúveis em soluções salinas diluídas e depois as albuminas, solúveis em água. De acordo com MARQUEZ & LAJOLO (1981), as proteínas do feijão são constituídas de 52,3% de globulinas, 31,5% de albuminas e 24% de glutelina.

Assim, o fato de o método de VIEIRA (2007), utilizar um maior valor de pH inicial e uma maior proporção de água em relação à matéria-prima, pode ter levado a uma maior solubilização, respectivamente, das frações glutelina e albumina e, conseqüentemente, a uma maior extração destas frações, aumentando o REP com relação ao método de CAPOBIANGO et al. (2007).

Não foram encontrados na literatura dados sobre o rendimento da extração enzimática das proteínas do feijão. Diversos autores utilizando processos químicos de extração, com o emprego de soluções salinas diluídas (NaCl, sulfito de sódio e citrato de sódio), obtiveram rendimentos de extração que variaram de 62 a 88,4% (ISHINO & D ORTEGA, 1975; CHANG & SATTERLEE, 1981; MARQUEZ & LAJOLO, 1981; SHEHATA & THANNOUN, 1981). Utilizando também processos químicos de extração, porém desta vez, com o emprego de ácidos e bases (HCl e NaOH), de forma isolada ou seqüencial, SATHE & SALUNKHE (1981), e SHEHATA & THANNOUN (1981), alcançaram rendimentos que variaram de 77,63 a 88,5%.

Observa-se que o rendimento de extração das proteínas do feijão, obtido pela utilização do método otimizado por CAPOBIANGO et al. (2007) (88,43%), encontra-se

entre os valores mais altos citados na literatura, enquanto o REP obtido com o método otimizado por VIEIRA (2007), (93,14%), foi superior aos rendimentos obtidos pelos autores consultados. Os métodos utilizados, além de terem apresentado porcentagens de extração protéica igual ou superior às alcançadas pelos autores acima citados, apresentam a vantagem de serem métodos enzimáticos, o que diminui a possibilidade de ocorrência de reações secundárias e a formação de compostos com potencial toxicidade, que levariam a uma diminuição do valor nutricional das proteínas (WANG et al., 1999).

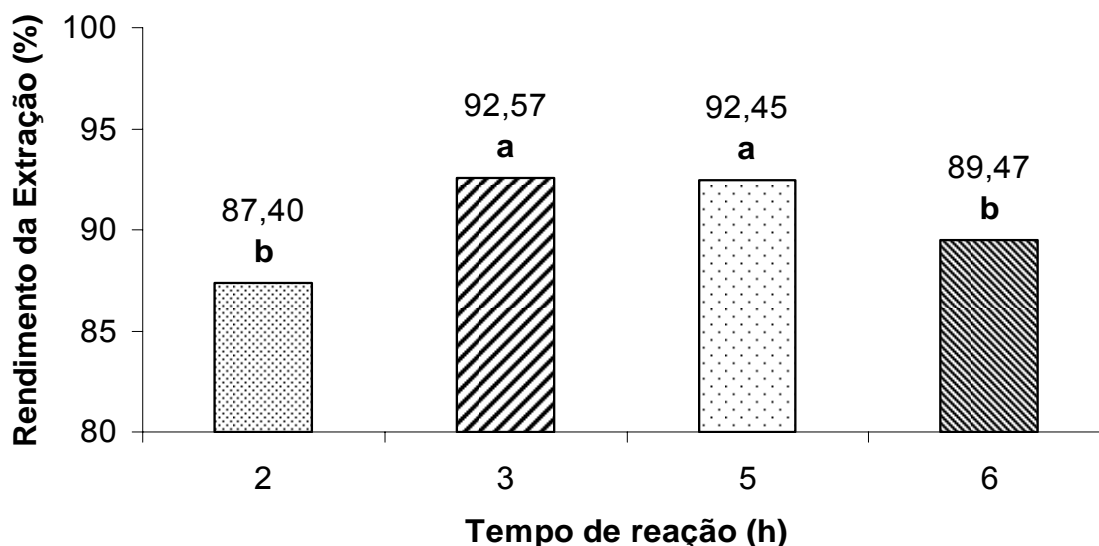
### **5.2.2 Efeito da variação da velocidade de centrifugação sobre a precipitação do extrato protéico**

Ao utilizar as velocidades de centrifugação de 425, 1700, 3800, 6800 e 10 640 *g*, a altura dos precipitados formados foram de 0,7; 0,6; 0,5; 0,45 e 0,3 cm, respectivamente. Observa-se que o aumento na velocidade de centrifugação no processo de extração das proteínas do feijão diminuiu a precipitação do extrato protéico, após a centrifugação. A menor quantidade de precipitado formada (0,3 cm), foi obtida utilizando a velocidade de 10.640 *g*. Portanto a velocidade de centrifugação passou a ser de 10.640 *g* e não mais de 1.700 *g* como no método de VIEIRA (2007).

A menor altura do precipitado formado após a extração protéica se deve ao fato de que a utilização de uma maior velocidade de centrifugação promove uma maior separação da fração solúvel, no qual se encontram as proteínas extraídas, da fração insolúvel, diminuindo a precipitação posterior do sobrenadante.

### 5.2.3 Efeito do tempo de reação

A influência do tempo de reação sobre o rendimento da extração das proteínas do feijão está apresentada na Figura 6.



**Figura 6 - Efeito do tempo de reação sobre o rendimento da extração das proteínas do feijão.** Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Pode-se observar que o aumento no tempo de reação não levou a um aumento linear do rendimento de extração das proteínas do feijão. O maior rendimento foi obtido após 3 e 5 h de reação (92,57 e 92,45%, respectivamente) para os quais não houve diferença significativa pelo teste de Duncan (5% de probabilidade). Seguidos pelos obtidos após 6 h (89,47%) e 2 h (87,40%), os quais também não apresentaram diferença significativa entre si a 5% pelo teste de Duncan.

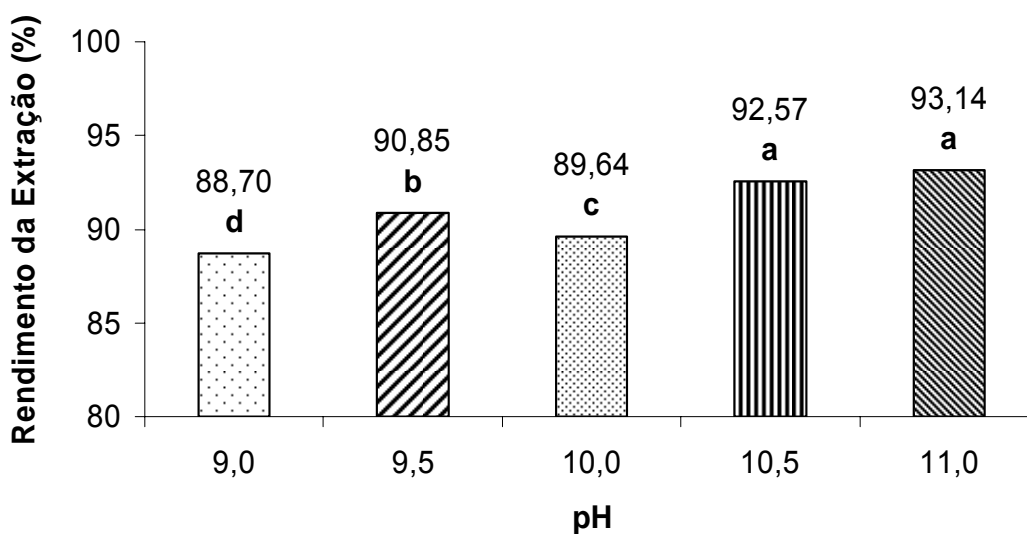
CAPOBIANGO et al. (2007), empregando a mesma enzima de *Bacillus licheniformis* utilizada neste trabalho, avaliaram o efeito do tempo de reação sobre a extração das proteínas do fubá de milho. Eles observaram uma elevação do REP ao aumentar o tempo de reação de 1 para 5 h (71,5% e 83,8% respectivamente), mas não observaram diferença significativa ao passar de 5 para 15 h e de 15 para 24 h, mostrando que também não houve aumento linear do REP com o aumento do

tempo de reação, nos tempos estudados.

O aumento observado no REP, ao passar de 2 para 3 h de reação, está de acordo com o esperado teoricamente. Segundo FISHER et al. (2001), o maior tempo de ação enzimática é importante para elevar o rendimento da reação, pois leva a uma hidrólise mais acentuada das moléculas protéicas originando peptídeos de cadeias mais curtas, os quais são mais solúveis. Entretanto, este efeito não foi observado ao aumentar o tempo de reação de 3 para 5 h. Possivelmente, a fração protéica não extraída após 3 h de reação estava constituída de proteínas que não são hidrolisadas pela enzima, seja pela ausência de um sítio de atuação para a enzima ou por impedimento estérico, como pode ocorrer com as glicoproteínas (lectinas e grande parte da globulinas do feijão), devido à presença do resíduo de carboidrato na molécula. Portanto, mesmo com um maior tempo de reação o rendimento de extração não aumenta.

#### 5.2.4 Efeito da variação do pH inicial

Na Figura 7 pode-se observar a influência do pH inicial sobre o rendimento da extração das proteínas do feijão.



**Figura 7 - Efeito da variação do pH inicial no rendimento da extração das proteínas do feijão.** Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Observa-se que os maiores rendimentos de extração foram obtidos com os ensaios realizados com pH inicial de 10,5 e 11,0 (92,57 e 93,14%), os quais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, seguidos pelo REPs obtidos com pH 9,5 (90,85%), 10,0 (89,64%) e por último com pH 9,0 (88,70%), os quais diferiram entre si e dos ensaios com pH 10,5 e 11,0 pelo teste de Duncan (5% de probabilidade).

A faixa de pH recomendada para a enzima utilizada (proveniente do *Bacillus licheniformis*) é de 7 a 10, com pH ótimo em 9,5 (segundo informações do fornecedor). Apesar deste valor ótimo, o emprego de valores mais elevados de pH levou a um maior rendimento na extração das proteínas. Uma das razões para este fato pode ser a maior solubilização da fração glutelina das proteínas do feijão, as quais são, segundo SGARBIERI (1996), solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas. Ou seja, a utilização de valores de pH mais alcalinos pode ter proporcionado uma maior solubilização da fração glutelina e, conseqüentemente, um aumento do REP. Observou-se, ainda, ao medir o pH ao final da reação, que ocorreu uma queda no valor de pH (de 9,0 para 7,35; de 9,5 para 7,59; de 10,0 para 7,73; de 10,5 para 8,05 e de 11,0 para 8,41). A utilização de um pH inicial mais elevado pode também ter permitido que o pH da reação permanecesse por um maior tempo próximo ao pH ótimo da enzima, favorecendo sua atuação (maior atividade enzimática), e levando a um maior rendimento de extração.

BIZZOTTO et al. (2006a) e VIEIRA (2007) também verificaram que o emprego de valores mais elevados de pH foi benéfico para o rendimento de extração das proteínas do arroz e da farinha de arroz, respectivamente. Assim, utilizando uma pancreatina (Corolase PP<sup>®</sup> - AB ENZYMES), BIZZOTTO et al. (2006a) obtiveram um aumento no rendimento de extração de 61,3% para 65,0% ao elevar o valor de pH de 9,0 para 12,0. No trabalho de VIEIRA (2007), ao passar de pH 9,5 para 11,0, obteve-se um aumento no REP de 53,5% para 63,6%, empregando a mesma enzima de *Bacillus licheniformis* utilizada neste trabalho.

A diminuição do pH, verificada ao término da reação, também foi observada por outros autores. EUBER et al. (1991), utilizaram uma pancreatina (Pancreatina 8X – American Laboratories, Inc.), em pH 8,0, para solubilizar as proteínas do resíduo de arroz obtido após a extração do amido pela ação de  $\alpha$ -amilase. Estes autores relataram que ao final do processo o pH ficou entre 6,9 e 7,5. CAPOBIANGO et al. (2007) e VIEIRA (2007), empregando a mesma enzima de *Bacillus licheniformis* utilizada no presente trabalho, na extração das proteínas do fubá

de milho e farinha de arroz, respectivamente, também verificaram a diminuição do pH ao término da extração. CAPOBIANGO et al. (2007) observaram que o pH, inicialmente ajustado para 9,5, ao final da extração situava-se em torno de 7,0. VIEIRA (2007) observou uma queda nos valores iniciais de pH de 10,5 e 9,5 para 7,4 e de pH 11,0 para 8,2. Este efeito se deve à hidrólise enzimática das 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 parcialmente a alcalinidade do meio (GUADIX et al., 2000; LEHNINGER, 2006).

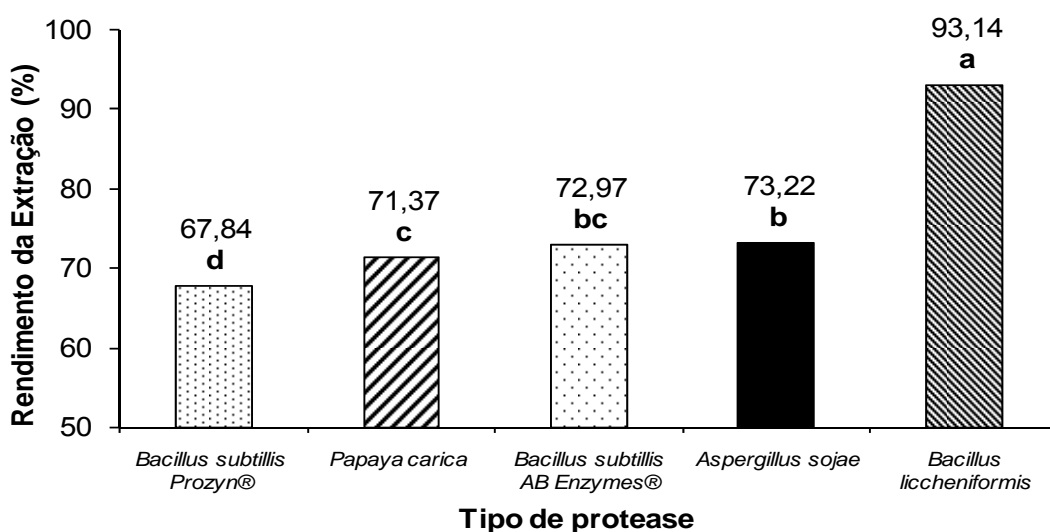
Considerando que os REPs obtidos com pH inicial 10,5 e 11,0 não diferiram entre si, optou-se por utilizar o pH 10,5, pois ao final deste ensaio o pH se encontra mais próximo à neutralidade, o que elimina uma etapa posterior de neutralização, diminui a probabilidade de formação de compostos tóxicos, como a lisinoalanina, a ocorrência da reação de Maillard e a co-precipitação de componentes não protéicos que poderiam diminuir o valor nutricional das proteínas e a qualidade do produto final (WANG et al., 1999).

### 5.2.5 Efeito da utilização de diferentes proteases

Os valores de REP obtidos utilizando-se diferentes enzimas sob as mesmas condições estão apresentados na Figura 8. Pode-se observar que o maior REP foi obtido ao utilizar a enzima proveniente de *Bacillus licheniformes* (93,14%), seguido por *Aspergillus sojae* e *Bacillus subtilis* (AB Enzymes<sup>®</sup>) (73,22 e 72,97%, respectivamente), que não diferiram significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade; depois o obtido pela enzima de *Papaya carica* (71,37%), que não diferiu significativamente do obtido pela enzima de *Bacillus subtilis* (fornecida pela AB Enzymes<sup>®</sup>), e por último, o obtido utilizando a protease proveniente de *Bacillus subtilis* da Prozyn<sup>®</sup> (67,84%).

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a influência do emprego de proteases na extração das proteínas do feijão. CAPOBIANGO et al. (2007), utilizando a mesma protease alcalina de *Bacillus licheniformis* que levou ao maior REP no presente trabalho, obtiveram um REP de 83,8% para as proteínas do fubá de milho. Ao comparar diferentes tipos de proteases, uma alcalina de *Bacillus licheniformis* e outra neutra de *Bacillus subtilis*, VIEIRA (2007) obteve, respectivamente, 50,7 e 28,6%

de extração para as proteínas da farinha de arroz.



**Figura 8 - Efeito da utilização de diferentes proteases sobre o rendimento de extração das proteínas do feijão.** Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

O melhor resultado encontrado, com a enzima proveniente de *Bacillus licheniformis*, pode ser justificado por esta, dentre as utilizadas, ser a enzima que possui, segundo o fornecedor, o valor de pH ótimo (9,5), mais próximo ao pH inicial utilizado (10,5) o que pode ter proporcionado uma maior atividade desta enzima quando comparada às demais, que possuem os valores de pH ótimo mais distante do utilizado (*Aspergillus sojae* – 9,0; *B. subtilis* (AB ENZIMES) – 7,0; *Papaya carica* – 3,0 a 9,0; *B. subtilis* (PROZYN) – 7,0 a 7,5).

A diferença verificada no REP, ao utilizar as duas enzimas provenientes de *Bacillus subtilis*, pode ser devida ao fato destas enzimas, apesar de possuírem a mesma origem microbiana, terem sido obtidas de diferentes fornecedores. Por serem provenientes de empresas distintas, os graus de pureza e de atividade enzimática podem não ser os mesmos, o que afeta diretamente a eficiência da reação de extração. Entretanto, a não determinação da atividade enzimática inicial de ambas as enzimas não permite a confirmação desta hipótese.

### 5.3 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Os resultados obtidos para a remoção de Phe dos diferentes hidrolisados protéicos do feijão estão expostos na Tabela 8, onde os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg Phe/100 g de hidrolisado), 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 no feijão foi de 1527,45 mg Phe/100 g de feijão (com 20,74% de proteína em base seca).

**Tabela 8 - Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão**

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg de Phe/100 g de HPF)
H1	77,87 <sup>bcd</sup>	795,3
H2	70,30 <sup>e</sup>	1067,3
H3	69,59 <sup>e</sup>	1092,8
H4	60,78 <sup>f</sup>	1409,4
H5	73,51 <sup>de</sup>	951,9
H6	81,48 <sup>b</sup>	665,5
H7	60,23 <sup>f</sup>	1429,2
H8	25,43 <sup>g</sup>	2679,8
H9	69,41 <sup>e</sup>	1099,3
H10	75,56 <sup>cd</sup>	878,3
H11	80,06 <sup>bc</sup>	716,6
H12	72,96 <sup>de</sup>	971,7
H13	82,65 <sup>b</sup>	623,5
H14	81,54 <sup>b</sup>	649,0
H15	87,93 <sup>a</sup>	433,7

HPF = Hidrolisado protéico de feijão. Phe = Fenilalanina. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Como pode ser observado, o uso do carvão ativado mostrou-se eficaz na remoção de Phe dos hidrolisados protéicos de feijão obtidos pela ação de proteases de diferentes origens, tendo o percentual de remoção variado de 25,4% a 87,9%, e o teor final de Phe de 433,7 a 2679,8 mg Phe/100 g de hidrolisado. Estes seriam os teores de Phe numa formulação dietética contendo apenas hidrolisados protéicos de feijão. Neste caso, nenhum dos hidrolisados poderia ser utilizado, pois os seus teores de Phe estariam acima do limite permitido pela legislação brasileira, que é de 0,1 g de Phe por 100 g de produto (BRASIL, 2002).

Contudo, o hidrolisado obtido com menor teor de Phe pode ser utilizado parcialmente no desenvolvimento de formulações dietéticas ou de um feijão modificado com baixo teor de Phe, ou como fonte protéica de suplementos e desta forma ser inserido na dietoterapia de fenilcetonúricos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde uma dieta com distribuição normal de calorias é composta por 55-75% de carboidratos, 15 -30% de lipídeos e 10-15% de proteína (WHO, 2003). Assim sendo, no desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos, pode-se utilizar até 22,5 g do hidrolisado protéico de feijão com menor teor final de fenilalanina (H15), resultando em uma formulação com um teor protéico final de 10% (normoprotéica), e 97,46 mg de Phe/100 g de produto, que está dentro do limite fixado pela legislação brasileira.

CAPOBIANGO et al. (2007) e VIEIRA (2007), após a extração das proteínas e remoção da fenilalanina, sugeriram a reconstituição do fubá de milho e da farinha de arroz, respectivamente, através da reincorporação do hidrolisado protéico com baixo teor de fenilalanina ao resíduo de extração (fração amídica).

Quando o interesse for o de reconstituir o feijão, utilizando o hidrolisado protéico com baixo teor de Phe, deve-se levar em consideração a composição química da matéria-prima, a fim de reproduzir o mais próximo possível suas características químicas e nutricionais. Levando-se em conta o teor máximo de Phe permitido pela legislação brasileira para pacientes fenilcetonúricos (0,1 g por 100 g de produto), sugere-se para reconstituição de 100 g de feijão, a utilização de 71 g de amido comercial isento de proteína que, desta forma, não fornecerá Phe, e a este, poderiam ser incorporados 22,5 g do HPF (H15), contribuindo deste modo com um valor protéico de 10 g/100 g e teor de Phe de 97,46 mg/100 g de produto. Visando aumentar o teor protéico deste feijão modificado ou, ainda, suprir a deficiência de alguns aminoácidos, por exemplo, os sulfurados (metionina), propõe-se a incorporação de aminoácidos isolados ou na forma de di-tripeptídeos isentos de Phe. Para complementar os outros

constituintes do feijão, poderia, ainda, ser feita a adição de lipídeos e minerais em quantidades próximas às reportadas por ANTUNNES et al. (1995), cujos valores são iguais a 1,51 e 4,18, respectivamente.

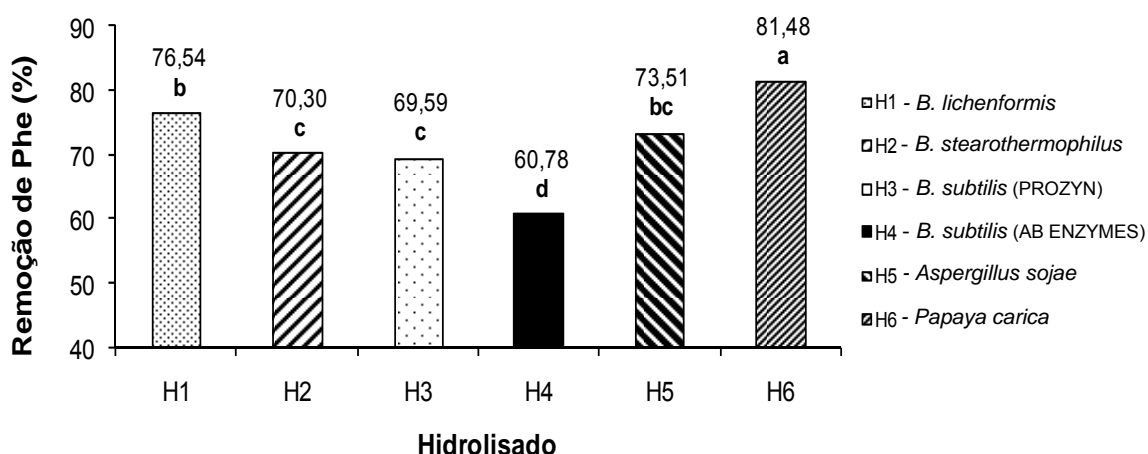
Deve-se ressaltar que, a fenilalanina, por ser um aminoácido essencial, precisa ser obtida por meio da alimentação, e por isso, determinada quantidade deve estar presente no produto final para fenilcetonúricos, de forma a garantir a síntese protéica e o crescimento normal. Além disso, as condições operacionais necessárias para atingir cerca de 100% de remoção de Phe aumentariam demasiadamente os custos do processo (SOARES et al., 2006).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que relatassem a remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos de feijão. O CA foi utilizado com eficiência para a remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (93,6 a 99%) (LOPES et al., 2005b; SOARES et al., 2006), de soro de leite em pó (75 a 99%) (DE MARCO et al., 2005; DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007), de arroz (85 a 100%) (BIZZOTTO et al., 2006a,b), de fubá de milho (68,63 a 97,55%) (CAPOBIANGO et al., 2007) e de farinha de arroz (25,7 a 94,1%) (VIEIRA, 2007). 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. (2007) e VIEIRA (2007), que utilizaram os mesmos tipos de carvão ativado utilizados neste trabalho. Apesar das variações nas condições utilizadas, os resultados aqui encontrados foram semelhantes aos citados acima. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) também removeram 92% de Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio, ambos 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) também removeram, através do CA, 89,5% de Phe de hidrolisados de caseína.

## 5.4 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

### 5.4.1 Efeito do tipo de protease

Para avaliação do tipo de enzima, foram comparados os hidrolisados H1, H2, H3, H4, H5 e H6. Na Figura 9 pode ser notado que o hidrolisado H6 obtido pela ação da protease de *Papaya carica* apresentou o maior percentual de remoção de Phe (81,48%) e, portanto, o menor teor de Phe final (665,5 mg Phe/100 g de HPF).



**Figura 9 - Efeito do tipo de protease sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão.** Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Este melhor desempenho da papaína poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que as condições de pH e temperatura empregadas no preparo dos hidrolisados protéicos (pH 8,4 e 50 °C), estarem dentro das faixas de pH (3 – 9) e temperatura (50 – 70 °C) ótimos da enzima, ao contrário do que aconteceu para as demais enzimas para as quais o pH e a temperatura utilizados não correspondem aos seus valores ótimos, conforme a Tabela 9.

Apesar de no preparo dos hidrolisados H3 e H4 terem sido utilizadas enzimas de mesma origem, ambas de *B. subtilis*, estes apresentaram diferença significativa na porcentagem de remoção de Phe. Este fato pode ser justificado por se tratarem de

enzimas fornecidas por diferentes fabricantes e, portanto, podem apresentar graus de pureza distintos.

**Tabela 9 - Comparação entre os valores de pH e temperatura ótimos e os utilizados para as diferentes enzimas**

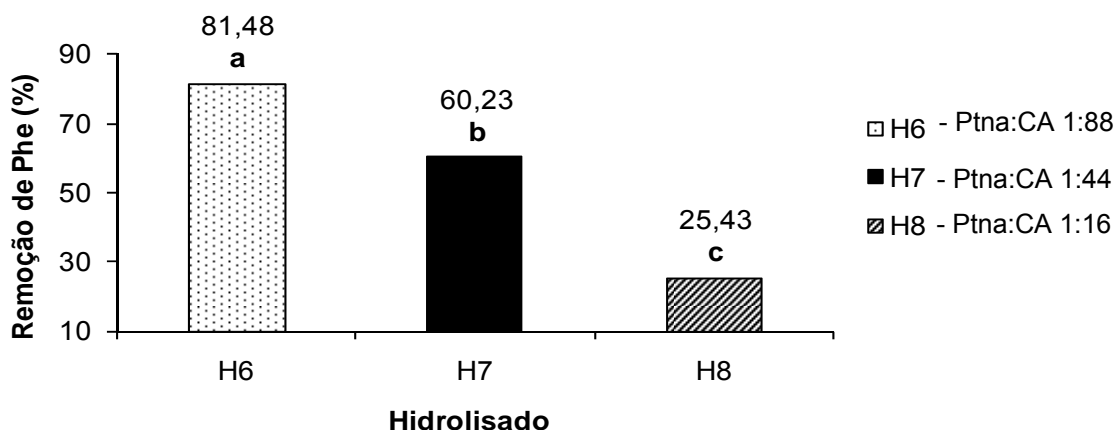
		pH		Temperatura (°C)	
		Utilizado	Ótimo*	Utilizada	Ótima*
H1	<i>B. liccheniformes</i>	8,4	9,5	50	60
H2	<i>B. stearothermophilus</i>	8,4	8,0	50	80
H3	<i>B. subtilis</i> (PROZYN)	8,4	7,0 a 7,5	50	55
H4	<i>B. subtilis</i> (AB ENZYMES)	8,4	7,0	50	55
H5	<i>Aspergillus sojae</i>	8,4	9,0	50	70
H6	<i>Papaya carica</i>	8,4	3,0 a 9,0	50	50 a 70

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

VIERA (2007), ao avaliar o efeito de diferentes proteases (quatro proteases de microorganismos, uma pancreatina e uma papaína) na remoção de Phe em hidrolisados protéicos de farinha de arroz pelo emprego de carvão ativado, também verificaram uma maior remoção ao empregarem a mesma enzima de *Papaya carica* utilizada neste trabalho.

#### 5.4.2 Efeito da relação proteína:carvão ativado

A avaliação do efeito da relação proteína:carvão ativado sobre a remoção de Phe foi realizada comparando os hidrolisados H6 (relação proteína:CA = 1:88), H7 (relação proteína:CA = 1:44), e H8 (relação proteína:CA = 1:16). Pode-se observar na Figura 10 que, quanto menor a relação proteína:carvão ativado utilizada (maior quantidade de carvão), maior foi o percentual de remoção de Phe, sendo o valor mais elevado de remoção obtido com a relação proteína:CA de 1:88 (81,48%), seguido por 1:44 (60,23%) e por último com 1:16 (25,43%)



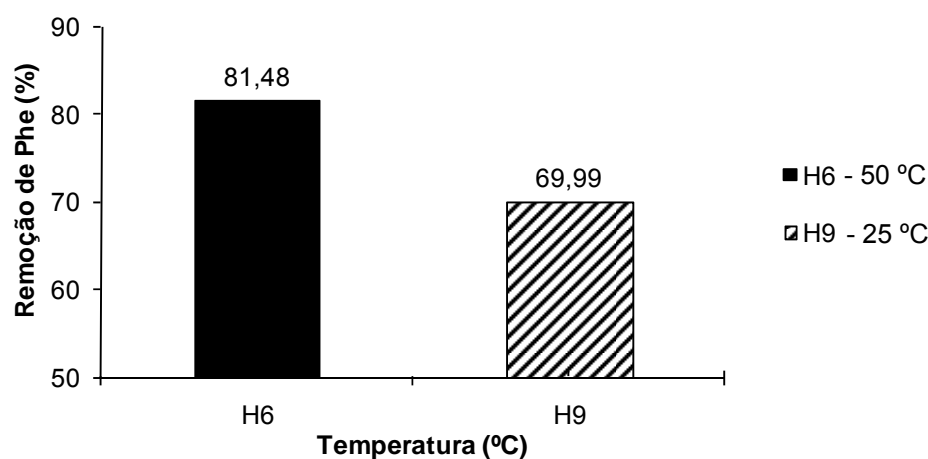
**Figura 10 - Efeito da relação proteína:carvão ativado sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão.** Ptna:CA = Proteína:Carvão Ativado. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

De todos os trabalhos encontrados na literatura, apenas três 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. (2007), que também observaram que o aumento da relação proteína:carvão ativado diminuiu a remoção da Phe (1:88,5 – 84,0%, 1:16 – 62,4% e 1:8 – 54,1%) de hidrolisados protéicos a partir do fubá de milho. VIEIRA (2007) também observou o mesmo efeito na remoção de Phe em hidrolisados de farinha de arroz, ao aumentar a relação proteína:carvão de 1:88 para 1:44 e 1:22, alcançando, respectivamente, as porcentagens de remoção de 94,1; 78,4 e 44,0%. No entanto, SOARES et al. (2006) observaram que, ao se utilizar as relações de 1:118, 1:90 e 1:60 em hidrolisados de leite em pó, não houve diferença significativa nos seus resultados, tendo sido obtida uma média de 97% para a remoção de Phe.

O carvão ativado é o meio adsorvente responsável pela remoção da fenilalanina. Portanto, uma provável explicação para a diminuição da porcentagem de remoção com o aumento da relação proteína:CA é o fato de que ao diminuir a quantidade de carvão ativado na coluna, o hidrolisado terá uma menor superfície de contato com o carvão, que ficará saturado mais rapidamente perdendo, portanto, sua capacidade adsorvente e, conseqüentemente, gerando hidrolisados com maior teor final de fenilalanina.

### 5.4.3 Efeito da temperatura de reação

Definidos os parâmetros, enzima a ser utilizada e relação proteína:CA, o efeito da temperatura sobre a remoção da fenilalanina foi avaliado comparando-se os hidrolisados H6 (50 °C) e H9 (25 °C). Nota-se, na Figura 11, que a remoção de fenilalanina no hidrolisado obtido a uma temperatura de reação de 50 °C foi superior e significativamente diferente àquela obtida a uma temperatura de 25 °C.



**Figura 11 - Efeito da temperatura de reação sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão.** As médias diferem entre si a 5% de probabilidade (ANOVA – fator único).

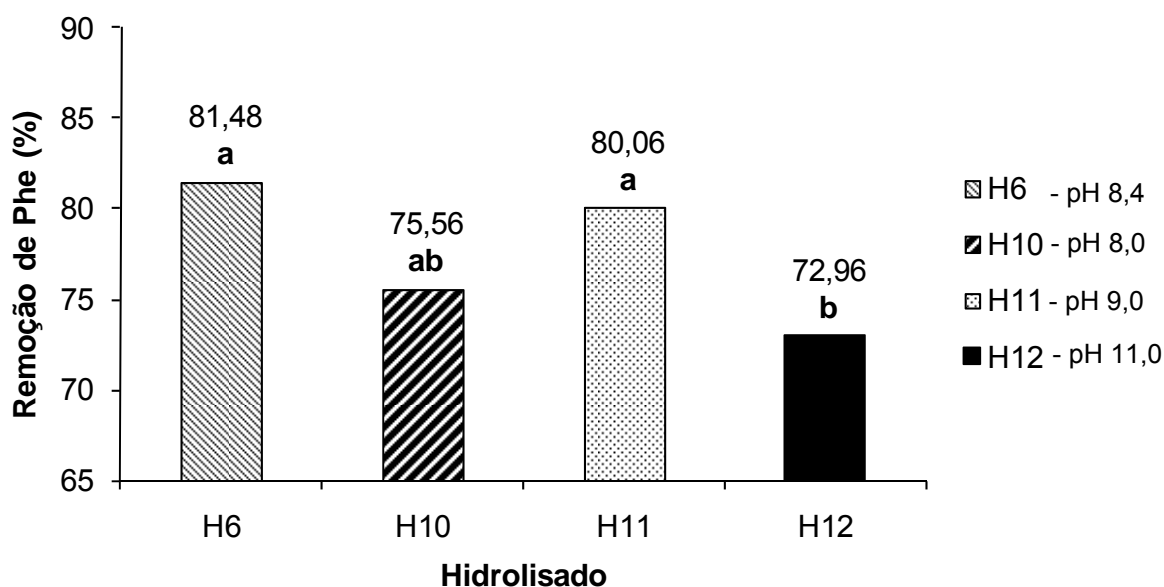
A maior eficiência da remoção de fenilalanina após a hidrólise a 50 °C pode estar relacionada a uma maior atuação da enzima de *Papaya carica* a esta temperatura. Este resultado poderia ser explicado, provavelmente, pela influência de dois fatores. Primeiro pelo fato da temperatura de 50 °C estar na faixa ótima de atuação da enzima utilizada que, segundo o fornecedor está entre 50 e 70 °C. Assim sendo, na obtenção do H9, a temperatura utilizada (25 °C), está muito abaixo da faixa ideal de atuação da enzima, enquanto no H6, a temperatura encontra-se na faixa ótima de atuação indicada pelo fornecedor. A utilização de uma temperatura fora da faixa ideal influenciou, provavelmente, na interação da enzima com seu substrato diminuindo sua atividade, o que levou, provavelmente, a uma menor exposição da Phe e,

conseqüentemente, a menor remoção deste aminoácido pelo carvão ativado.

Além disso, sabe-se que a temperatura exerce influência na estrutura tridimensional das proteínas, e que, a atividade de uma enzima está diretamente associada a sua conformação. Conseqüentemente, a temperatura terá efeito sobre a atividade enzimática (LEHNINGER, 2006). Portanto, a utilização de uma temperatura mais elevada (50 °C), pode ter provocado uma alteração da conformação da estrutura protéica favorecendo uma maior interação das proteínas com a enzima, o que favoreceria a exposição da Phe e, conseqüentemente, sua maior remoção pelo carvão ativado.

#### 5.4.4 Efeito do pH inicial

Para a avaliação do efeito do pH inicial da reação de hidrólise na remoção de Phe dos hidrolisados protéicos de feijão, foram comparados os hidrolisados: H6 (pH 8,4), H10 (pH 8,0), H11 (pH 9,0) e H12 (pH 11,0).



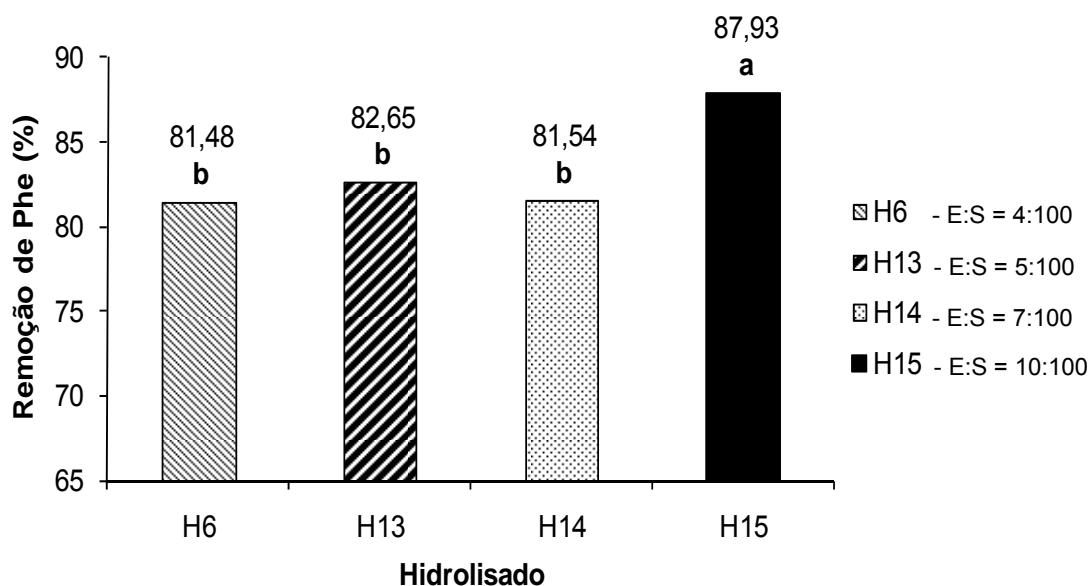
**Figura 12 - Efeito do pH inicial da reação de hidrólise sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão.** Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Na Figura 12 nota-se que a variação do pH inicial no preparo dos hidrolisados, de pH 8,4 (sem ajuste), para pH 8,0 e pH 9,0 (81,4, 75,6 e 80,06%, respectivamente), não levou a uma diferença significativa na remoção de Phe. Isso pode ser explicado pelo fato de os três valores de pH utilizados, 8,4, 8,0 e 9,0, estarem dentro da faixa de pH ótimo de atuação da enzima (pH 3,0 a 9,0). Este mesmo fato justifica a menor remoção obtida no hidrolisado preparado com pH inicial 11,0 (72,96%), pois este valor de pH encontra-se fora da faixa ótima de atuação da enzima. Considerando que não houve diferença significativa entre os hidrolisados H6, H10 e H11, definiu-se o pH 8,4 (H6), como melhor valor pois necessita da etapa de ajuste de pH, o que simplifica o processo de hidrólise.

#### **5.4.5 Efeito da relação enzima:substrato**

Com objetivo de avaliar o efeito da relação enzima:substrato sobre a remoção de fenilalanina, foram comparados entre si os hidrolisados: H6 (E:S = 4:100), H13 (E:S = 5:100), H14 (E:S = 7:100) e H15 (E:S = 10:100). Pode-se observar na Figura 13 que não houve diferença significativa na remoção de fenilalanina ao aumentar a relação E:S de 4:100 (81,48%), para 5:100 (82,65%) e para 7:100 (81,54%). Entretanto, ao utilizar a relação E:S de 10:100 observou-se uma maior remoção de fenilalanina (87,93%).

Resultados semelhantes aos citados acima foram obtidos em outros estudos. BIZZOTTO et al. (2006a), utilizando grãos de arroz, mostraram que aumentando a relação E:S de 1:100 para 2:100 a remoção de Phe passou de 90 para 99% utilizando uma pancreatina (Corolase<sup>®</sup> PP, AB Enzymes). O mesmo efeito foi observado por CAPOBIANGO et al. (2007), que estudaram esse parâmetro em hidrolisados protéicos obtidos a partir do fubá de milho. 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, utilizando também uma pancreatina (Corolase<sup>®</sup> PP, AB Enzymes). VIEIRA (2007), também observaram que quanto maior a relação E:S utilizada maior foi a remoção de fenilalanina de hidrolisados protéico de farinha de arroz, obtidos pela ação da papaína (Corolase<sup>®</sup> L10, AB Enzymes), que variou de 62,7 (relação E:S de 1:100), para 94,1% com uma relação E:S igual a 4:100.



**Figura 13 - Efeito da relação enzima:substrato sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de feijão.** E:S = Enzima:Substrato. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Em outros trabalhos realizados utilizando-se diferentes matérias-primas, diversas enzimas e condições hidrolíticas, os resultados obtidos 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 aumento da relação E:S foi prejudicial ou não afetou a remoção de Phe (DE MARCO et al., 2005; LOPES et al., 2005b; SOARES et al., 2006; DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Estes resultados demonstram que, apesar de se esperar, teoricamente, que uma maior relação E:S leve a um maior grau de hidrólise, uma maior exposição de Phe, e conseqüentemente, uma maior remoção deste aminoácido, 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.

## 6 CONCLUSÃO

O método enzimático foi eficiente na extração das proteínas do feijão, tendo atingido o maior rendimento (93,14%), ao se empregar a protease de *Bacillus lichenformis* com tempo de reação de 3 h, pH inicial igual a 10,5, relação enzima:substrato 10:100, sem tratamento físico, com temperatura de 50 °C e velocidade de centrifugação de 10.640 g.

O carvão ativado (CA) mostrou-se eficaz na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de feijão, obtidos sob diversas condições hidrolíticas, com porcentagens de remoção que variaram de 25,43 a 87,93%. O melhor resultado obtido foi aquele em que se utilizou a protease de *Papaya carica* na relação E:S de 10:100; relação proteína:CA de 1:88, pH inicial igual a 8,4 e temperatura de 50 °C; originando um hidrolisado protéico de feijão com teor final de 433,7 mg de Phe/100 g, que pode ser utilizado parcialmente na reconstituição do feijão, permitindo sua inserção na dieta de fenilcetonúricos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: IDF (Inter. Dairy Fed.) *Sem. Prot. Fat Glob Modif.*, p. 97-105, 1993.
- ADIBI, S.A. Glycyl-dipeptides – New substrates for protein nutrition. *J. Lab. Clin Med.*, v. 113, p. 665-673, 1989.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29-33, 1981.
- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *J. Cereal Sci.*, v. 41, p. 283-290, 2005.
- ANTUNES, P.L.; BILHALVA, A.B.; MOACIR, C.; SOARES, G.J.D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares Rico 23, Carioca, Pirata-1 e Rosinha-G2. *Rev. Brás. Agrociência*, v. 1, p. 12-18, 1995.
- 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, p. 33 26 dez. 2003.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Arlington: *AOAC International*, 1995.
- BARBOSA, C.M.S; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BEASLEY, M.G.; COSTELLO, P.M.; SMITH, I. Outcome of treatment in young adults with phenylketonuria detected by routine neonatal screening between 1964 and 1971. *Q. J. Med.*, v. 87, p. 155-160, 1994.

- BERNARDI, C.R. *Preparo de hidrolisados protéicos e análise de aminoácidos por duas metodologias*. Santa Catarina: Centro de Ciências Agrárias da UFSC, 2000. 131 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- BERRIOS, J.J.; SWANSON, B.G.; CHEONG, W.A.. Physico-chemical characterization of stored black beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Food Research International*, v. 32 n. 10, p. 669-676, 1999.
- BEYOND, R.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes*. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 340 p.
- BICKEL, H. The first treatment of phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.*, v. 155, p. 2-3, 1996.
- 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 processo de preparo de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. *Rev. Bras. Ciên. Farmac.*, v. 10, p. 9-30, 2006a.
- 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. *Rev. Ciên. Agrotec.*, v. 30, p. 308-316, 2006b.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. São Paulo: Varela, 1992. 222 p.
- BOZA, J.J.; MOENNOZ D.; VUICHOUD, J.; JARRET A.R.; GUAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O.; Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr.* v. 39 p. 237–243, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isenta de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 novembro 2002.
- BRASIL. Lei Federal 8.069 de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente. Brasília, 1990. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L8069.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8069.htm)>. Acesso em: 04 out. de 2006.

- BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS P.; VANDERLEYDEN J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant. and Soil.* v. 252, p. 55–128, 2003.
- CÂNDIDO, L.M.B. *Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (Oreochromus niloticus): composição, propriedades nutritivas e funcionais.* Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998. 207 p. (Tese de Doutorado).
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *International Journal of Food Engeneering*, v. 3, n. 6, art.10, 2007.
- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G., MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego de cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciên. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 3, p. 229-232, 2002.
- CARVALHO, T.M. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). *Rev. Méd. Minas Gerais*, v. 13, p. 109-135, 2003.
- CENTERWALL, S.A.; CENTERWALL, W.R. The discovery of phenylketonúria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics*, v. 105, p. 89-103, 2000.
- CHANG, K.C.; SATTERLEE, L.D. Isolation and characterization of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, v. 46, p. 1368-1373, 1981.
- CHATAUD, J.; DESREUMEUX, S.; CARTWRIGHT, T. Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. *Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1.* 14/12/1987, 20/07/1988.
- CHEFTEL, J-D.; CUQ, J-L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias-bioquímica-propiedades funcionales-valor nutricional-modificaciones químicas.* Acribia, 1989. 345 p.

- CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; SANCHEZ-VIOQUE, R.; PEDORCHE, J.; BAUTISTA, J.; MILLAN, F. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chem.*, v. 67, p. 269-274, 1999.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Tech.*, v. 11, p. 254-262, 2000.
- COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.*, v. 32, 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.
- COSTA, G.E.A.; QUEIROZ-MONICI, K.S.; REIS, S.M.P.M.; OLIVEIRA, A.C. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, v. 94 n. 3, p. 327-330, 2006.
- DE FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; DOS SANTOS, J.E.; DE OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates for enteral nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1432-1438, 1993.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V. SILVESTRE, M.P.C. Imobilização da papaína em carvão ativado e em alumina, visando sua utilização no preparo de formulações dietéticas. *Tecno-Lóg.*, v. 8, p. 83-89, 2004.
- 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.; 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.. *American Journal Of Food Technology*, 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 and products*, v. 10, p. 137-143, 1999.
- ERLANDSEN H., STEVENS, R.C. The structural basis of phenylketonuria. *Mol. Gent. Metab.* v. 68, p. 103-125, 1999.
- EUBER, J.R.; PUSKI, G.; HARTMAN, JR., G.H. Method for making soluble rice protein concentrate and the product produced there from. United States Patent n. 4,990,344,1991.
- 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.*, v. 599, n. 1-2, p. 163-170, 1992.
- FISCHER, M.; KOFOD, L.V.; SCHOLS, H.A.S.; PIERSMA, S.R.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 4463-4469, 2001.
- 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.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, p. 343-359, 1990.
- GIOVANNINI, M.; VERDUCI, E.; SALVATICI, E.; FIORI, L.; Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. *J. Inherit Metab. Dis.*, v. 30 p. 145-152, 2007.

- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hidrolisis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, p. 529-532, 1994.
- GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D.A.T. *Food composition data: production, management and use*. London: Chapman & Hal, 1992. 243p. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela/qual.asp>. Acesso em: 31/10/2007.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSK Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, 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 Pharmaceutica*, v. 41, p. 79-89, 2000.
- HANLEY, W.B.; Adult Phenylketonuria. *Am J. Med.* v. 117, p. 591-595, 2004.
- HENDRIKSZ, C.J.; WALTER, J.H. Update on phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 14, p. 400-406, 2004.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivate spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 494, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 671, p. 33-37, 1981.
- ISHINO, K.; D ORTEGA, M.L. Fractionation and characterization of major reserve protins from seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 23, p. 529-533, 1975.

- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, n. 4, p. 907-913, 1985.
- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low-phenylalanine peptide. *Enz.* v. 38, p. 321-327, 1987.
- LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, v. 48, p. 68-67, 1994.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger – Princípios de bioquímica. (4 ed) São Paulo: Sarvier, 2006. 1120 p.
- LIN, S-B.; NELLES, L.P.; CORDLE, C.T.; THOMAS, R.L. Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane (18) columns. *J. Food Sci.*, v 62, n. 4, p. 665-670, 1997.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P.R.; JULIEEN, A.R.; PEJOAN, C.H.; VERNEUIL, B. Procède pour preparer um hydrolysat enzymatique. Tessengerlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessengerlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *British 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. *Nutrition & Food Science*, v. 36, n. 2, p. 96-104, 2006.

- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 938-942, 1991.
- MaCDONALD, A.; FERGUSON, C.; RYLANCE, G.; MORRIS, A.A.M.; ASPLIN, D.; HALL, S.K.; BOOTH, I.W. Are tablets a practical source of protein substitute in phenylketonuria? *Arch. Dis. Child.*, v. 88, p. 327-329, 2003.
- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p. 1163-1169, 1992.
- MARQUEZ, U.M.L.; LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumin, globulin, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *American Chem. Soc.*, v. 29, p. 1068-1074, 1981.
- MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUZASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from Milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, v. 54, n. 5, p. 1225-1229, 1989.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Públ.*, v. 34, p. 86-96, 2000.
- MONCHI, M.; RERAT, A.A. Comparison of net protein-utilization of milk protein mild enzymatic hydrolysates and free amino-acid mixtures with a close pattern in the rat. *J. Parenteral Enteral Nutr.*, v. 17, p. 355-363, 1993.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.*, v. 19, p. 381-387, 2006.
- 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.; MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria*, v. 34, p. 59-69, 2005.
- MORALES-DE LÉON, J.C.; VÁZQUEZ-MATA, N.; TORRES, N.; GIL-ZENTENO, L.; BRESSANI, R.; Preparation and characterization of protein isolate from fresh and hardened beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Food Science*, v. 72, n. 2, 2007.
- 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, p. 843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDIZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *App. Biochem. Microbiol.*, v. 29, p. 302-306, 1993.
- NAKAMURA, T.; SYUKUNOBE, Y.; SAKURAI, T.; IDOTA, T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwiss.*, v. 48, p. 11-14, 1993.
- O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength.-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, p. 1548-1553, 1979.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. Valio Oy, Helsinki, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.
- PARRADO, J.; BAUTISTA, J.; MACHADO, A. Production of soluble enzymatic protein hydrolysate from industrially defatted nondehulled sunflower meal. *J. Agric. Food Chem.*, v. 39, p. 447-450, 1991.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, p. 15-23, 1995.
- PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol.*, v. 48, p. 96-99, 1994.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477 p.

- RAGONE, R.; COLONNA, G.; BALESTRIERI, C.; SERVILLO, L.; IRACE, G.;  
Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivative spectroscopy.  
*Biochem.*, v. 23, p. 1871-1875, 1984.
- RAMASWAMI, U.; SMITH, I. *Phenylketonuria. Curr. Paediatrics*, v. 7, p. 251-255, 1997.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 1975. 573 p.
- RÉRAT, A. A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products:  
consequences on metabolism *Prot. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region  
absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, p. 753-  
761, 1988.
- ROLAND, J.F.; MATTIS, D.L.; KIANG, S.; ALM, W.L. Hydrophobic chromatography:  
debittering protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, v. 43, n. 5, p. 1491-1493, 1978.
- SAHA, B.C.; HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.*, v. 19,  
p. 355-370, 2001.
- SANGRONIS, E.; RODRÍGUEZ, M.; CAVA, R.; TORRES, A. Protein quality of  
germinated (*Phaseolus vulgaris*). *Eur. Food Res. Technol.*, v. 222 p. 144-148,  
2006.
- 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.
- SARKISSIAN, C.N.; GÁMEZ, A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution  
therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol. Gen. Metab.*, v. 86, p. 22-26,  
2005.
- SATHE, S.K.; SALUNKE, D.K. Solubilization of California small white bean (*Phaseolus  
vulgaris* L.) proteins. *J. Food Sci.*, v. 46, p. 952-953, 1981.
- SGARBIERI, V.C. Estudos do conteúdo e de algumas características das proteínas em  
sementes de plantas da família Leguminosae. *Ciên. Cult.*, v. 32, p. 78-84, 1980.

- SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SHEHATA, A.A.; THANNOUM, M.M. Extractability of nitrogenous constituents from iraq mung bean as affected by pH, salt type, and others factors. *J. Agric. Food Chem.*, v. 29, p. 53-57, 1981.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SHIMELIS, E.A.; RAKSHIT, S.K. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 56, n. 6, p. 377-387, 2005.
- SHIMELIS, E.A.; RAKSHIT, S.K. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Swiss Society of Food Science and Technology*, v. 103, p. 161-172, 2007.
- SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Sci. Technol.*, v. 37, n. 6, 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. Remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite para o preparo de formulação dietética. *Alimen. Nutr.*, 2006 (Submetido para publicação).
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *American Journal of Food Technology*, v. 2, p. 327-341, 2007
- SILVESTRE, M.P.C.; DAUPHIN, D.; HAMON, M. Application of uv absorbance and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Analytica Chimica Acta*, Inglaterra, v. 282, p. 603-612, 1993.

- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 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.
- SMITH, I.; BEASLEY, M.G.; ADES, A.E. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.*, v. 65, p. 472-478, 1990.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac. Bonaer.*, v. 25, p. 325-332, 2006.
- SPRONSEN, F.J.V.; RIJIN, M.V.; BEKHOF, J.; KOCH, R.; SMIT, P.G.A. Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, p. 153-157, 2001.
- STANLEY, D.W. Non-bitter protein hydrolysates. *Can. Inst. Food Sci. Techn. J.*, Québec, v. 14, n. 1, p. 49-52, 1981.
- SUN, S.M.; HALL, T.C. Solubility Characteristics of globulins from phaseolus seeds in regard to their isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v. 23, p. 184-189, 1975.
- TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA – UNICAMP, versão II, 2 ed., Campinas: NEPA – UNICAMP, 2006. 113 p.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, S.; SHELLHAMMER, T.H. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran.1. physical processing and enzyme treatments. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 7444-7448, 2002.
- THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes a boon to human nutrition. *Trends in Food Science e Technology*, v. 14, p. 507-518, 2003.

- UMETSU, H.; MATSUOKA, H.; ICHISHIMA, E. Debittering mechanism of bitter peptides from Milk casein by wheat carboxypeptidase. *J. Agric. Food Chem.*, v. 31, n. 1, p. 50-53, 1983.
- USP (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BRASILFOODS (1998). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP. Versão 4.1. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: 17 de set. de 2007.
- VIANA, F.R.; BIZZOTTO, C.S.; DIAS, D.R.; OLIVAIRA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. Bovine blood constituents as fat replacers in ham pâté. *Food Technology Biochemistry*, UK, v. 42, n. 1, p. 5-10, 2004.
- VIANA, F.R.; DELVIVO, F.M.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.MEDEIROS ; SILVESTRE, M.P.C. . Quality of ham pâté incorporated of bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, v. 70, n. 1, p. 153-160, 2005.
- VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates. *Ars Pharmaceutica*, v. 47, p. 281-292, 2006.
- VIEIRA, C.R.; Extração, hidrólise e remoção de fenilalanina das proteínas de farinha de arroz. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 94 p. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos).
- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.
- WAITZBERG, D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 449-45.
- WANG, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, n. 2, p. 411-416, 1999.

- WANG, L.; WANG, Y.J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *J. Cereal Sci.*, v. 39, n. 2, p. 291-296, 2004.
- WEAVER, C.M.; SCHIMIDL, M.K.; WOTEKI, C.E.; BIDLACK, W.R. Research needs in diet, nutrition and health. *Food Technol.*, v. 47, p. 14-17, 1993.
- WHO (World Health Organization). Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. 2003. (WHO – Technical Report Series, 916).
- WONG, D.W.S. Food Enzymes Structure and Mechanism. Chapman & Hall. 1995. 389 p.
- YEOM, H. W.; KIM, K.S.; RHEE, J.S. Soy protein hydrolysate debittering by lysine-acetylation. *J. Food Sci.*, v. 59, n. 5, p. 1123-1126, 1994
- 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.*, v. 593, n. 1-2, p. 99-101, 1992.