

**CAROLINA SCHAPER BIZZOTTO**

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE  
ARROZ COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA:  
EMPREGO DA PANCREATINA E DA  
COROLASE PP**

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.

Orientador: Profa. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2005**



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

**CAROLINA SCHAPER BIZZOTTO**

**“OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ COM BAIXO  
TEOR DE FENILALANINA: EMPREGO DE PANCREATINA E DA  
COROLASE PP”**

**APROVADA EM 15 DE MARÇO DE 2005**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof. Dr. SÉRGIO DUARTE SEGALL**

**Prof. Dr. LEANDRO SOARES DE OLIVEIRA**

**Prof. Dr. ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA**

**Prof. Dra. MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE**  
**Orientadora**

Aos meus pais Otávio e Teca, meus irmãos Pedro, Paula e Elisa, meus avós Dulce, Fridolino e Elza, ao Arnaldo e a todos que me apoiaram.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos.

À Professora Doutora Marialice Pinto Coelho Silvestre, pela orientação deste trabalho, pela amizade, pela convivência, pelos incentivos e pelo exemplo de amor ao que faz.

Aos Professores Doutores Roberto Gonçalves Junqueira, Leandro Soares de Oliveira e Sérgio Duarte Segall pelas importantes contribuições na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Virgílio Coelho pela amizade, pelos ensinamentos e pela tranquilidade.

Aos professores e a coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pela contribuição na minha formação científica e na realização deste estudo.

Aos meus pais, Otávio e Teca, por sempre me incentivarem em tudo na vida e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Pedro, Paula e Elisa, os melhores amigos que alguém pode ter na vida.

Aos meus avós Frido, Dulce, Elza e Maurício, pelo amor e carinho.

Ao Arnaldo, que sempre me incentivou a crescer, pelo apoio, pela paciência e pelo amor. Obrigada pelos momentos felizes!

À tia Milu por me ensinar a importância do equilíbrio e como lidar com o estresse diário.

Aos amigos do Laboratório de Bromatologia Viviane Dias Medeiros Silva, Fernanda Meneghelo Delvivo e Wendel Oliveira Afonso pela ajuda na realização deste trabalho, pela convivência diária, pelas conversas, pelos conselhos e pelos momentos de descontração.

Às futuras doutoras Raquel Linhares Carreira e Daniella Cristine Fialho Lopes pelo incentivo à atividade científica e pela amizade.

Às futuras mestres Michely Capobianco e Eliza Augusta Rolim Biasutti pela amizade e ajuda na parte experimental.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica Milena Cristina Ribeiro Souza, Patrícia Capelari de Oliveira, Karen Valente Azevedo, Ana Luiza Santiago, Kely Prudente Sousa, Marina Amaral de Ávila Machado, Letícia Mendes Ricardo e Regiane, pelos momentos de descontração, pela amizade e pelo auxílio nas atividades do laboratório.

À Priscila Cordeiro Gomes, Raquel Campos Santos, Thiago Lucas de Abreu Lima e Anna Luiza Sampaio e demais colegas de mestrado pela convivência e apoio.

Ao funcionário do Laboratório de Bromatologia Marcos da Costa Lage pela convivência agradável e pela contribuição para o bom andamento das práticas desenvolvidas no laboratório.

Às funcionárias da secretaria de Pós-graduação em Ciência de Alimentos Úrsula Regiane Martins e Marilene pela boa vontade.

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

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
<b>1 HIPERFENILALANINEMIAS</b> .....	14
1.1 FENILCETONÚRIA .....	16
1.2 DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO .....	17
1.3 TRATAMENTO .....	18
1.4 SUBSTITUTOS PROTÉICOS .....	19
<b>2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA</b> .....	20
2.1 IMPORTÂNCIA .....	20
2.2 FATORES INTERFERENTES .....	22
2.3 PANCREATINA .....	23
2.4 COROLASE PP .....	24
<b>3 ARROZ: DADOS RELEVANTES</b> .....	25
3.1 CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E SÓCIO-ECONÔMICAS DO ARROZ .....	25
3.2 ESTRUTURA DO GRÃO .....	26
3.3 CLASSIFICAÇÃO .....	26
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	27
3.5 AS PROTEÍNAS DO ARROZ .....	28
<b>4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ARROZ</b> .....	31
<b>5 MÉTODOS DE REMOÇÃO DE FENILALANINA</b> .....	32
<b>6 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE FENILALANINA</b> .....	34
<b>7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS</b> .....	35
<b>TRABALHO EXPERIMENTAL</b> .....	37
<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	37
<b>2 CAPÍTULOS</b> .....	39
<b>2.1 Capítulo I: Uso da pancreatina e do carvão ativado no preparo de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina</b> .....	39
<b>2.2 Capítulo II: Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado</b> .....	63
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	88
<b>APÊNDICE</b> .....	97

## LISTA DE TABELAS

1	Prescrição dietética de Phe, de acordo com os níveis séricos obtidos pela triagem neonatal .....	18
2	Produção, importação e exportação de arroz em casca .....	26
3	Composição aproximada do arroz e suas frações, a 14% de umidade .....	27
4	Conteúdo de vitaminas e minerais do arroz e suas frações, a 14% de umidade .....	28
5	Conteúdo de aminoácidos em alguns alimentos .....	29
6	Aminograma (g/16 g) das subunidades da prolamina e glutelina do arroz .....	30
7	Valor nutricional de proteínas de cereais em ratos .....	30
I.1	Parâmetros empregados na extração das proteínas do arroz .....	45
I.2	Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de arroz pela ação da pancreatina .....	46
I.3	Composição química do arroz polido, cru, em g/100 g .....	50
I.4	Teores de proteína e Rendimentos de Extração, para as diferentes condições de extração .....	50
I.5	Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de arroz, obtidos pela ação da pancreatina .....	55
I.6	Teores de peptídeos e de aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos de arroz .....	57
II.1	Parâmetros empregados na extração das proteínas do arroz .....	68
II.2	Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de arroz pela ação da corolase PP .....	70
II.3	Composição química do arroz polido, cru, em g/100 g .....	73
II.4	Teores de proteína e Rendimentos de Extração, para as diferentes condições de extração .....	74
II.5	Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de arroz, obtidos pela ação da corolase PP .....	78
II.6	Teores de peptídeos e de aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos de arroz .....	80

## LISTA DE FIGURAS

1	Vias metabólicas da Phe dependentes da fenilalanina hidroxilase e BH <sub>4</sub> .....	15
2	Principais etapas do trabalho experimental .....	38
I.1	Espectros de derivada segunda. (A) da Phe em pH 6, na presença de Tyr e Trp; (B) do hidrolisado H5 em pH 6 .....	53
II.1	Espectros de derivada segunda. (A) da Phe em pH 6, na presença de Tyr e Trp; (B) do hidrolisado H3 em pH 6 .....	76



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACF:** area corrigida da fração

**BH<sub>4</sub>:** tetraidrobiopterina

**E:S:** relação enzima:substrato

**EDS:** espectrofotometria derivada segunda

**EPA:** extrato protéico de arroz

**FAO:** Food and Agriculture Organization

**FCC:** Food Chemicals Codex

**HPA:** hiperfenilalaninemia

**HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência

**JECFA:** Joint Expert Committee for Food Additives

**NPU:** Utilização protéica líquida

**Phe:** fenilalanina

**PHEA:** poli-(2-hidroxietilaspártamida)-sílica

**PKU:** fenilcetonúria

**SE-HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular

**Trp:** triptofano

**Tyr:** tirosina

**WHO:** World Health Organization

## RESUMO

Visando o desenvolvimento de suplementos alimentares com baixo teor de fenilalanina para o tratamento da fenilcetonúria, o arroz foi utilizado neste trabalho como matéria prima. Inicialmente, as proteínas do arroz foram extraídas em meio alcalino, variando-se o pH e o tempo de extração. O maior rendimento de extração (84,7%) foi encontrado quando se utilizou pH 12 e agitação por 1 h. Doze hidrolisados enzimáticos foram, em seguida, preparados a partir do extrato protéico obtido, empregando-se a pancreatina e a corolase PP, variando-se a concentração protéica inicial e a relação enzima:substrato. Após passagem dos hidrolisados por coluna de carvão ativado para remover a Phe, este aminoácido foi dosado por espectrofotometria derivada segunda. O uso de ambas as enzimas e do carvão ativado mostrou-se eficiente, obtendo-se porcentagens de remoção de até 100%. Na caracterização do perfil peptídico de acordo com o tamanho da cadeia, os hidrolisados protéicos de arroz apresentaram elevados teores de oligopeptídeos com valores máximos de 63% e 66% para hidrolisados de pancreatina e de corolase PP, respectivamente.

**Palavras-chave:** arroz, pancreatina, corolase PP, carvão ativado, remoção de fenilalanina, suplemento dietético.

## ABSTRACT

**PRODUCTION OF RICE PROTEIN HYDROLYSATES WITH LOW PHENYLALANINE CONTENTS: USE OF PANCREATIN AND COROLASE PP.** With the aim of producing dietetic supplements for the treatment of phenylketonuria, rice was used as the raw matter. Initially, the proteins were extracted by an alkaline process, varying the pH and the time of extraction. The highest extraction yield (84,7%) was obtained when using pH 12 and stirring for 1 h. Twelve hydrolysates were then prepared from the protein extract, using pancreatin and corolase PP, varying the initial protein concentration and the enzyme:substrate ratio. After passing the hydrolysates through a column containing activated carbon for removing phenylalanine, second derivative spectrophotometry was used to determine the amount of this amino acid. The use of both enzymes and of activated carbon was efficient, giving rise to removal levels up to 100%. In the characterization of peptide profiles, according to their size, the rice protein hydrolysates presented high oligopeptides contents, corresponding to a maximum of 63% and 66% for pancreatin and corolase PP hydrolysates, respectively.

**Keywords:** rice, pancreatin, corolase PP, activated carbon, phenylalanine removal, dietary supplement.

## INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é um dos distúrbios metabólicos congênitos mais comuns, caracterizando-se pela deficiência ou ausência da enzima fenilalanina hidroxilase. Esta enzima é sintetizada no fígado e catalisa a conversão de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). Uma diminuição em sua atividade, portanto, pode levar ao acúmulo de Phe no sangue e nos demais líquidos corporais, com formação de fenilpiruvato, elevando a concentração desta substância na urina. Por este motivo, a doença recebeu o nome de fenilcetonúria (STRYER, 1988; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS et al., 1993; OUTINEN et al., 1996, SHIMAMURA et al., 1999).

Os fenilcetonúricos parecem normais ao nascer, mas se não forem tratados, desenvolvem grave retardamento mental (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; SHIMAMURA et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000). O peso do cérebro dos indivíduos não tratados é abaixo do normal, a mielinização de seus nervos é defeituosa e seus reflexos são hiperativos (STRYER, 1988).

A fenilcetonúria acomete um a cada 15.000 recém-nascidos testados, no Brasil, sendo que em Minas Gerais a prevalência é de 1:20.000 (AGUIAR, 2002). O diagnóstico é realizado por meio de programas de triagem neonatal, em que a concentração de Phe sanguínea é dosada (BRASIL, 2002).

O tratamento da PKU é dietético e deve ser iniciado, preferencialmente, nos primeiros 21 dias de vida. A dieta, restrita em proteínas, tem como meta o fornecimento suficiente de Phe para garantir o crescimento e desenvolvimento normais, devendo ser complementada por substitutos protéicos, isentos ou pobres em Phe e suplementada com tirosina e outros aminoácidos, além de vitaminas e minerais (STRYER, 1988; KANUFRE et al., 2001). Os produtos comerciais para fenilcetonúricos, constituídos de misturas de aminoácidos livres, apresentam alta osmolaridade, podendo causar diarreia osmótica. Suplementos à base de hidrolisados enzimáticos de proteínas contendo oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, têm sido recomendados por serem melhor absorvidos pelo organismo que misturas de aminoácidos livres (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE & SILK, 1989; BOZA et al., 1995; OUTINEN et al., 1996). Além disso, os hidrolisados protéicos apresentam um custo de produção menor que as misturas de aminoácidos livres (COGAN et al., 1981; AUBES-DUFAU et al., 1995).

A remoção de Phe dos hidrolisados baseia-se no fato de que a hidrólise libera este aminoácido, possibilitando sua remoção por tratamentos diferenciados (SHIMAMURA et al., 1989). A adsorção em carvão ativado é um dos métodos utilizados para este fim (KITAGAWA et al., 1987; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993).

Para a avaliação da eficiência da remoção, o teor de Phe deve ser dosado na matéria-prima e nos hidrolisados. Esta determinação pode ser feita por técnicas variadas, entre as quais se destacam métodos cromatográficos (BADOUD & PRATZ, 1984; BIDLINGMEYER et al., 1984; FANG et al., 1992; CARREIRA et al., 2002) e espectrofotométricos, com destaque para a espectrofotometria derivada segunda (EDS) (BRANDTS & KAPLAN, 1973; O'HAYER, 1979; SILVESTRE et al., 1993; ROJAS et al., 1998). A EDS é considerada uma técnica simples, rápida e de custo relativamente baixo, sendo um método quantitativo e qualitativo vantajoso, de grande utilidade (RAGONE et al., 1984).

Levando-se em conta a posição relevante que ocupa o arroz na dieta do brasileiro, que consome em média 36 kg deste cereal por ano (FAO, 2002), seria de grande interesse utilizá-lo como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de fenilcetonúricos. Embora o arroz apresente o menor teor de proteína entre os cereais, esta possui alto valor nutricional, devido à elevada digestibilidade e concentração de lisina superior à de outros grãos (JULIANO, 1993).

Segundo JULIANO (1993), 77 a 80% das proteínas do arroz compõem a fração glutelina, solúvel em álcali, mas insolúvel em água. Desta forma, na maior parte dos trabalhos encontrados na literatura, foi utilizada a extração alcalina na obtenção de concentrados protéicos a partir de arroz ou de seus subprodutos (SAUNDERS et al., 1975; CONNOR et al., 1976; LINDSAY et al., 1977; EUBER et al., 1991).

É importante conhecer a composição de aminoácidos e peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, dos hidrolisados protéicos com finalidades nutricionais. Para tanto, os hidrolisados devem ser fracionados e as frações obtidas quantificadas. A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) foi utilizada com êxito na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados protéicos, em trabalhos desenvolvidos no mesmo laboratório onde realizou-se o presente trabalho (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2002; SOARES et al., 2004; LOPES et al., 2004; DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; MORAIS et al., 2005; DELVIVO et al., 2005a,b).

Os objetivos deste trabalho foram otimizar a extração da proteína do arroz, avaliar a utilização do carvão ativado na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz,

obtidos pela ação da pancreatina e da corolase PP, e caracterizar o perfil peptídico destes hidrolisados, visando o desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos.

## REVISÃO DA LITERATURA

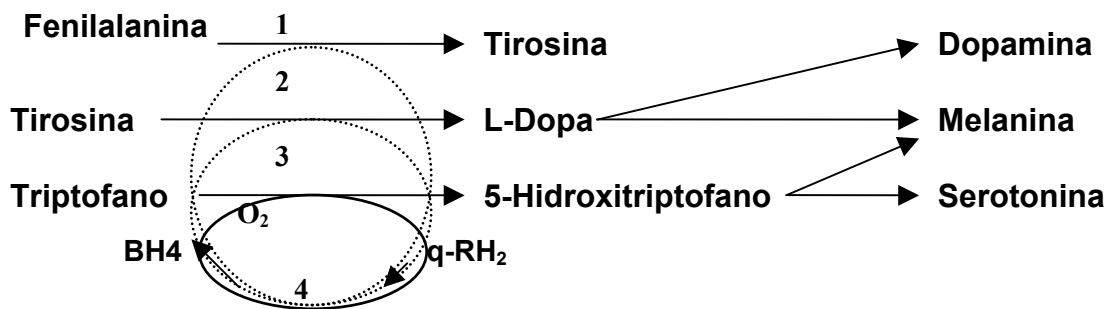
### 1 HIPERFENILALANINEMIAS

As hiperfenilalaninemias (HPA), ou elevação dos níveis de fenilalanina (Phe) no sangue, são as mais comuns desordens do metabolismo de aminoácidos (TRAHMS, 1998; MARCO & WAITZBERG, 2000). As HPAs têm caráter autossômico recessivo e podem resultar de defeitos nos genes que codificam uma de duas enzimas: fenilalanina hidroxilase ou diidrobiopterina redutase. Assim, a conversão da Phe em tirosina (Tyr) se torna ineficiente, levando a um acúmulo de Phe no organismo (SCRIVER et al., 1997; MIRA & MARQUEZ, 2000; MARCO & WAITZBERG, 2000; STRYER, 1988).

A conversão da Phe em Tyr ocorre por meio de um sistema de hidroxilação complexo, envolvendo várias enzimas e coenzimas. O papel da fenilalanina hidroxilase é inserir um átomo de oxigênio na Phe para formar o grupo hidroxila da Tyr. A fenilalanina hidroxilase requer um co-fator, a tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), que transporta elétrons do NADH para o O<sub>2</sub> na hidroxilação da Phe. Durante a reação de hidroxilação, a coenzima é oxidada a diidrobiopterina e, subseqüentemente, é reduzida novamente pela ação da enzima diidrobiopterina redutase. A tetraidrobiopterina é um cofator essencial para a hidroxilação da Phe, da Tyr e do triptofano (Trp) (MARCO & WAITZBERG, 2000; STRYER, 1988). A deficiência de BH<sub>4</sub> produz distúrbios no metabolismo destes aminoácidos, diminuindo a formação de catecolaminas, melanina e serotonina (Figura 1) (STRYER, 1988; MIRA & MARQUEZ, 2000).

O aumento da concentração de Phe no sangue ativa a via de transaminação da Phe, levando à formação de fenilpiruvato e outros metabólitos, que são rapidamente excretados na urina. Além disso, ocorre uma elevação na concentração de Phe no líquor, provavelmente por um mecanismo de competição do aminoácido com a glicose para ultrapassar a barreira hematoencefálica, favorecendo lesão neuronal (BURTS & ASHWOOD, 1996). A incapacidade de metabolizar a Phe leva a uma diminuição nos

níveis plasmáticos de tirosina e, conseqüentemente, à redução dos neurotransmissores formados a partir deste aminoácido, como dopamina, epinefrina e norepinefrina, além de favorecer a deficiência em tiroxina. A produção de melanina também é afetada, podendo ocorrer clareamento da pigmentação da pele, cabelo e olhos (BURTS & ASHWOOD, 1996; MIRA & MARQUEZ, 2000).



**Figura 1: Vias metabólicas da Phe dependentes da fenilalanina-hidroxilase e BH<sub>4</sub>.**

Tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) é um coenzima da hidroxilação de aminoácidos aromáticos, via fenilalanina-4-hidroxilase (1), tirosina-3-hidroxilase (2) e triptofano-5-hidroxilase (3). A dihydrobiopterina quinoide (q-BH<sub>2</sub>) formada é regenerada para BH<sub>4</sub> por NADH-BH<sub>2</sub> redutase dependente (4). Na PKU clássica, a enzima 1 é deficiente. O acúmulo de Phe inibe as enzimas 2 e 3. Essa inibição e a deficiência de dopamina e serotonina resultantes podem ser evitadas pela dieta pobre em Phe. Na deficiência congênita da BH<sub>4</sub>, a enzima 4 ou uma das enzimas da biossíntese da biopterina é defeituosa. Então, nenhuma das enzimas 1-3 é ativada e a dieta pobre em Phe é terapêuticamente inefetiva. Fonte: adaptado de MIRA & MARQUEZ (2000).

As HPAs têm apresentação polimórfica e se classificam em fenilcetonúria (PKU) clássica, PKU leve, HPA permanente, HPA transitória, HPA materna e deficiências de BH<sub>4</sub> (SCRIVER et al., 1997; MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

A PKU clássica é a mais comum das HPAs. Caracteriza-se por níveis sanguíneos de Phe acima de 200 µg/mL, e atividade da fenilalanina hidroxilase abaixo de 1%. Em pacientes não tratados, encontram-se altas concentrações de fenilcetonas na urina. Estes pacientes podem desenvolver um grave, progressivo e irreversível atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (MARCO & WAITZBERG, 2000; TRAHMS, 1998).

A PKU leve, branda ou atípica se assemelha à PKU clássica, porém os níveis de Phe no sangue são mais baixos (entre 100 e 200 µg/mL) (TRAHMS, 1998). A atividade da fenilalanina hidroxilase se situa entre 1 e 3% (MARTINS et al., 1993).

A HPA permanente ou benigna é encontrada em indivíduos com atividade da fenilalanina hidroxilase diminuída, mas superior a 3%. Não há alterações clínicas

aparentes e, geralmente, não exige tratamento dietético. A concentração de Phe no sangue é menor que 100 µg/mL (TRAHMS, 1998).

A HPA transitória ou neonatal pode ocorrer eventualmente em consequência de prematuridade, de fornecimento de formulações com elevada concentração protéica ao recém-nascido, de diluições inadequadas das formulações lácteas ou da fervura intensa do leite (STARLING et al., 1999). Não exige tratamento, uma vez que é aparentemente benigna (TRAHMS, 1998).

A HPA materna acomete fetos de mães com concentração sanguínea de Phe acima de 65 µg/mL. Devido ao gradiente positivo transplacentar, ocorre um aumento de cerca de duas vezes no nível de Phe no feto, causando dano cerebral antes do nascimento. O quadro clínico é irreversível e se caracteriza por retardo mental, microcefalia e risco de doenças cardíacas congênitas (MIRA & MARQUEZ, 2000).

A deficiência da enzima diidrobiopterina redutase leva a uma diminuição no cofator BH<sub>4</sub>, essencial na hidroxilação da Phe, levando a um acúmulo deste aminoácido. Uma vez que este cofator também é requerido pelas enzimas tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, necessárias na síntese de neurotransmissores, este tipo de HPA não responde ao tratamento estritamente dietético. O prognóstico é pior que o de outras formas de HPA, e o tratamento inclui a utilização de BH<sub>4</sub>, L-DOPA e 5-OH-triptofano (BURTS & ASHWOOD, 1996; SCRIVER et al., 1997).

## 1.1 FENILCETONÚRIA

Dentre os erros congênitos do metabolismo de aminoácidos, a fenilcetonúria clássica é a doença clinicamente mais encontrada (MIRA & MARQUEZ, 2000). A incidência no Brasil é de 1:15.000 recém-nascidos testados, sendo que em Minas Gerais ocorre a cada 20.000 nascimentos (AGUIAR, 2002). Em São Paulo, este índice é de 1:12.000 a 1:15.000 (SCHIMIDT, 1987).

Neste tipo de HPA, a atividade da enzima fenilalanina-hidroxilase está ausente ou deficiente. Esta enzima parece ser constituída por duas cadeias de polipeptídeos, cada uma com massa molecular de 54.000 kDa. Entretanto, formas multiméricas da enzima já foram identificadas, com massas moleculares entre 200.000 e 250.000 kDa, sugerindo a existência de uma forma tetramérica. Embora sua estrutura tridimensional ainda não tenha sido completamente determinada, é provável que a enzima humana seja multihomopolimérica. O gene que codifica a fenilalanina-hidroxilase está localizado no



braço longo do cromossomo 12, sendo composto por 13 exons. Até o momento mais de 328 mutações, incluindo polimorfismos, foram descritas no gene da enzima hepática fenilalanina-hidroxilase. Algumas mutações causam ausência total da função da enzima. Outras estão associadas a uma atividade residual *in vitro* que varia de 2 a 70%. Este espectro contínuo da relação mutação/atividade enzimática, associado às inúmeras possibilidades de combinações (genótipos), pode explicar a variabilidade fenotípica observada (SCRIVER et al., 1997).

O quadro clínico de pacientes fenilcetonúricos não-tratados caracteriza-se por um atraso global no desenvolvimento neuro-psicomotor, deficiência mental, comportamento agitado ou padrão autista, convulsão e odor característico na urina (MARTINS et al., 1993; BURGARD, 2000). A baixa disponibilidade da tirosina, devido à deficiência da conversão da Phe neste aminoácido, pode levar a uma baixa produção de melanina, causando menor pigmentação da pele e cabelos (MIRA & MARQUEZ, 2000).

## 1.2 DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO

O diagnóstico precoce da PKU é essencial para o tratamento. Inicialmente, a urina de recém-nascidos era testada com a adição de cloreto férrico, que origina uma cor verde-oliva na presença de fenilpiruvato. O nível de Phe no sangue é, atualmente, o critério diagnóstico adotado, por ser mais confiável. Com a clonagem do gene para a fenilalanina-hidroxilase já é possível o diagnóstico pré-natal da PKU (STRYER, 1988). Este procedimento é, particularmente, desejável quando a mãe já teve um filho com um grave defeito hereditário (BURTS & ASHWOOD, 1996).

A PKU é diagnosticada pelos testes de triagem neonatal, realizados no quinto dia de vida. Quando o diagnóstico é confirmado, o tratamento dietético deve ser iniciado imediatamente e durar por toda a vida para evitar manifestações clínicas da doença (ACOSTA & YANICELLI, 1997; STARLING et al., 1999; AGUIAR, 2002).

Nos primeiros seis meses de vida do recém nascido, as oscilações metabólicas são maiores, exigindo um monitoramento mais freqüente do tratamento. É necessário se estabelecer o diagnóstico diferencial entre a PKU clássica e as suas demais formas de apresentação. Assim, no sexto mês, é realizado o teste de sobrecarga para a confirmação diagnóstica (O'FLYNN et al., 1980).

As crianças acompanhadas regularmente apresentam um desenvolvimento normal, desde que sigam uma dieta rigorosa, utilizando alimentos restritos em proteínas e formulações especiais isentas ou com baixos teores de Phe (ACOSTA et al., 1998).

### 1.3 TRATAMENTO

O tratamento da fenilcetonúria é essencialmente dietético e consiste na utilização de uma dieta com restrição de alimentos protéicos e no controle específico da ingestão de Phe. Desta forma, é indispensável o uso de uma mistura de aminoácidos isenta ou com baixos teores de Phe para atingir a recomendação protéica e garantir o crescimento e desenvolvimento normais. A adequação calórica para lactentes é mantida com o uso de óleo vegetal, amido de milho e açúcar (ACOSTA et al., 1998).

Alguns estudos relacionados à ingestão oral de crianças com PKU revelaram que estas apresentavam ingestão adequada de proteínas. Entretanto, as calorias, cálcio, ferro, zinco e cobre estavam abaixo da recomendação, enfatizando-se a importância da vigilância nutricional em fenilcetonúricos (ACOSTA et al., 1998; MARCO & WAITZBERG, 2000).

A dieta deve ser iniciada o mais precocemente possível, preferencialmente até os 21 dias de vida, visando manter os níveis séricos próximos aos valores de referência (Tabela 1), de acordo com a idade, promovendo assim, o crescimento e o desenvolvimento neuropsicomotor e mental adequados. Atualmente, preconiza-se que o tratamento deva ser realizado por toda a vida (ACOSTA & YANNICELLI, 1997).

**Tabela 1 – Prescrição dietética de Phe, de acordo com os níveis séricos obtidos pela triagem neonatal**

Phe sérica ( $\mu\text{mol/L}$ )	( mg/dL)	Phe na dieta ( mg/kg/dia)
< 605	<10	70
605 – 1210	10 - 20	55
1211 - 1815	21 - 30	45
1816 – 2420	31 - 40	35
>2420	>40	25

Phe = fenilalanina

Adaptado de ACOSTA & YANNICELLI (1997)

Os fenilcetonúricos podem ser amamentados, desde que exista controle freqüente da Phe sanguínea (SOARES et al., 2002). O leite materno deve ser associado a formulações para fenilcetonúricos, apesar do seu teor de Phe ser inferior ao contido no leite de vaca ou nas fórmulas lácteas (MARTINS et al., 1993; KANUFRE et al., 2001).

Algumas alternativas ao tratamento dietético têm sido propostas. A terapia enzimática com fenilalanina amônia liase baseia-se na administração enteral ou parenteral desta enzima, que converte a fenilalanina em ácido trans-cinâmico, metabólito menos tóxico que o fenilpiruvato e facilmente excretado pelo organismo (LEVY, 1999; SARKISSIAN et al., 1999; KIM et al., 2004). Alguns pacientes com PKU clássica respondem bem ao tratamento com  $BH_4$ . No entanto, nem todas as formas fenotípicas da doença podem ser tratadas com esta substância (BLAU & ERLANDSEN, 2004; KIM et al., 2004). A terapia gênica tem sido estudada para restaurar a expressão da fenilalanina hidroxilase permanentemente no fígado dos pacientes. Porém, todas as tentativas realizadas até então para tratar a PKU com terapia gênica fracassaram (KIM et al., 2004). Embora sejam promissores, dificilmente estes novos tratamentos substituirão completamente o tratamento dietético.

#### **1.4 SUBSTITUTOS PROTÉICOS**

Em pacientes com PKU clássica é necessário o uso de substitutos protéicos sintéticos para o controle dos níveis séricos de Phe. A legislação brasileira vigente preconiza que, nas preparações direcionadas para este grupo de pessoas, a concentração de Phe deve ser inferior a 0,1 g/ 100 g de produto (BRASIL, 2002).

Os substitutos protéicos podem ser divididos em dois grupos: misturas de L-aminoácidos e hidrolisados protéicos (SANTOS et al., 2003), sendo que apenas os primeiros se encontram disponíveis no Brasil, por meio de importação.

Existem diversas formulações constituídas de aminoácidos livres no mercado, que podem conter também carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas (MIRA & MARQUEZ, 2000). Estes produtos apresentam as vantagens de serem de prescrição simples, por terem composição bem definida, facilitando o monitoramento da ingestão de Phe (MILUPA, 1995). Entretanto, seu uso resulta em uma dieta dispendiosa, monótona, hiperosmótica e com odor e paladar desagradáveis. A ingestão dessas misturas deve ocorrer ao longo do dia, em pequenas porções, para evitar reações adversas como

náuseas, vômitos, diarreia, tonturas e mudanças na excreção de nitrogênio e no catabolismo (MIRA & MARQUEZ, 2000).

ACOSTA & YANNICELLI (1997) recomendam uma ingestão equivalente a 25 a 50% maior de proteínas para fenilcetonúricos em uso de fórmulas especiais constituídas de misturas de aminoácidos, considerando as alterações na absorção de aminoácidos isolados.

Os hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe têm sido estudados desde a década de 1970 para serem utilizados na dieta de fenilcetonúricos. As formulações especiais para fenilcetonúricos são elaboradas utilizando-se os hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe como fonte de proteína (maior proporção de di- e tripeptídeos), acrescidos de gordura, carboidratos, minerais e/ou elementos-traços. Depois de misturados, são secos por "spray-drying" (KITAGAWA et al., 1987; TESMER et al., 1998).

No processo de produção de hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe, são utilizadas comumente 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 (MIRA & MARQUEZ, 2000).

A ingestão de hidrolisados protéicos apresenta vantagens relacionadas ao seu teor de oligopeptídeos. A absorção de di- e tripeptídeos é mais rápida e completa que aquela observada para uma mistura equivalente de aminoácidos (GRIMBLE et al., 1986; ZIEGLER et al., 1990; SHIMAMURA et al., 1999). Além disso, os hidrolisados apresentam menor osmolaridade, reduzindo a incidência de diarreia osmótica (FURST et al., 1990; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994)

## **2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

### **2.1 IMPORTÂNCIA**

A hidrólise protéica consiste na clivagem das ligações peptídicas das proteínas, produzindo peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, e pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. Os métodos químicos (hidrólise ácida ou básica) são inespecíficos e de difícil controle, podendo causar racemização dos aminoácidos e destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina, o que compromete o valor

nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1981; LAHL & BRAUN, 1994; CLEMENTE, 2000).

O tratamento enzimático apresenta diversas vantagens sobre a hidrólise química, entre as quais se destacam especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (CHEFTEL et al., 1989; MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995). Além disso, a remoção das enzimas do sistema de reação é, geralmente, desnecessária ou mais fácil do que para outros catalisadores, uma vez que são utilizadas em baixas concentrações, na maioria das vezes (REED, 1975). Outra importante vantagem refere-se à formação de oligopeptídeos, resultado da hidrólise parcial das proteínas, que são nutricionalmente superiores e apresentam elevado potencial para o preparo de formulações hipoalergênicas (ANANTHARAMAN & FINOT, 1993; SIEMENSMA et al., 1993).

O tratamento enzimático melhora a qualidade nutricional das proteínas, devido à presença dos oligopeptídeos, uma vez que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção das proteínas (VIJAYALAKSHIMI et al., 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (HARA et al., 1984; KEOHANE et al., 1985; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994). Por este motivo, os hidrolisados protéicos são amplamente utilizados na alimentação de pessoas com absorção intestinal comprometida, além de poderem ser base para alimentos usados no tratamento de doenças relacionadas à alimentação, como fenilcetonúria, doença de Crohn, intolerâncias e alergias alimentares (CLEMENTE, 2000).

As fórmulas à base de hidrolisados protéicos são também aplicadas em nutrição enteral devido a baixa osmolaridade das soluções constituídas principalmente de di- e tripeptídeos com massa molecular em torno de 500 Da (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994; SCHIMIDL et al., 1994)

Os hidrolisados enzimáticos têm, ainda, diversas aplicações na indústria de alimentos relacionadas às suas propriedades funcionais, uma vez que a hidrólise pode promover melhorias na solubilidade, no poder emulsificante, na textura e em características de aeração e gelificação das proteínas (CHOBERT et al., 1988; ABERT & KNEIFEL, 1993; FRØKJAER, 1994). Muitos alimentos têm sido modificados por proteases, como a soja, concentrados protéicos de peixe, carnes e queijos, no intuito de se obter produtos de melhor qualidade sensorial (CHEFTEL et al., 1989).

## 2.2 FATORES INTERFERENTES

O controle das condições hidrolíticas na digestão enzimática das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis, e características organolépticas agradáveis ao consumidor (SVENNING et al., 1993). As principais variáveis que devem ser controladas são pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima/substrato (E:S) e inativação enzimática ao final do processo (CÂNDIDO, 1998).

A catálise enzimática é altamente sensível à estrutura do substrato e às condições da reação catalítica. Desta forma, além dos resíduos de aminoácidos que fazem parte da ligação peptídica a ser clivada, os outros resíduos próximos a estes também influenciam na reação enzimática, bem como a organização espacial dos mesmos (ANTONOV, 1993).

O tipo de enzima empregada é um dos fatores mais importantes que influenciam a composição final dos hidrolisados, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e os aminoácidos que se quer deixar na forma livre (CHATAUD et al., 1988; HAQUE & MOZAFFAR, 1992). VERNEUIL et al. (1990) utilizaram a subtilisina para hidrolisar a albumina sérica bovina, encontrando um produto com predominância de di- e tripeptídeos, sem uma concomitante produção de aminoácidos livres. Ao empregarem uma protease ácida do *Rhizopus sp*, os mesmos autores, por outro lado, obtiveram uma menor proporção de oligopeptídeos e uma elevada concentração de aminoácidos livres e grandes peptídeos no hidrolisado.

A associação de enzimas, introduzidas na reação, simultânea ou sucessivamente, pode conduzir a um grau de hidrólise superior àquele obtido com uma única enzima, demonstrando um caráter de ação sinérgica ou complementar (CHATAUD et al., 1988). Assim, na produção de hidrolisados, enzimas de ampla especificidade têm sido utilizadas em associações, levando a uma hidrólise extensa, com a obtenção de pequenos peptídeos e aminoácidos (REED, 1975). Para obter hidrolisados 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).

## 2.3 PANCREATINA

A pancreatina é um complexo enzimático obtido a partir de pâncreas suíno. É constituído de lipases, amilases, ribonucleases e proteases (PARK, 2001). As proteases pancreáticas possuem ação de endopeptidases (quimotripsina, tripsina, elastase e colagenase) e de exopeptidases (carboxipeptidases A e B) (YAMAMOTO, 1975). A quimotripsina e a carboxipeptidase A clivam ligações peptídicas adjacentes a aminoácidos aromáticos (YAMAMOTO, 1975; WHITAKER, 1994), promovendo a exposição da Phe e facilitando sua posterior remoção por um meio adsorvente adequado.

A quimotripsina e a tripsina são serino proteases formadas a partir de seus zimogênios, o quimotripsinogênio e o tripsinogênio. Desta forma, de acordo com os locais onde o zimogênio é clivado, diferentes formas são apresentadas. A  $\alpha$ - quimotripsina é uma proteína de 3 cadeias, sendo uma curta (cadeia A, 13 resíduos de aminoácidos) e duas mais longas (cadeias B e C, 131 e 195 resíduos, respectivamente), ligadas por 5 pontes dissulfeto (ANTONOV, 1993). O pH ótimo de ação desta enzima situa-se na faixa de 7 a 9 (HESS, 1971; YAMAMOTO, 1975) e seu pI é 9,1 (VONK & WESTERN, 1984).

A tripsina possui ação máxima em valores de pH de 7 a 9 (YAMAMOTO, 1975) e o tripsinogênio é estável em pH entre 2 e 4. Em valores de pH superiores a 6, a ativação autocatalítica ocorre, havendo perda progressiva na atividade da enzima caso ela seja estocada em solução (VONK & WESTERN, 1984). O pI desta enzima é 10,8.

As serino proteases apresentam similaridades em sua estrutura. Assim, considerando-se as posições na quimotripsina, a estrutura das serino proteases contém: isoleucina ou valina na posição amino-terminal, valina e glicina nas posições 2 e 4 e as seqüências alanina-alanina-histidina-cisteína nas posições 55-58 e glicina-ácido aspártico-serina-glicina-glicina-prolina nas posições 193-198 (ANTONOV, 1993). Os resíduos de aminoácidos serina 195 e histidina 57 são essenciais na ação catalítica destas proteínas. Análises de raios-X mostraram que estes resíduos se situam próximos um do outro na estrutura terciária da enzima, formando o sítio ativo (ANTONOV, 1993). Além disso, resíduos de isoleucina na posição 16 e ácido aspártico na posição 194 mantém a conformação adequada do sítio ativo com a formação de uma ligação eletrostática entre o  $\text{NH}_3^+$  da isoleucina e o  $\text{COO}^-$  do ácido aspártico. Assim, em pH superior a 9, ocorre perda da atividade, devido à conversão deste grupo  $\text{NH}_3^+$  a  $\text{NH}_2$  (WHITAKER, 1994).

Apesar da estrutura do sítio ativo ser semelhante, a tripsina e a quimotripsina apresentam diferenças em relação à especificidade. Nas duas enzimas, a cavidade formada no sítio ativo é aberta o suficiente para permitir a entrada de resíduos de

aminoácidos de cadeia longa, devido à presença de glicina nas posições 216 e 226. No entanto, a tripsina possui um resíduo de ácido aspártico no fundo desta cavidade, enquanto que a quimotripsina apresenta um resíduo de serina nesta posição. A carga negativa do ácido aspártico da tripsina forma uma ligação eletrostática com a carga positiva de um grupo amino da lisina ou grupo guanidina da arginina, no substrato (WHITAKER, 1994). Assim, esta enzima apresenta alta especificidade para as ligações entre o grupo carboxil destes aminoácidos básicos (lisina e arginina) e o grupo amino de um aminoácido qualquer (YAMAMOTO, 1975). A quimotripsina possui atividade específica para as ligações peptídicas adjacentes à carboxila de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (YAMAMOTO, 1975), o que a torna indicada para uso na produção de hidrolisados protéicos com teor reduzido de fenilalanina (OUTINEN et al., 1996).

A carboxipeptidase A é uma metaloprotease que hidrolisa a ligação peptídica de resíduos carboxi-terminais com cadeias laterais aromáticas e alifáticas longas. O pH ótimo desta enzima está na faixa de 7 a 8 (HATSUCK & LIPSCOMB, 1971). O sítio ativo da carboxipeptidase A é composto por uma cavidade hidrofóbica contendo Zn(II), arginina nas posições 71 e 145, fenilalanina na posição 279 e tirosina nas posições 198 e 248 (WHITAKER, 1994). O Zn(II) está complexado na enzima com histidina nas posições 196 e 69 e ácido glutâmico na posição 72 (ANTONOV, 1993; WHITAKER, 1994). A ação proteolítica desta enzima é inibida por agentes quelantes de metais. A proteína sem metal se liga ao substrato, mas não exerce ação enzimática (WHITAKER, 1994). A cavidade hidrofóbica acomoda a cadeia lateral do resíduo carboxi-terminal (LIPSCOMB, 1980). Ocorrem ligações eletrostáticas entre a carga negativa da carboxila terminal do substrato e a carga positiva da arginina 145 da enzima, e ligações dipolares entre o Zn(II) e o oxigênio do grupo carbonila da ligação peptídica que será clivada no substrato (ANTONOV, 1993; WHITAKER, 1994). A carboxipeptidase B também contém zinco, porém atua quando o resíduo C-terminal é constituído de arginina ou lisina (WHITAKER, 1994).

## **2.4 COROLASE PP**

A corolase PP é um produto enzimático proteolítico, obtido de pâncreas suíno, composto por várias amino- e carboxi-peptidases, além de possuir atividade de endo-proteinase. Apresenta-se como um pó sólido de cor bege, com odor característico.



A ação da corolase PP é maior em pH neutro ou ligeiramente alcalino. A temperatura ótima de atuação deste preparado encontra-se na faixa de 40 a 55 °C.

Os substratos para a corolase PP são proteínas de origem animal ou vegetal usadas em tecnologia de alimentos. O uso da enzima se mostra mais vantajoso em substratos que tendem a formar peptídeos amargos quando são hidrolisados, como a caseína, proteínas do soro, proteínas da soja e glúten.

A corolase PP preenche os requisitos do Joint Expert Committee for Food Additives (JECFA/FAO/WHO) e do Food Chemicals Codex (FCC) (AB ENZYMES, 2001).

### **3 ARROZ: DADOS RELEVANTES**

#### **3.1 CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E SÓCIO-ECONÔMICAS DO ARROZ**

O arroz é a cultura cereal mais importante em países em desenvolvimento, e o alimento base de cerca de metade da população mundial. São conhecidas cerca de 20 espécies do gênero *Oryza*, mas quase todo o arroz cultivado no mundo é da espécie *Oryza sativa* L. (JULIANO, 1993).

Devido ao seu longo histórico de cultivo e seleção em diversos ambientes, *O. sativa* adquiriu uma ampla faixa de adaptabilidade e tolerância, podendo ser cultivado em vários regimes de água/solo, que variam de terras profundamente inundadas a rampas montanhosas secas (JULIANO, 1993). Atualmente, o arroz é cultivado em mais de 100 países em todos os continentes, estendendo de 50° de latitude norte a 40° sul, do nível do mar a altitudes de 3000 m.

Cerca de 95% de todo o arroz produzido no mundo provém de países em desenvolvimento, principalmente da Ásia, enquanto que apenas 42% do trigo é produzido por países em desenvolvimento. Na Tabela 2, são mostrados dados sobre o produção, importação e exportação de arroz, no Brasil e no mundo, no período de 2001/2002.

Em 39 países, o arroz é um alimento base, mas a dependência do arroz como fonte de energia da dieta é muito maior na Ásia do que em outras regiões. Cerca de 12,3 % da energia e 9,2 % da proteína ingeridos na dieta média do brasileiro são fornecidos pelo arroz. O consumo *per capita* de arroz no Brasil foi de 36,3 kg/habitante no ano de 2001 (FAO, 2002; IRRI, 2001)

**Tabela 2 – Produção, importação e exportação de arroz em casca**

Região ou País	Produção <sup>a</sup> (x 10 <sup>6</sup> t)	Importação <sup>b</sup>		Exportação <sup>b</sup>	
		(x 10 <sup>6</sup> t)	(x 10 <sup>6</sup> US\$)	(x 10 <sup>6</sup> t)	(x 10 <sup>6</sup> US\$)
Mundo	576.280	33.989		41.233	
Brasil	10.489	976	136	44	6

<sup>a</sup> referente ao ano de 2002. Fonte: FAO (2002)

<sup>b</sup> referente ao ano de 2001. Fonte: IRRI (2001)

### 3.2 ESTRUTURA DO GRÃO

O grão de arroz bruto consiste em uma cobertura externa protetora, a casca, e o fruto em si ou arroz integral. O grão integral é formado pelas camadas externas do pericarpo, pelo germe ou embrião e pelo endosperma. Este compreende a camada aleurona e o endosperma propriamente dito (arroz polido), que se divide em camada sub-aleurona e endosperma amiláceo ou interno. A camada aleurona circunda o embrião (JULIANO, 1993).

As células do endosperma possuem parede fina e amiloplastos contendo grânulos de amido. As duas camadas mais externas (camadas sub-aleurona) são ricas em proteína e lípidos e possuem amiloplastos e grânulos menores que os do endosperma amiláceo. A proteína é encontrada principalmente na forma de corpos protéicos esféricos de 0,5 a 4,0 µm de diâmetro, distribuídos pelo endosperma, e corpos cristalinos menores localizados na camada sub-aleurona (BECHTEL & POMERANZ, 1978; TANAKA, 1973).

### 3.3 CLASSIFICAÇÃO

De acordo com a comissão do Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1990), o arroz polido pode ser classificado, baseado na razão entre o comprimento e a largura do grão (C/L), em: grão longo (C/L maior que 3,1); grão médio (C/L entre 2,1 e 3,0); e grão curto (C/L menor que 2,0). No Brasil, a classificação é feita levando-se em conta apenas o comprimento do grão, exceto para o tipo longo-fino, em que a relação C/L também é utilizada. A classificação para o arroz com casca ou polido no Brasil é a seguinte: longo fino (comprimento maior ou igual a 6,00 mm, largura menor

ou igual a 1,90 mm e C/L maior que 2,75 após o polimento dos grãos); longo (comprimento maior ou igual a 6,00 mm); médio (comprimento entre 5,00 e 6,00 mm); e curto (comprimento menor que 5,00 mm) (BRASIL, 1988).

A comissão do Codex Alimentarius recomenda que o arroz polido apresente as seguintes tolerâncias para defeitos: 0,5% de matéria estranha orgânica, 0,5% de matéria estranha inorgânica, 0,3% de arroz com casca, 1,0% de arroz integral, 2,0% de grãos imaturos, 3,0% de grãos danificados, 4,0% de grãos vermelhos, 8,0% de grãos com listras vermelhas e 11,0% de grãos quebradiços (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1990). No Brasil, o arroz é classificado em 5 tipos, de acordo com o número de defeitos. O arroz do tipo 1, de melhor qualidade, não deve apresentar mais 0,25% de defeitos graves e 4,00% de defeitos totais (BRASIL, 1988).

### 3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Dentre as frações de arroz, o farelo (resíduo compreendendo o pericarpo e a camada aleurona, proveniente do polimento do arroz integral) possui os maiores conteúdos de energia e proteína, e a casca, os menores. O polimento do arroz envolve perda de gordura, proteína, fibras, cinzas e vitaminas. O teor de carboidratos, principalmente amido, é maior no arroz polido que no integral (JULIANO, 1993). A composição do arroz e suas frações é mostrada na Tabela 3, e o conteúdo de vitaminas e minerais na Tabela 4.

**Tabela 3 – Composição aproximada do arroz e suas frações, a 14% de umidade**

Fração do arroz	Proteína bruta (g N x 5, 95)	Lípides (g)	Fibra bruta (g)	Cinzas totais (g)	Carboidratos (g)	Energia (kcal)
Arroz bruto	5,8-7,7	1,5-2,3	7,2-10,4	2,9-5,2	64-73	378
Arroz integral	7,1-8,3	1,6-2,8	0,6-1,0	1,0-1,5	73-87	363-385
Arroz polido	6,3-7,1	0,3-0,5	0,2-0,5	0,3-0,8	77-89	349-373
Farelo	11,3-14,9	15,0-19,7	7,0-11,4	6,6-9,9	34-62	399-476
Casca	2,0-2,8	0,3-0,8	34,5-45,9	13,2-21,0	22-34	265-332

Fonte: JULIANO (1993)

**Tabela 4 – Conteúdo de vitaminas e minerais do arroz e suas frações, a 14% de umidade**

Fração do arroz	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)	a – Tocoferol (mg)	Cálcio (mg)	Fósforo (g)
Arroz bruto	0,26-0,33	0,06-0,11	2,9-5,6	0,90-2,00	10-80	0,17-0,39
Arroz integral	0,29-0,61	0,04-0,14	3,5-5,3	0,90-2,50	10-50	0,17-0,43
Arroz polido	0,02-0,11	0,02-0,06	1,3-2,4	75-0,30	10-30	0,08-0,15
Farelo	1,20-2,40	0,18-0,43	26,7-49,9	2,60-13,3	30-120	1,1-2,5
Casca	0,09-0,21	0,05-0,07	1,6-4,2	0	60-130	0,03-0,07

Fonte: JULIANO (1993).

### 3.5 AS PROTEÍNAS DO ARROZ

O teor de proteína do arroz, geralmente, é determinado pelo método de micro Kjeldahl, utilizando-se o fator de 5,95 para conversão do conteúdo de nitrogênio em proteína. Este fator baseia-se no teor de nitrogênio da glutelina (16,8%), proteína mais abundante no arroz polido.

A proteína do endosperma consiste em várias frações, compreendendo 15% de albumina (solúvel em água) mais globulina (solúvel em solução salina), 5 a 8% de prolamina (solúvel em álcool) e o restante (77 a 80%) de glutelina (solúvel em álcali) (JULIANO, 1993). O teor de lisina da proteína do arroz é de 3,5 a 4,0%, um dos mais altos dentre as proteínas de cereais (Tabela 5).

As proteínas do farelo do arroz são mais ricas em albumina que as do endosperma. TANAKA et al. (1973) relatou a presença de 66% de albumina, 7% de globulina e 27% de prolamina mais glutelina nos corpos protéicos da camada aleurona.

**Tabela 5 – Conteúdo de aminoácidos em alguns alimentos**

Alimento	Lisina (g/16 g N)	Treonina (g/16 g N)	Metionina + cistina (g/16 g N)	Triptofano (g/16 g N)	Escore <sup>a</sup> de aminoácido (%)
Arroz integral	3,8	3,6	3,9	1,1	66
Trigo	2,3	2,8	3,6	1,0	40
Milho	2,5	3,2	3,9	0,6	43
Sorgo	2,7	3,3	2,8	1,0	47
Centeio	3,7	3,3	3,7	1,0	64
Aveia	4,0	3,6	4,8	0,9	69
Batata	6,3	4,1	3,6	1,7	100
Inhame	6,0	3,4	2,9	1,3	100

<sup>a</sup> Baseado em 5,8% de lisina como 100%.

Fonte: JULIANO (1993).

A glutelina do arroz consiste em 3 subunidades ácidas (ou  $\alpha$ -subunidades) de 30 a 39 kDa e 2 subunidades básicas (ou  $\beta$ -subunidades) de 19 a 25 kD (JULIANO, 1993). Os dois tipos de subunidades são formados pela clivagem de um polipeptídeo precursor de 57 kDa (SUGIMOTO et al., 1986). A prolamina é formada, principalmente, por subunidades de 13 kDa, somadas a uma menor quantidade de subunidades de 10 e 16 kDa (HIBINO et al., 1989). Os conteúdos de aminoácidos essenciais das subunidades da prolamina e da glutelina são dados na Tabela 6.

O teor da proteína do arroz é similar ao da batata e ao do inhame, em base seca, mas é o menor entre os cereais. A análise de aminoácidos mostrou que a lisina é o primeiro aminoácido essencial limitante em proteínas de cereais, sendo que o arroz e a aveia apresentam os maiores teores deste aminoácido, conforme mostrado na Tabela 5 (JULIANO, 1993).

A proteína do arroz tem a maior digestibilidade entre os cereais (Tabela 7), provavelmente em parte devido a seu menor conteúdo de fibras e taninos. Desta forma, a Utilização Protéica Líquida (NPU) da proteína do arroz é maior que a das proteínas do centeio, da aveia e da batata, mesmo estas possuindo maior valor biológico (JULIANO, 1993).

**Tabela 6 – Aminograma (g/16 g) das subunidades da prolamina e glutelina do arroz**

Aminoácido	Subunidades de glutelina		Subunidades de prolamina		
	30-39 kDa (ácida)	19-25 kDa (básica)	13 kDa	10 kDa	16 kDa
Histidina	2,2-2,5	2,6-2,7	2,0-2,4	1,7	4,2
Isoleucina	3,2-3,3	4,1-4,9	3,8-5,4	1,6	3,6
Leucina	6,4-7,5	7,0-8,5	17,9-26,4	4,7	8,1
Lisina	2,2-3,0	3,0-4,1	0,4-5,5	1,0	3,3
Methionina + cistina	0,2-1,9	0,1-2,4	0,7-1,2	22,5	5,3
Fenilalanina + tirosina	10,0-10,5	10,1-10,8	12,7-21,6	4,3	7,6
Treonina	2,8-3,7	2,5-3,7	1,8-2,8	6,8	2,7
Valina	5,1-5,7	5,7-7,0	2,7-3,9	4,4	3,9
Escore de aminoácido (%)	38-52	52-71	7-8	18	57

Fonte: JULIANO (1993).

O cozimento do arroz reduz a digestibilidade de suas proteínas, mas a disponibilidade da lisina permanece inalterada, mantendo o NPU em torno de 70% (EGGUM et al., 1992).

**Tabela 7 – Valor nutricional de proteínas de cereais em ratos**

Alimento	Digestibilidade de N (%)	Valor biológico (%)	NPU (%)	Energia digerível	
				(kcal/g)	(% do total)
Arroz integral	99,7	74,0	73,8	3,70	96,3
Trigo	96,0	55,0	53,0	3,24	86,4
Milho	95,0	61,0	58,0	3,21	81,0
Sorgo	84,8	59,2	50,0	3,07	79,9
Centeio	77,0	77,7	59,0	5,1	3,18
Aveia	84,1	70,4	59,1	5,5	2,77
Batata	82,7	80,9	66,9	5,2	-

Fonte: JULIANO (1993).

## 4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ARROZ

Os cereais representam a fonte vegetal mais abundante de proteínas para uso humano. Geralmente, concentrados protéicos são obtidos a partir de cereais por processamento úmido (SAUNDERS et al., 1975; CONNOR et al., 1976; LINDSAY et al., 1977; EUBER et al., 1991).

As proteínas do arroz, embora deficientes em lisina e treonina, apresentam um dos mais altos valores nutritivos entre as proteínas de cereais (CONNOR et al., 1976; JULIANO, 1993). Segundo JULIANO (1993), 77 a 80% das proteínas do arroz compõem a fração glutelina, solúvel em álcali, mas insolúvel em água. Desta forma, na maior parte dos trabalhos encontrados na literatura foi utilizada a extração alcalina na obtenção de concentrados protéicos a partir de arroz ou de seus subprodutos (SAUNDERS et al., 1975; CONNOR et al., 1976; LINDSAY et al., 1977; EUBER et al., 1991).

CONNOR et al. (1976) obtiveram um concentrado protéico a partir de farelo de arroz, contendo de 23 a 31% de proteína, utilizando a extração alcalina. As condições utilizadas foram pH 9,0 (obtido por adição de solução de hidróxido de sódio diluída), agitação por 15 min, à temperatura de 24 °C, seguida de separação por pressão hidráulica a 40 psi. As proteínas presentes na fração líquida foram, então, precipitadas por injeção de vapor (85 °C) ou redução de pH para 4,0, sendo que na precipitação ácida obteve-se um produto com maior teor protéico.

Concentrados protéicos de farelo de arroz foram obtidos por LINDSAY et al. (1977). Foram utilizados tanto soro de leite quanto água como líquido extrator, e testadas diversas variáveis, tais como concentração do farelo arroz (5 a 20%, em peso), temperatura (15 a 70 °C), tempo de extração (15 a 60 min) e pH (2 a 10). As melhores condições foram concentração de farelo de arroz de 20%, em agitação por 15 min a 25 °C, em pH 9. Os rendimentos e a composição do produto final foram semelhantes tanto utilizando-se água quanto soro de leite como líquido extrator. Cerca de 65% das proteínas do farelo de arroz foram extraídas por este método.

EUBER et al. (1991) patentearam um método para obtenção de um concentrado protéico solúvel de arroz. O conteúdo de proteína deste concentrado variou de 16 a 90%. O método consistiu na realização de uma hidrólise enzimática do amido por meio de uma alfa-amilase, seguido por aquecimento a 105-130 °C por 30 a 60 s. A fração protéica insolúvel foi separada da fração líquida rica em carboidrato por um método físico como centrifugação, filtração ou decantação. Adicionou-se, então, a esta fração uma enzima proteolítica, de forma a torná-la solúvel.

HAMADA (1997) fracionou as proteínas do farelo de arroz, utilizando quatro solventes: solução de NaCl a 2%, solução de etanol a 70%, solução de ácido acético a 0,1 mol/L e solução de NaOH a 0,1 mol/L. As frações albumina, globulina, prolamina e glutelina encontradas corresponderam a 34,7; 17,4; 6,7 e 41,3% do total de proteínas, respectivamente.

TANG et al. (2002) extraíram as proteínas de farelo de arroz desengordurado utilizando processamentos físicos e tratamentos enzimáticos. Em uma série de experimentos, foram testados os efeitos do congelamento-descongelamento, sonicação, tratamento com amilase, tratamento com protease, agitação a alta velocidade e tratamento à alta pressão na extração protéica. Os melhores resultados foram obtidos usando a sonicação associada ao tratamento com amilase e protease, levando a um rendimento de extração de 56,2 % e os tratamentos à alta pressão combinados com o uso de amilase e protease (rendimentos de extração de 64,8 a 66,6 %). Os autores concluíram que os tratamentos físicos por si só não extraem quantidades substanciais de proteínas, mas contribuem para criar um ambiente favorável para a extração pelos métodos enzimáticos.

Em alguns casos, o interesse na extração protéica estava voltado para a obtenção do amido do arroz. Sendo assim, os resultados do rendimento da extração protéica não foram apresentados (LUMDUBWONG & SEIB, 2000; WANG & WANG, 2004). Nesses trabalhos, foram utilizados diferentes métodos, como digestão por protease alcalina e neutra e extração alcalina. Utilizando a digestão por uma protease alcalina, LUMDUBWONG & SEIB (2000) obtiveram um amido de arroz com teor protéico de 0,5 %. WANG & WANG (2004) compararam a extração alcalina de proteínas com a digestão por protease neutra, com ou sem tratamento por ultrassom de alta intensidade, na obtenção do amido de arroz. Embora a qualidade do amido obtido tenha sido pior, a extração alcalina foi mais eficiente na remoção de proteínas, uma vez que o teor final de proteínas no amido foi menor quando o método alcalino foi utilizado. Para a extração alcalina, 100 g do arroz moído foram misturados com 200 mL de solução de NaOH a 0,1 % por 18 h e centrifugados a 1400 x g por 10 min.

## **5 MÉTODOS DE REMOÇÃO DE FENILALANINA**

A fenilalanina está presente em todas as proteínas de origem animal e vegetal, na proporção de 3 a 6% (OUTINEN et al., 1996). Desta forma, vários métodos foram



desenvolvidos para remover este aminoácido, visando o desenvolvimento de formulações com baixo teor de Phe (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Os métodos usados para a remoção de Phe baseiam-se na liberação deste aminoácido por hidrólise química ou enzimática, sendo posteriormente removido por tratamentos diferenciados (SHIMAMURA et al., 1999). Vários métodos são utilizados para a remoção, como adsorção em carvão ativado ou resinas de adsorção, cromatografia de troca iônica, peneira molecular ou filtração em gel, além de desaminação deste aminoácido pela enzima fenilalanina amônia liase. A escolha do método deve considerar a praticidade, a reprodutibilidade e a relação custo/eficiência de cada tratamento (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993).

O carvão ativado foi utilizado por diversos pesquisadores na remoção de Phe de hidrolisados protéicos. Assim, hidrolisados de soro de leite foram obtidos por KITAGAWA et al. (1987), utilizando actinase, e posteriormente passados em coluna de carvão ativado, resultando em 97% de remoção da Phe. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) utilizaram este mesmo meio adsorvente, removendo 92% da Phe de hidrolisados de caseína e leite em pó desnatado, obtidos pela ação de uma protease microbiana associada à papaína. Cerca de 90% da Phe foi removida por MOSZCZYNSKI & IDIZIAK (1993) de hidrolisados de caseína, após tratamento com carvão ativado. Para se obter estes hidrolisados, foi utilizada uma associação das enzimas quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase. Estes mesmos autores testaram também outros meios para a remoção de Phe, como resinas de troca iônica e de exclusão molecular, sendo a maior remoção obtida com o uso do carvão ativado. No mesmo laboratório onde foi desenvolvido o presente trabalho, o carvão ativado foi utilizado com eficiência para a remoção de Phe de hidrolisados de leite em pó desnatado (SOARES et al. 2004; LOPES et al., 2004) e de soro de leite em pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b), utilizando diferentes enzimas e condições hidrolíticas.

Outros materiais também foram utilizados com o objetivo de diminuir a concentração de Phe de hidrolisados. A resina de exclusão molecular Sephadex G-15 foi utilizada por YAMASHITA et al. (1976), em hidrolisados de concentrado protéico de peixe e de isolado protéico de soja preparados com pepsina e pronase, obtendo produtos com concentração final de Phe entre 0,05 e 0,23 g/100 g. Este mesmo meio foi utilizado por ARAI et al. (1986), que empregaram as mesmas enzimas no preparo de hidrolisados de concentrado protéico de soro, obtendo 90% de remoção de Phe.

OUTINEN et al. (1991) utilizaram as resinas de adsorção XAD-4 e XAD-16, removendo de 92% a 100% da Phe de hidrolisados pancreáticos. Valores inferiores de remoção (61% e 62,5%) foram encontrados por VASCONCELLOS et al. (1989) e SANTOS et al. (2003), ao utilizar a resina XAD-4 para remover a Phe de hidrolisados de caseína. Este mesmo meio foi utilizado por DELVIVO et al. (2005a,b) para remover 95% da Phe de hidrolisados de soro de leite, no mesmo laboratório onde foi desenvolvido o presente trabalho.

## 6 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE FENILALANINA

Vários métodos são descritos na literatura para a dosagem de Phe, entre eles: determinação por analisador de aminoácidos, espectrofotometria derivada segunda (EDS) (BRANDTS & KAPLAN, 1973; O'HAVER, 1979; MATSUSHIMA et al., 1975; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a,b; CAHILL & PADERA, 1980; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988; SILVESTRE et al., 1993), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa (BADOUD & PRATZ, 1984; BIDLINGMEYER et al., 1984; CARISANO, 1985; VENDRELL & AVILÉS, 1986; ZEZZA et al., 1992), HPLC de troca iônica (FANG et al., 1992), HPLC hidrofílica (CARREIRA et al., 2002) e sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999).

A EDS é uma técnica baseada no cálculo da segunda derivada do espectro de absorção normal dos compostos analisados, e tem sido utilizada para separar o complexo espectro de absorção das proteínas nas contribuições individuais dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e para quantificá-los, uma vez que esses apresentam bandas de absorção características na região do ultravioleta, entre 240 e 310 nm (ICHIKAWA & TERADA, 1977; CAHILL & PADERA, 1980; RAGONE et al., 1984; MICLO et al., 1995). A EDS é considerada uma técnica simples, rápida e de custo relativamente baixo, sendo um método quantitativo e qualitativo vantajoso, de grande utilidade (RAGONE et al., 1984).

ICHIKAWA & TERADA (1977, 1979, 1981a,b) relataram a eficiência da EDS para medir o teor de Phe em proteínas ou em hidrolisados protéicos. Estes autores, primeiramente, examinaram resíduos de Phe em proteínas e demonstraram que entre 245 e 270 nm, os resíduos de aminoácidos de tirosina e triptofano não causam diferenças significativas nas propriedades da Phe. Dois anos mais tarde, determinaram a Phe, por este método, em proteínas desnaturadas, encontrando resultados que concordavam com

os descritos na literatura. Vários autores têm relatado a grande confiabilidade do uso da EDS, entre 245 e 270 nm para quantificar os resíduos de Phe em proteínas, desde que as variáveis como o pH e a adição de outras substâncias sejam controladas (BRANDTS & KAPLAN, 1973; MATSUSHIMA et al., 1975; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a,b; O'HAVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988).

Recentemente, a EDS foi empregada em estudos no mesmo laboratório onde foi realizado o presente estudo. Assim, LOPES et al. (2004), SOARES et al. (2004), DE MARCO (2004), SILVA (2004) e DELVIVO et al. (2005a,b) utilizaram a EDS como método de triagem das melhores condições para remoção de Phe de hidrolisados protéicos. A EDS foi eficiente para determinar o grau de exposição de Phe, em pH 6, e de Tyr e Trp, em pH 13, em hidrolisados de caseína (MORAIS et al., 2005).

## **7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS**

A determinação da composição de peptídeos e aminoácidos e do tamanho da cadeia peptídica é importante para caracterizar os hidrolisados protéicos com propósitos funcionais ou nutricionais. Assim, diversas técnicas têm sido utilizadas para a separação e identificação dos constituintes do hidrolisado (VISSER et al., 1992; SILVESTRE et al., 1994b). O fracionamento dos peptídeos e aminoácidos pode ser feito por métodos diversos, incluindo várias formas de eletroforese e cromatografia. Em seguida, pode-se identificar os peptídeos de acordo com a sua composição aminoacídica, ou por meio do uso de espectrometria de massa (LÉONIL et al., 2000) ou de espectrofotometria (SILVESTRE et al., 1994b).

Dentre os métodos cromatográficos utilizados no fracionamento de hidrolisados protéicos, podem-se citar o HPLC de exclusão molecular (DEESLIE & CHERYAN, 1991; ZHANG et al., 1992; SILVESTRE et al., 1994a), HPLC de fase reversa (YVON et al., 1989; LEMIEUX et al., 1991), HPLC de troca iônica (DIZDAROGLU, 1985) e HPLC de troca ligante (VERNEUIL et al., 1990). A cromatografia líquida de exclusão molecular tem sido citada como uma importante técnica na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados protéicos. Vários materiais têm sido propostos como suporte para separar os peptídeos por tamanho, como os géis Sephadex G-25 (AMIOT & BRISSON, 1980; ZHANG et al., 1992), Sephadex G-10 (LANDRY et al., 1988), o Bio-gel P-2 (ILIEV &

TCHORBANOV, 1992) e poli(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA) (SIVESTRE et al., 1994a).

A quantificação dos peptídeos das frações cromatográficas obtidas por HPLC de exclusão molecular pode ser feita pelo método rápido da área corrigida da fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994b). Este método consiste na medida da absorvância a 230, 280 e 300 nm, para se eliminar a interferência de aminoácidos aromáticos, seguida de cálculos matemáticos específicos. O método da AFC foi empregado diversas vezes, no mesmo laboratório onde foi desenvolvido o presente estudo, na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados de caseína, leite em pó desnatado e soro de leite (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2002; LOPES et al., 2004; SOARES et al., 2004; DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; MORAIS et al., 2005; DELVIVO et al., 2005a,b).

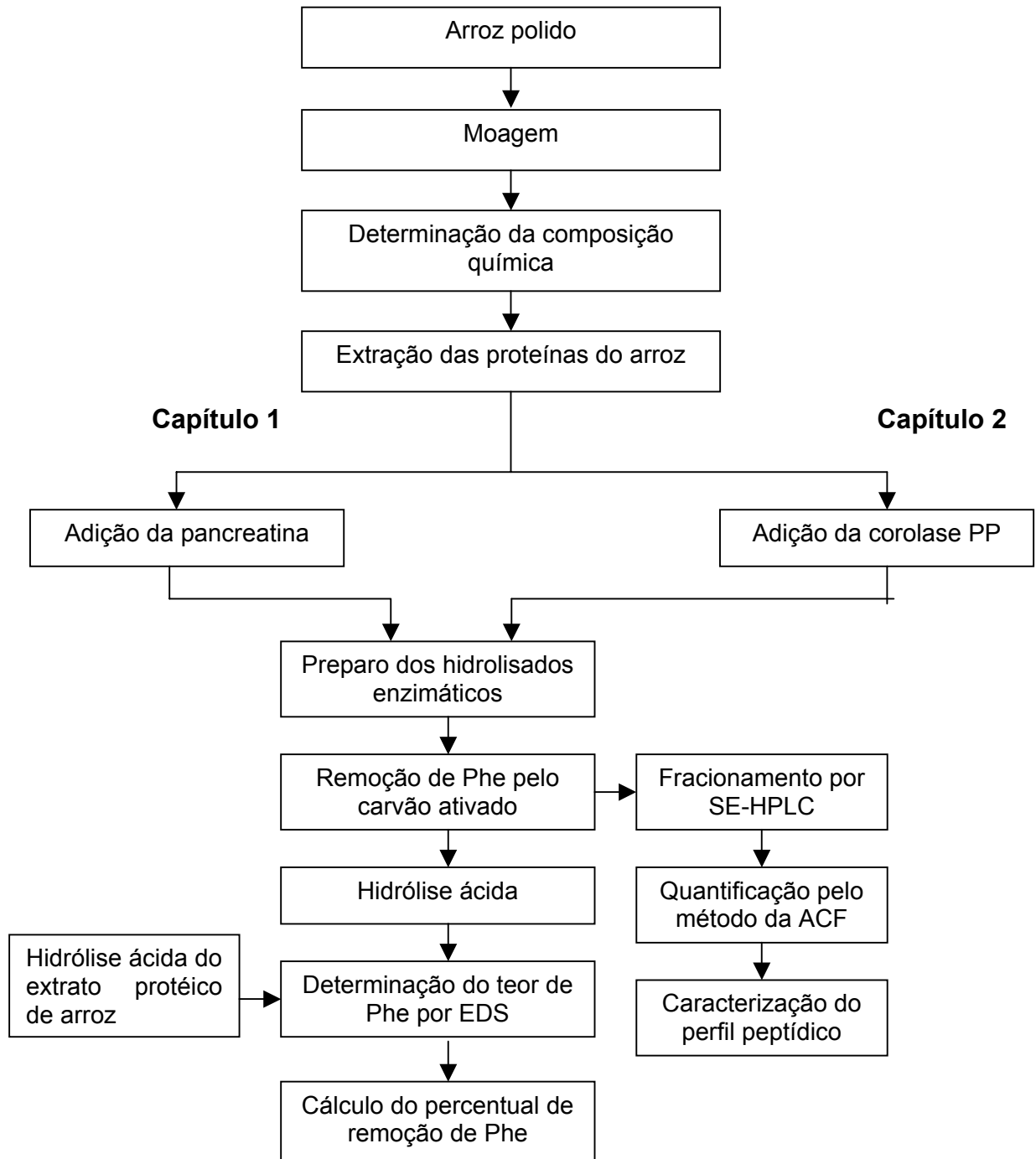
# TRABALHO EXPERIMENTAL

## 1 APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho está apresentada na forma de fluxograma, na Figura 2. Os resultados foram divididos em dois capítulos e redigidos sob a forma de artigos científicos.

O primeiro capítulo refere-se à utilização da pancreatina na produção de hidrolisados de arroz com baixo teor de Phe e perfil peptídico nutricionalmente adequado. Inicialmente, as proteínas do arroz foram extraídas em meio alcalino. Diversas variáveis foram testadas, visando a otimização do processo. A partir do extrato protéico obtido, foram preparados hidrolisados empregando-se a pancreatina em duas relações enzima-substrato. Utilizou-se o carvão ativado para a remoção de Phe dos hidrolisados, e a eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor de Phe livre no extrato protéico de arroz e nos hidrolisados, após tratamento com carvão. A qualidade nutricional dos hidrolisados protéicos foi avaliada em termos da quantidade de oligopeptídeos, tendo-se utilizado o fracionamento por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (SE-HPLC), seguida da quantificação pelo método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), na caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados.

No capítulo 2, a corolase PP foi utilizada no preparo dos hidrolisados enzimáticos de arroz, com as mesmas finalidades citadas acima, empregando-se as proteínas extraídas do arroz em meio alcalino. Em seguida, foram utilizados os mesmos procedimentos relacionados acima, para a remoção de Phe e a avaliação nutricional do perfil peptídico dos hidrolisados protéicos.



**Figura 2 – Principais etapas do trabalho experimental**

# USO DA PANCREATINA E DO CARVÃO ATIVADO NO PREPARO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA

## RESUMO

As proteínas do arroz foram extraídas em meio alcalino, utilizando diferentes condições de extração, variando-se o pH e o tempo de extração. A partir do extrato obtido, seis hidrolisados enzimáticos de arroz foram preparados, empregando-se a pancreatina em duas relações enzima:substrato, visando o desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos. Para remover a fenilalanina dos hidrolisados, foi utilizado o procedimento de passagem por coluna contendo carvão ativado. A espectrofotometria derivada segunda foi utilizada para determinar o teor de Phe no extrato protéico de arroz e seus hidrolisados, após tratamento com carvão. O percentual de remoção variou de 84 a 100%, obtendo-se teores finais de Phe de 0,00 a 95 mg de Phe/100 g de hidrolisado. Como um dos critérios para a avaliação da qualidade dos hidrolisados, foi estudada a distribuição dos peptídeos nas amostras, de acordo com o tamanho da cadeia, tendo os resultados indicado que o melhor perfil peptídico, com maior teor de oligopeptídeos, foi obtido quando se empregou a pancreatina em uma relação E:S de 2%, em uma solução de extrato protéico de arroz com concentração de 2 g/100 mL.

**Palavras-chave:** arroz, pancreatina, carvão ativado, hidrólise enzimática, remoção de fenilalanina, suplemento dietético.

## ABSTRACT

**USE OF PANCREATIN AND ACTIVATED CARBON FOR PREPARING RICE PROTEIN HYDROLYSATES WITH LOW PHENYLALANINE CONTENT.** Rice proteins were extracted by an alkaline process, varying some of the extraction conditions. The extract was used for preparing six hydrolysates, using pancreatin in two enzyme:substrate (E:S) ratios, with the aim of producing dietary formulation for phenylketonuria treatment. For removing phenylalanine (Phe), a column containing activated carbon was used. Second derivative spectrophotometry was used to determine the Phe contents of the rice protein extract and hydrolysates. The Phe removal varied from 84 to 100%, corresponding to a final concentration of Phe from 0,00 to 95 mg/100 g of hydrolysate. An analysis of distribution of peptides according to their size was performed in order to evaluate the nutritional quality of the hydrolysates. The best peptide profile was obtained when pancreatin was used with an E:S of 2%, and the initial protein concentration was 1,54 g/100 mL.

**Keywords:** rice, pancreatin, activated carbon, enzymatic hydrolysis, phenylalanine removal, dietary supplement.



## INTRODUÇÃO

O arroz é a cultura cereal mais importante em países em desenvolvimento, e o alimento base de cerca de metade da população mundial (JULIANO, 1993). Em 39 países, o arroz é um alimento base, mas a dependência do arroz como fonte de energia da dieta é muito maior na Ásia que em outras regiões. Cerca de 12,3 % da energia e 9,2 % da proteína ingeridos na dieta média do brasileiro são fornecidos pelo arroz. O consumo *per capita* de arroz no Brasil foi de 36,3 kg/habitante no ano de 2001 (FAO, 2002; IRRI, 2001). Apesar do teor de proteína do arroz ser o menor dentre os cereais, o valor nutricional desta proteína é superior ao de outros grãos, possuindo melhor digestibilidade e maiores teores de lisina, aminoácido limitante nos cereais (JULIANO, 1993).

Levando-se em conta a posição relevante que ocupa o arroz na dieta do brasileiro, seria de grande interesse utilizá-lo como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de fenilcetonúricos. A fenilcetonúria (PKU) é um dos distúrbios metabólicos congênitos mais comuns, caracterizando-se pela deficiência ou ausência da enzima fenilalanina hidroxilase, que catalisa a conversão de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr) (STRYER, 1988). Esta deficiência causa o aumento dos níveis de Phe no sangue, podendo levar a uma grave deficiência mental, se não for tratada (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; SHIMAMURA et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000).

Atualmente, o tratamento da PKU é essencialmente dietético, embora alguns pesquisadores estejam buscando alternativas à dieta (SARKISSIAN et al., 1999; LEVY et al., 1999; KIM et al., 2004; BLAU & ERLANDSEN, 2004). Estas pesquisas, no entanto, ainda estão em fases preliminares, e dificilmente estes novos tratamentos substituirão completamente o tratamento dietético. A dieta se baseia no controle da ingestão de alimentos que contêm Phe, o que implica em uma ingestão de alimentos protéicos bastante limitada (MIRA & MARQUEZ, 2000). A dieta deve ser complementada por substitutos protéicos, isentos ou pobres em Phe, e suplementada com tirosina e outros aminoácidos, além de vitaminas e minerais (STRYER, 1988; KANUFRE et al., 2001).

Os substitutos protéicos são constituídos de misturas de L-aminoácidos ou de hidrolisados protéicos pobres em Phe (MIRA & MARQUEZ, 2000). No Brasil, apenas as misturas de aminoácidos livres são utilizadas. Estas formulações, além de possuírem alto custo por serem importadas, apresentam elevada osmolaridade e sabor desagradável (ACOSTA et al., 1998). Suplementos à base de hidrolisados enzimáticos de proteínas contendo oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, têm sido recomendados por

serem melhor absorvidos pelo organismo que misturas de aminoácidos livres (BOZA et al., 1985; KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE & SILK, 1989; OUTINEN et al., 1996). Além disso, os hidrolisados protéicos apresentam um custo de produção menor que as misturas de aminoácidos livres (COGAN et al., 1981; AUBES-DUFAU et al., 1995).

As proteínas animais e vegetais contém de 3 a 6% de Phe, em média (OUTINEN et al., 1996). A hidrólise enzimática expõe a Phe, possibilitando sua remoção por filtração em gel, cromatografia de troca iônica ou adsorção em carvão ativado ou resinas (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

Existem diversas metodologias empregadas na determinação do teor de Phe, como determinação por analisador de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1986; SILVESTRE et al., 1994a,b), por espectrofotometria derivada segunda (EDS) (BRANDTS & KAPLAN, 1973; MATSUSHIMA et al., 1975; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a,b; O'HAVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988), por sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999) ou por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), método desenvolvido no mesmo laboratório no qual este trabalho foi realizado (CARREIRA et al., 2002). Diversas aplicações da EDS foram, igualmente, testadas no mesmo laboratório onde foi desenvolvido o presente estudo. Assim, essa técnica foi utilizada com sucesso para determinação do grau de hidrólise de hidrolisados protéicos (SILVESTRE et al., 1993), na determinação da taxa de encapsulamento de hidrolisados protéicos, na avaliação do grau de exposição de Phe (MORAIS et al., 2005) e na avaliação da remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (SOARES et al. 2004; LOPES et al., 2004) e de soro de leite em pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b).

De acordo com GONZÁLES-TELLO et al. (1994), os hidrolisados protéicos, para uso em dietas especiais, devem apresentar as seguintes características: alto teor de di- e tri-peptídeos; massa molecular média de 500 Da, para controlar a osmolaridade, e não devem conter peptídeos com massa superior a 1000 Da. Desta forma, torna-se interessante a caracterização de perfil peptídico dos hidrolisados com baixo teor de Phe, para tratamento da PKU. Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) tem sido utilizada com êxito na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados com baixo teor de Phe, obtidos a partir de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2004) e de soro de leite pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b).

Os objetivos deste trabalho foram otimizar a extração da proteína do arroz, avaliar a utilização do carvão ativado na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz, obtidos pela ação da pancreatina, e caracterizar o perfil peptídico destes hidrolisados, visando o desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

A pancreatina de pâncreas de suíno (P-1500) e os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O carvão ativado (granulado n.119, 20 a 50 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR). O arroz polido tipo 1 foi obtido no comércio de Belo Horizonte, MG. Os demais reagentes (benzoato de sódio, ácido sulfúrico concentrado, ácido clorídrico concentrado, hidróxido de sódio, sulfato de sódio, sulfato de cobre, óxido de selênio, ácido bórico, éter etílico, ácido fosfórico, fosfato de sódio bibásico, fosfato de sódio monobásico) são de grau analítico.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizado no fracionamento dos hidrolisados protéicos, foi constituído de uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietilaspirtamida)-silica], 250 x 9,4 mm, 5  $\mu\text{m}$  e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico em UV-VIS (série HP 1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software HP Chemstation (Avondale, EUA). O ácido fórmico foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação de Água Aries (Vaponics, EUA). As membranas de celulose usadas na filtração das amostras (0,20  $\mu\text{m}$ ) e dos solventes (0,45  $\mu\text{m}$ ) foram adquiridas da Sartorius (Goettingen, Alemanha).

## MÉTODOS

### 1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ARROZ

Inicialmente, o arroz foi moído (moinho Marconi TE 020 série 870348, Piracicaba, SP). Os teores de umidade, lípidos cinzas totais e proteínas do arroz foram determinados de acordo com os métodos descritos na AOAC (1995). O teor de umidade foi determinado por dessecação em estufa convectiva (Quimis Q-314M242 série 020, Diadema, SP) a 105° C, por 6 h; o teor de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl; os lípidos, por extração com éter etílico (Soxhlet); os minerais, por incineração em mufla a 550° C; e os carboidratos, por diferença. O fator utilizado na conversão do teor de nitrogênio em proteína, no método de micro-Kjeldahl foi 5,95, baseado no teor de nitrogênio da fração glutelina do arroz (16,8 g N/100g de proteína), como sugerido por JULIANO (1993).

### 2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ARROZ

Foi realizada uma extração alcalina para obtenção do extrato protéico bruto de arroz, utilizando-se o método citado por CONNOR et al. (1976). Alguns parâmetros foram testados, de forma a otimizar o rendimento de extração. Assim, a 10 g de arroz moído, foram adicionados 50 mL de água destilada e quantidade suficiente de uma solução de hidróxido de sódio 3 mol/L, até atingir o pH de 9,0 a 12,0. A mistura foi agitada por 15 ou 60 min, em agitador magnético e, então, foi centrifugada em velocidade de 106, 425 ou 2660 x g por 10 min. A fração líquida (Sn1) foi separada e o resíduo sólido foi lavado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. A mistura foi novamente centrifugada por 5 min. A fração líquida obtida (Sn2) foi adicionada ao Sn1, e a fração sólida foi lavada duas vezes com água destilada, recolhendo-se sempre a fração líquida e adicionando-a à fração Sn1. Tanto a fração líquida quanto a sólida foram, então, neutralizadas com solução de ácido clorídrico 3 mol/L, congeladas e liofilizadas. A fração líquida, após liofilização, foi denominada Extrato Protéico de Arroz (EPA). Na Tabela I.1, são apresentados os parâmetros utilizados na extração das proteínas do arroz.

**Tabela I.1 – Parâmetros empregados na extração das proteínas do arroz**

Extrato	pH	Tempo de agitação (min)	Velocidade de centrifugação (x g)
EPA1	9,0	15	2660
EPA2	10,0	15	2660
EPA3	10,0	60	2660
EPA4	12,0	15	2660
EPA5	12,0	60	2660
EPA6	12,0	60	106
EPA7	12,0	60	425

O teor de proteína do EPA obtido foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, para se avaliar o Rendimento da Extração (R%), calculado pela equação:

$$R(\%) = \frac{\% \text{ proteína EPA} \times \text{Massa EPA}}{\% \text{ proteína arroz} \times \text{Massa arroz}} \times 100 \quad (1)$$

sendo:

% proteína EPA corresponde ao teor de proteína no EPA, em g/100g; Massa EPA é a massa do EPA obtido após a liofilização, em g; % proteína arroz é o teor de proteína na amostra inicial de arroz, em g/100g; e Massa arroz é a quantidade de arroz utilizada na extração, em g.

A condição que levou ao maior rendimento de extração foi utilizada para obter o EPA usado no preparo dos hidrolisados enzimáticos.

### 3 PREPARO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ

Foram preparados seis hidrolisados enzimáticos, utilizando-se a pancreatina. A cada uma das soluções de EPA em água (concentrações de 1 a 3 g/100 mL), adicionou-se benzoato de sódio e ajustou-se o pH para 9,0, que manteve-se inalterado até o final da reação. As soluções foram levadas a banho-maria a 25 °C e adicionou-se a enzima em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato desejada (E:S). Após 5 h

de hidrólise, a reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico, suficiente para reduzir o pH para 3. Posteriormente, os hidrolisados foram congelados e liofilizados (Liofilizador Freezone, modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA). As condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela I.2.

**Tabela I.2 – Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de arroz pela ação da pancreatina**

Hidrolisado	Concentração de EPA (g/100 mL)	E:S (%)
H1	1	1
H2	1	2
H3	2	1
H4	2	2
H5	3	1
H6	3	2

E:S = relação enzima:substrato

#### 4 REMOÇÃO DE Phe DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos de arroz pela utilização do carvão ativado, como meio adsorvente. Foi utilizado o procedimento de passagem por coluna, desenvolvido no mesmo laboratório onde se realizou o presente trabalho (SOARES et al., 2003). O carvão foi hidratado com água purificada por 10 min e, em seguida, colocado em seringa descartável de 20 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. Preparou-se uma solução de hidrolisado (0,8 g/100mL), que foi aplicada à coluna, sob pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP), recolhendo-se o eluato.

#### 5 AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE Phe

A avaliação da eficiência de remoção de Phe, pelo carvão ativado, foi realizada pela medida do teor de Phe livre, no EPA e seus hidrolisados (após tratamento com carvão), empregando-se a técnica desenvolvida no mesmo laboratório em que o presente estudo foi realizado (LOPES et al., 2004), baseada na Espectrofotometria Derivada

Segunda (EDS). O teor de Phe livre corresponde à Phe que foi liberada pela hidrólise ácida. Desta forma, as soluções de hidrolisados (0,8 g/100 mL de água purificada), previamente submetidas ao tratamento com carvão ativado, e a solução de EPA (0,2 g/100 g de água purificada), foram colocadas em tubos especiais de hidrólise e evaporadas em Centrivap (Labconco, EUA) até resíduo. Posteriormente, foi realizada a hidrólise ácida, adicionando-se HCl 5,7 mol/L, e colocando-se em estufa a 110 °C por 24 h. Após este tempo, as amostras foram reconstituídas com água purificada para 10 mL, filtradas em papel de filtro qualitativo e o pH foi ajustado para 6,0, com solução de fosfato de sódio bibásico 1,0 mol/L.

Para a determinação do teor de Phe pela EDS, preparou-se, inicialmente, uma curva-padrão de Phe na presença de Tyr e Trp. Para tal, soluções estoque dos aminoácidos aromáticos, Phe, Tyr e Trp, foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0), nas concentrações de  $6,05 \times 10^{-4}$  mol/L;  $5,52 \times 10^{-4}$  mol/L e  $4,90 \times 10^{-4}$  mol/L, respectivamente. Em seguida, pipetou-se 10 mL de cada uma destas soluções para um erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura homogeneizada por agitação. A partir desta solução foram preparadas, por diluições sucessivas, soluções contendo Phe em concentrações variando de 0,067 a  $2,018 \times 10^{-4}$  mol/L. Estas soluções foram, então, submetidas às leituras de absorvância na faixa de 250 a 280 nm em espectrofotômetro (CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra). Os espectros de derivada segunda foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro. Dos quatro picos negativos obtidos, foram utilizados os valores de área e altura do 3º e 4º picos para traçar a curva padrão em função da concentração de Phe.

Para medir o teor de Phe livre nas amostras, traçaram-se os espectros das soluções obtidas após a hidrólise ácida na mesma faixa de comprimento de onda da curva padrão. Posteriormente, traçou-se os espectros de derivada segunda, e levou-se à curva padrão os valores de área ou altura dos picos negativos escolhidos acima, para encontrar a concentração de Phe.

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

$$\% \text{ Remoção de Phe} = \frac{\text{teor de Phe inicial} - \text{teor de Phe final}}{\text{teor de Phe inicial}} \times 100 \quad (2)$$

sendo,

teor de Phe inicial = teor de Phe no extrato protéico de arroz

teor de Phe final = teor de Phe no hidrolisado, após tratamento com carvão.

## **6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ**

A caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados consistiu no fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação.

O fracionamento dos peptídeos foi realizado por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE et al. (1994a). As amostras foram dissolvidas a uma concentração de 1 g/100mL em uma solução de ácido fórmico 0,05 mol/L (pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min. A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45 µm, e degaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 13,5 a 18,0 min (peptídeos grandes, com mais de 7 aminoácidos); F2, de 18,0 a 21,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 aminoácidos); F3, de 21,5 a 22,5 min (di- e tri-peptídeos); e F4, de 22,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados de proteína de arroz. Após a multidetecção das frações a 230, 280 e 300 nm, para se eliminar a interferência da absorção dos aminoácidos aromáticos, calcula-se a ACF. Esta, por sua vez, foi levada a uma curva padrão, para se encontrar a quantidade de peptídeos de cada fração, preparada como descrito em outros trabalhos realizados no mesmo laboratório em que o presente estudo foi desenvolvido (SILVESTRE et al., 1994b; MORATO et al., 2000; LOPES et al., 2004).



## **7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan a 5% de probabilidade, para comparar o rendimento de extração das proteínas do arroz e o teor final de Phe no EPA e nos hidrolisados, após tratamento com carvão ativado. Para se comparar a quantidade dos peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas foi adotado um delineamento fatorial, sendo a médias comparadas pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade. As curvas padrão foram obtidas por análise de regressão (PIMENTEL-GOMES, 2000).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ARROZ**

Na Tabela I.3, são mostrados os teores dos principais componentes do arroz polido utilizado no presente trabalho. Pode-se observar que os valores encontrados para proteínas e carboidratos estão próximos aos citados em bases de dados oficiais, como USDA (2004) e USP (2005), e aos relatados por JULIANO (1993). Quanto aos teores de lípidos e cinzas totais, os valores encontrados se aproximam de alguns (USP, 2005, para lípidos; USDA, 2004 e JULIANO, 1993, para cinzas totais) e se diferenciam de outros (USDA, 2004 e JULIANO, 1993, para lípidos; USP, 2005, para cinzas totais) citados na literatura consultada. Isto pode ser explicado pelo fato de que os fatores ambientais afetam a composição do grão de arroz. Os métodos empregados na determinação destes componentes podem, também, influenciar nos resultados obtidos, embora não tenham sido mencionados na literatura consultada. Segundo JULIANO (1993), o teor de proteína tende a aumentar devido à aplicação de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. Além disso, vários outros fatores contribuem para aumentar o teor de proteína, como curto período de crescimento, condições climáticas, alta salinidade ou alcalinidade do solo, temperaturas muito elevadas ou muito baixas e presença de doenças ou pragas. De acordo com esse mesmo autor, um aumento no teor de proteína essencialmente acompanha uma redução no teor de carboidratos.

**Tabela I.3 – Composição química do arroz polido, cru, em g/100g**

Nutrientes	Valores obtidos <sup>1</sup>	USDA <sup>2</sup>	USP <sup>3</sup>	JULIANO <sup>4</sup>
Umidade	12,52	11,62	12,33	-
Proteína	8,05	7,13	6,73	6,3-7,1
Lípides	1,05	0,66	0,89	0,3-0,5
Cinzas totais	0,65	0,64	0,48	0,3-0,8
Carboidratos	77,73	79,95	79,57	77-89

1. valores obtidos no presente trabalho

2. USDA (2004)

3. USP (2005)

4. JULIANO (1993)

## 2 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ARROZ

Pode-se observar na Tabela I.4 que, dependendo da condição, o método empregado foi eficiente na extração das proteínas do arroz. O maior rendimento (84,74%) foi obtido em pH 12,0, após 60 min de agitação e centrifugação de 425 x g.

**Tabela I.4 – Teores de proteína e Rendimentos de Extração, para as diferentes condições de extração**

Extrato	Massa (g)	Teor de Proteína (g/100g)	Rendimento de Extração (%)
EPA1	0,75	69,58	61,3 <sup>d</sup>
EPA2	0,75	63,37	58,7 <sup>d</sup>
EPA3	0,75	62,83	58,2 <sup>d</sup>
EPA4	0,88	59,77	65,0 <sup>c</sup>
EPA5	1,05	60,33	78,3 <sup>b</sup>
EPA6	1,48	19,63	35,9 <sup>e</sup>
EPA7	0,88	77,92	84,7 <sup>a</sup>

EPA = extrato protéico de arroz. Os resultados representam médias de triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

O efeito do pH sobre o rendimento de extração pode ser, também, observado na Tabela I.4. Assim, o aumento do pH de 9,0 (EPA1) para 10,0 (EPA2) não afetou o rendimento de extração, o qual elevou-se ao passar do pH 10,0 para 12,0 (EPA4).

Quanto à influência do tempo de agitação, observa-se que foi ausente no pH 10,0, enquanto que em pH 12,0 o emprego de 60 min (EPA5) produziu maior rendimento de extração do que o obtido com 15 min de agitação (EPA4).

A velocidade de centrifugação também afetou o rendimento de extração, tendo o mesmo sido aumentado ao se passar de 106 x g (EPA6) para 425 x g (EPA7) e diminuído com o emprego de 2660 x g (EPA5). Uma hipótese para o fato de que a velocidade de 425 x g tenha sido mais eficiente que a de 2660 x g (84,7 e 78,3% de extração, respectivamente), seria a de que, na alta velocidade mais alta, parte do amido disperso na fase líquida pode ter precipitado, carreando consigo algumas proteínas.

Não foram encontrados na literatura dados referentes ao teor de proteínas de extratos protéicos de arroz. Entretanto, vários autores relataram resultados referentes à extração alcalina de proteínas do farelo de arroz. CONNOR et al. (1976) obtiveram um concentrado protéico contendo de 23 a 31% de proteína, a partir do farelo de arroz. Este resultado foi inferior ao obtido para o EPA1, para o qual foram utilizadas condições semelhantes de extração. Já LINDSAY et al. (1977), utilizando a mesma matéria-prima e condições semelhantes, obtiveram produtos com teores de proteína variando de 19,44 a 54,00%, o que se aproxima mais do resultado encontrado no presente estudo.

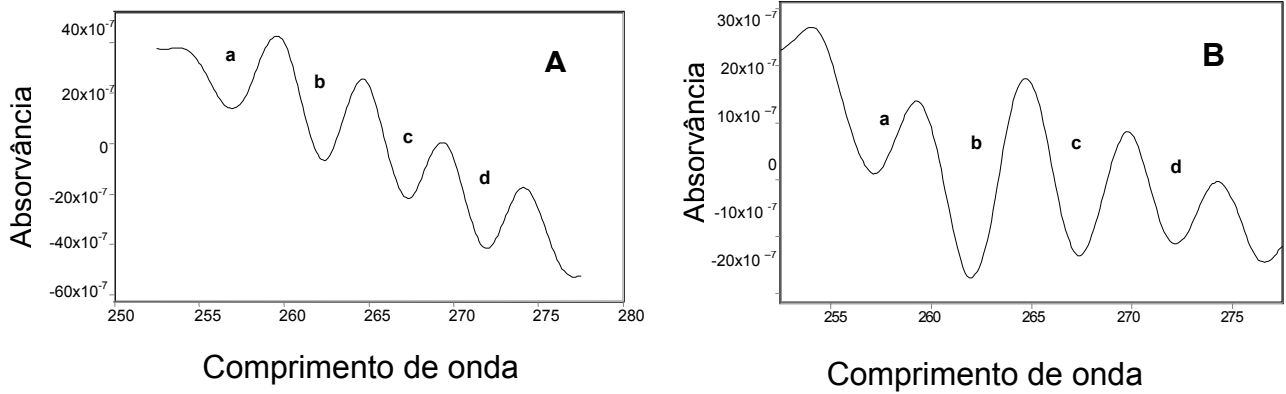
Quanto ao Rendimento de Extração, cerca de 65% das proteínas do farelo de arroz foram extraídas em pH 9,0 com 15 min de agitação, segundo LINDSAY et al. (1977), resultado semelhante ao obtido para o EPA1 (61,32%), que utiliza as mesmas condições. TANG et al. (2002) obtiveram rendimentos de extração de 56,2 a 66,6%, utilizando processamentos físicos e enzimáticos na extração da proteína do farelo de arroz. Estes resultados são inferiores aos obtidos neste trabalho, o que sugere que a extração alcalina é mais eficiente no que se refere à quantidade de proteína extraída.

Em alguns trabalhos encontrados na literatura, a extração da proteína foi feita visando a obtenção do amido do arroz (LUMDUBWONG & SEIB, 2000; WANG & WANG, 2004). Nestes trabalhos, os resultados do rendimento da extração protéica não foram apresentados, porém o amido obtido por WANG & WANG (2004), por meio da extração alcalina, apresentou um teor de proteínas significativamente inferior ao obtido com o uso de proteases, sugerindo que o uso de solução alcalina foi mais eficiente na remoção das proteínas do arroz.

### 3 ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA SEGUNDA: CURVA PADRÃO E ESPECTROS

A curva padrão de Phe escolhida, obtida por meio da EDS, refere-se à que foi traçada empregando-se a área de pico “c” (Figura I.1), pois esta apresentou o maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) quando comparada à altura. Constatou-se, também, que a regressão linear para Phe foi significativa ( $p < 0,01$ ). As equações da reta e os coeficientes de determinação obtidos foram os seguintes:  $y = 3,0077x + 0,7587$  e  $R^2 = 0,9576$ . Outros autores também relataram resultados semelhantes ao relacionarem a área e/ou altura do pico de absorção de Phe, em presença de Tyr e Trp, com a concentração de Phe (ZHAO et al., 1996; ICHIKAWA & TERADA, 1977). O mesmo foi descrito em trabalhos anteriores desenvolvidos no mesmo laboratório do presente trabalho (SOARES et al., 2004; LOPES et al., 2004; DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; MORAIS et al., 2005; DELVIVO et al., 2005a,b). No entanto, alguns autores encontraram números de picos negativos diferentes aos deste estudo, no espectro da Phe (ICHIKAWA & TERADA, 1977; MICLO, 1995). Segundo LEVILLAIN & FOMPEYDIE (1986), esta variação no espectro da Phe poderia estar associada às diferenças nas formas utilizadas do aminoácido padrão (livre ou N-acetil-éster), na aparelhagem empregada, em especial o espectrofotômetro e o software, como também no tipo de solvente e os valores de pH.

Observa-se, ainda, na Figura I.1 que o espectro do hidrolisado H5 assemelha-se ao da Phe, com picos negativos situados em comprimentos de onda similares. ICHIKAWA & TERADA (1979) também relataram esta semelhança entre os espectros de aminoácidos padrões e o de proteína, ao empregar a EDS para determinar a quantidade de resíduos de Phe em diversas proteínas desnaturadas ou nativas. Resultados similares já haviam sido obtidos no mesmo laboratório onde foi realizado o presente trabalho, ao estudar os espectros de absorvância e o de derivada segunda de hidrolisados de enzimáticos de caseína (MORAIS et al., 2005), de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2004; SOARES et al., 2004) e de soro de leite em pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b).



**Figura I.1- Espectros de derivada segunda.** (A) da Phe em pH 6,0, na presença de Tyr e de Trp; (B) do hidrolisado H5 em pH 6,0.

#### 4 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE Phe

O uso do carvão ativado foi eficiente na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz obtidos pela ação da pancreatina, conforme mostrado na Tabela I.5. O percentual de remoção variou de 84 a 100%, e o teor final de Phe nos hidrolisados foi de 0 a 95,00 mg de Phe/100 g de hidrolisado. O teor inicial de Phe no EPA era de 611,9 mg de Phe/100 g de extrato. Os resultados foram apresentados em termos de teor final de Phe (em mg de Phe/100 de hidrolisado) e porcentagem de remoção de Phe, sendo a primeira forma a mais indicada 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).

Acrescenta-se, ainda, que, numa formulação dietética para fenilcetonúricos contendo apenas hidrolisado protéico de arroz, o teor de Phe por 100 g de produto variaria de 0,00 a 95,00 mg. Considerando que, de maneira geral, as formulações dietéticas contêm 25% de proteína que, nesse caso, seriam fornecidas pelo hidrolisado protéico de arroz (60% de proteína), o teor de Phe por 100 g do produto cairia para 0,00 a 39,58 mg. No caso de reconstituição do arroz por meio da reincorporação do hidrolisado protéico ao amido previamente separado, o teor de Phe estaria na faixa de 0,00 a 12,67 mg por 100 g do produto. Portanto, em qualquer um dos três casos citados acima, o teor de Phe estaria bem abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira

(BRASIL, 2002), que é de 0,1 g de Phe por 100 g de produto, em formulações para fenilcetonúricos, mesmo empregando o hidrolisado protéico com menor remoção de Phe.

Anteriormente, resultados semelhantes (75 a 99% de remoção) foram obtidos no mesmo laboratório em que este trabalho foi desenvolvido, utilizando-se carvão ativado para remover a Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2004; SOARES et al., 2004) e de soro de leite em pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b). Outros autores também relataram resultados de remoção de Phe próximos aos obtidos neste trabalho, utilizando carvão ativado. Assim, níveis de remoção de 97% foram relatados por KITAWAGA et al. (1987) em hidrolisados de proteínas do soro de leite obtidos pela ação da actinase. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) conseguiram remover 92% da Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio obtidos pela ação da papaína e de uma protease do *Aspergillus oryzae*. MOSZCZYNSKY & IDZIAC (1993) empregaram uma mistura de três enzimas (carboxipeptidase A, aminopeptidase e quimotripsina) na hidrólise de caseína, obtendo, após tratamento com carvão, cerca de 90% de remoção de Phe.

Por outro lado, COGAN et al. (1981) relataram resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho (36% de remoção), ao utilizar a enzima Rhozima 62 na produção de hidrolisados de caseína. Este resultado pode ser devido ao tipo de enzima utilizada na hidrólise e à menor proporção de carvão para remoção de Phe (0,5 g de carvão/g de proteína, contra 88,5 g de carvão/g de proteína, utilizados no presente trabalho). Não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando a proteína do arroz na produção de hidrolisados com baixo teor de Phe.

Um das grandes vantagens do atual trabalho em relação aos de outros autores, refere-se à possível otimização do processo dos pontos de vista tecnológico e econômico, uma vez que resultados favoráveis à remoção de Phe foram obtidos com o emprego de apenas uma enzima de preço acessível (US\$65.80/kg, SIGMA-ALDRICH, 2004), com tempo inferior e menores quantidades de carvão e relação E:S.

**Tabela I.5 – Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de arroz, obtidos pela ação da pancreatina**

Hidrolisados	Teor final de Phe (mg Phe/100g de hidrolisado)	Remoção de Phe (%)
H1	95,00 <sup>a</sup>	84
H2	78,35 <sup>b</sup>	87
H3	63,53 <sup>c</sup>	90
H4	8,12 <sup>e</sup>	99
H5	32,03 <sup>d</sup>	95
H6	0,00 <sup>e</sup>	100

Teor final de Phe = teor de Phe dos hidrolisados, após tratamento com carvão ativado e hidrólise ácida. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

## 5 EFEITO DOS PARÂMETROS HIDROLÍTICOS SOBRE A REMOÇÃO DE Phe

Os parâmetros analisados referem-se à concentração inicial de extrato protéico e à relação enzima:substrato.

O efeito da concentração do substrato protéico (EPA) pode ser avaliado, comparando-se os resultados obtidos para os hidrolisados H1, H3 e H5, ou H2, H4 e H6 (Tabela I.2). Observa-se que o aumento da concentração de EPA, de 1 g/100 mL (0,78 g de proteína /100 mL) para 2 g/100 mL (1,56 g de proteína /100 mL) e para 3 g/100 mL (2,34 g de proteína/100 mL) foi benéfico, uma vez que levou a uma redução no teor final de Phe (Tabela I.5). Poderia-se inferir que este aumento na concentração protéica levou a uma maior probabilidade da enzima entrar em contato com o substrato. No entanto, o efeito da hidrólise enzimática na remoção de Phe é muito complexo, como será visto adiante.

Na avaliação da influência da relação E:S podem ser comparados os resultados obtidos para os hidrolisados H1 com H2, H3 com H4 e H5 com H6 (Tabela I.2). Em todos os três casos, observa-se na Tabela I.5 que o aumento de duas vezes na E:S foi vantajoso para a remoção de Phe, tendo reduzido significativamente o seu teor final.

Vários trabalhos foram realizados no mesmo laboratório em que o presente estudo foi desenvolvido visando avaliar o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe. No

primeiro trabalho, foi mostrado que na associação de uma protease do *Aspergillus oryzae* com a papaína, para hidrolisar leite em pó desnatado, o aumento de dez vezes na relação E:S das duas enzimas (de 1 para 10% e de 2 para 20 %, respectivamente) foi prejudicial para a remoção de Phe, tendo aumentado significativamente o seu teor final de 0,060 para 0,231 mg/ 100 mg de proteína (LOPES et al., 2004). Por outro lado, na associação de uma protease do *Aspergillus oryzae* com pepsina, para hidrolisar essa mesma fonte protéica, esse mesmo aumento na relação E:S das duas enzimas não afetou a remoção de Phe (SOARES et al., 2004). Empregando-se a pancreatina e a papaína para hidrolisar o soro de leite, o aumento da relação E:S de 0,01% para 0,1% e de 0,1% para 1,0%, mostraram resultados variados sobre a remoção de Phe, sendo benéfico, prejudicial ou sem efeito, dependendo da temperatura da reação hidrolítica e do emprego ou não da ultrafiltração (DELVIVO et al., 2005a,b). Em outro trabalho realizado no mesmo laboratório, a pancreatina foi imobilizada em alumina e carvão ativado para hidrolisar o soro de leite. Nesse caso, passando-se a relação E:S de 0,01 para 1% houve uma redução no teor final de Phe, e de 1% para 2% não foi observada qualquer alteração (SILVA et al., 2004). No caso de ter empregado a papaína nessas mesmas condições, o aumento da relação E:S não teve efeito sobre a remoção de Phe (DE MARCO, 2004).

Apesar de se esperar que o aumento da relação E:S levaria sempre a um maior grau de hidrólise e, conseqüentemente, a uma liberação de Phe mais pronunciada, facilitando a sua remoção, o conjunto de todos esses resultados indica que, na prática, esse procedimento é mais complexo do que o teoricamente esperado, e o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe depende de diversos fatores, tais como o tipo e concentração de enzima e de substrato e a temperatura da reação hidrolítica.

## **6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ**

Os hidrolisados que apresentaram o menor teor final de Phe (H4, H5 e H6) foram analisados quanto à distribuição de peptídeos e aminoácidos livres.

Os teores de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas estão apresentados na Tabela I.6.



**Tabela I.6 – Teores de peptídeos e de aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos de arroz**

Frações cromatográficas	Hidrolisados		
	H4	H5	H6
Grandes peptídeos (> 7 aminoácidos)	32 <sup>b/1</sup>	33 <sup>a/1</sup>	25 <sup>b/2</sup>
Peptídeos médios (4 a 7 aminoácidos)	47 <sup>a/1</sup>	19 <sup>b/3</sup>	28 <sup>a/2</sup>
Di- e tri-peptídeos	16 <sup>c/2</sup>	15 <sup>c/2</sup>	22 <sup>c/1</sup>
Aminoácidos livres	6 <sup>d/3</sup>	33 <sup>a/1</sup>	24 <sup>b,c/2</sup>

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

Observa-se que, do ponto de vista nutricional, o perfil peptídico do hidrolisado H4 foi superior aos dos demais, por ter apresentado maior teor de oligopeptídeos (F2 + F3 = 63%) e menor teor de aminoácidos livres (F4 = 6%). Comparando-se os resultados de H4 com H6, pode-se concluir que o emprego de uma menor concentração inicial de EPA foi vantajoso para a distribuição dos peptídeos, uma vez que o perfil de H4 (2 g de EPA/100 mL) foi melhor que o de H6 (3 de EPA/100 mL), com relação aos teores de oligopeptídeos e de aminoácidos livres. Pelo mesmo motivo, os dados da Tabela I.6 revelam, ainda, que o aumento da E:S de 1% (H5) para 2% (H6) também foi benéfico para o perfil peptídico. Ressalta-se, ainda, que não foram encontrados na literatura dados sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de arroz.

## CONCLUSÕES

O uso de solução alcalina foi eficiente para a extração das proteínas do arroz, tendo atingido um rendimento de cerca de 85%. O carvão ativado foi eficiente para a remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz obtidos pela ação da pancreatina, tendo eliminado até 100% deste aminoácido. Os teores finais de Phe de todos os hidrolisados foram inferiores a 0,1 g/100 g, possibilitando seu uso no preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos. A concentração protéica inicial e a relação

E:S influenciaram na remoção de Phe e os melhores resultados foram obtidos para valores de 2,34 g/100 mL e 2%, respectivamente. O melhor perfil peptídico foi obtido com uma E:S de 2% e uma concentração protéica inicial de 1,56 g/100 mL.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S.; MARRIAGE, B.; MANTIA, C.; GAFFIELD, B.; PORTERFIELD, M.; HUNT, M.; MCMASTER, N.; BERNSTEIN, L.; PARTON, P.; KUEHN, M.; LEWIS, V. Nutrient intake and grow of infants with phenylketonuria undergoing therapy. *J. Ped. Gastr. Nutr.* n.27, p.287-291, 1998.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dez. 2003, p. 33.
- AOAC (Association Of Official Agricultural Chemists). *Official methods of analysis of AOAC International*. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2 v.
- AUBES-DUFAU, I., SERIS, J-L., COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, n. 8, p.1982-1988, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 nov. 2002, p. 83.
- BLAU, N.; ERLANDSEN, H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol. Gen. Metab.*, v. 82, n. 2, p. 101-111, 2004.
- BOZA, J.J.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O; GIL, A. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, n. 4, p. 872-875, 1995.
- BRANDTS, J.F. and KAPLAN, L.J. Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, v. 12. n. 10, p. 2011-2024, 1973.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivative analysis of UV / visible spectra. *American Laboratory*, v. 12, p. 101-112, 1980.
- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.22, n.3, 229-232, 2002.
- COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food and Agric.*, v.32, n. 5, p.459-466, 1981.

- CONNOR, M.A.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. *Cereal Chemistry*, v. 53, n. 4, p. 488-496, 1976.
- DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso de carvão ativado e de amberlite xad-4 para remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina. *Tecno-Lógica*, 2005a (No prelo).
- DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; FIGUEIREDO, A.F.S.; DE AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE M.P.C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 2005b (submetido para publicação).
- DE MARCO, L.M. *Uso da papaína imobilizada em carvão ativado e em alumina no preparo de formulações sintéticas para fenilcetonúricos, à base de soro de leite*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 99 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- FAO (Food and Agriculture Organization) *Food Balance Sheet 2002*. Rome: FAO, 2002. [s.p.].
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular – weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRANT, A and BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *Journal of Chromatography*, v. 347, p. 219-235, 1985.
- GRIMBLE, G.K. & SILK, D.B.A. Peptides in human nutrition. *Nutr. Research Rev.*, v. 2, p. 87-108, 1989.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v.71, p.65-9, 1986.
- ICHIKAWA,T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 2, p. 438-444, 1981a.
- ICHIKAWA,T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochimica et Biophysic. Acta*, v. 671, n. 1, p. 33-37, 1981b.
- ICHIKAWA,T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 580, n. 1, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA,T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 494, n. 1, p. 267-270, 1977.
- IRRI (International Rice Research Institute). *World rice statistics, 2001*. Manila: IRRI, 2001. [s.p.].
- JULIANO, B.O. *Rice in human nutrition*. Rome: FAO, 1993. 168 p.
- KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S., SOARES, R.D.L., REIS, D.G. *Receitas especiais para fenilcetonúria*. Editora Folium, Belo Horizonte, 2001.

- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. SILK, D.B. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v.26, n. 9, p.907-913, 1985.
- KIM, W.; ERLANDSEN, H.; SURENDRAN, S.; STEVENS, R.C.; GAMEZ, <sup>a</sup>; MICHOLSMATALOM, K.; TYRING, S.K.; MATALON, R. Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Mol. Ther.*, v. 10, n. 2, p. 220-224, 2004.
- 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. *Enzyme*, v. 38, n. 1-4, p. 321 - 327, 1987.
- LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrométrie dérivée: intérêt, limites et applications. *Analysis*, v. 14, n. 1, p. 1-20, 1986.
- LEVY, H. L. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, n. 5, p. 1811-1813, 1999.
- LINDSAY, G.W.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Protein concentrates from wheat shorts, rice bran, and soy flour by extraction with cheese wheys. *Journal of Food Science*, v. 42, n. 5, p. 1365-1369, 1977.
- LOPES, D.C.F; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Science and Technology*, 2004 (In press).
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A . Enzymatic production of a low-phenilalanine product from skim milk powder and caseinate. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 4, p. 938-942, 1991.
- LUMDUBWONG, N.; SEIB, P.A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour. *Journal of Cereal Science*, v. 31, n. 1, p. 63-74, 2000.
- MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA K. Derivative absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal. Biochem.*, v. 65, n. 1-2, p. 362-368, 1975.
- MIRA, N.V.M. e MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Revista Saúde Pública*, v . 34, n. 1, p . 86 - 96, 2000.
- MICLO, I.; PERRIN, E.; DRIOU, A.; MELLET, M.; LINDEN, G. Determination of the ratios of the aromatic amino acids residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.*, v. 46, n. 2, p. 186-192, 1995.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- MORAIS, H. A; DE MARCO, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria*, 2005. (In press).
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 29, n. 3, p. 302-306, 1993.
- O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, n. 9, 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, Helsink, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.*
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477 p.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v . 35, n. 10, p. 753 - 761, 1998.
- SARKISSIAN, C.N.; SHAO, Z.; BLAIN, F.; PEEVER, R.; SU, H.; HEFT, R.; CHANG, T.M.; SCRIVER, C.R. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, n. 5, p. 2339-2344, 1999.
- SHEN, J.L. Soy protein solubility: the effect of experimental conditions on the solubility of soy protein isolates. *Cereal Chem.*, v. 53, n. 6, p. 902-909, 1976.
- 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.*
- SIGMA-ALDRICH. Bioquímicos e reagentes: para pesquisa de ciências da vida. São Paulo, 2004, 2944 p.
- SILVA, V.D.M. *Uso da pancreatina imobilizada em carvão ativado e em alumina no preparo de formulações sirtéticas para fenilcetonúricos, à base de soro de leite*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 119 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SILVESTRE, M.P.C., DAUPHIN, C., HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta*. 282, 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 hidrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994b.
- SOARES, R.L.D.; DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L.M.; AGUIAR, M.J.B.; JUNQUEIRA, R.G.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego do carvão ativado para a remoção de fenilalanina de leite em pó. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 22, n.1, p. 65-84, 2004.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 3. ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1988.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, N.S.; SHELLHAMMER, T.H. Protein extraction from heat-stabilized rice bran 1 – Physical processing and enzyme treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 7444-7448, 2002.
- USDA (United States Department of Agriculture). Nutrients database for standard reference: Rice, white, long grain, regular, raw, unenriched. Reference, Release 17, 2004. Disponível em: <[http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl)> . Acesso em 10 jan 2005.

- USP (Universidade do Estado de São Paulo). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2005. Disponível em <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>> . Acesso em 10 jan 2005.
- WANG, L.; WANG, Y.J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, v. 39, n. 2, p. 291-296, 2004.
- ZHAO, Q.; SANNIER, F.; GARREAU, I.; LECOEUR, C.; PIOT, J.M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides: application to hemorphins. *J. Chromatogr. A*, v. 723, n. 1, p. 35-41, 1996.

## Capítulo II

# HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA, OBTIDOS PELA AÇÃO DA COROLASE PP E USO DO CARVÃO ATIVADO

## RESUMO

Diferentes condições foram testadas para a extração das proteínas do arroz em meio alcalino. A partir do extrato obtido, empregou-se a corolase PP no preparo de seis hidrolisados enzimáticos de arroz, visando o desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos. O procedimento de passagem por coluna contendo carvão ativado foi utilizado na remoção de fenilalanina dos hidrolisados. O teor de Phe no extrato protéico de arroz e seus hidrolisados, após tratamento com carvão foi determinado por espectrofotometria derivada segunda. O teor final de fenilalanina nos hidrolisados variou de 0,39 a 68,34 mg/100 g, o que corresponde a uma remoção de 84 a 100%. A distribuição dos peptídeos nas amostras, de acordo com o tamanho da cadeia, foi estudada como um dos critérios para a avaliação da qualidade nutricional dos hidrolisados. Os resultados indicaram que o maior teor de oligopeptídeos foi obtido quando se empregou a corolase PP em uma relação E:S de 1%, e uma concentração protéica inicial de 1,56 g/100 mL.

**Palavras-chave:** arroz, corolase PP, carvão ativado, hidrólise enzimática, remoção de fenilalanina, suplemento dietético.

## ABSTRACT

**RICE PROTEIN HYDROLYSATES WITH LOW PHENYLALANINE CONTENT, PREPARED BY THE ACTION OF COROLASE PP AND THE USE OF ACTIVATED CARBON.** Different conditions were tested for the extraction of rice proteins by an alkaline process. Corolase PP was used for preparing six enzymatic rice hydrolysates, with the aim of producing dietary formulations for phenylketonuria treatment. A column containing activated carbon was used for removing phenylalanine (Phe). The Phe contents of rice protein extract and hydrolysates were determined by second derivative spectrophotometry. The final Phe content of the hydrolysates varied from 0.39 to 68.34 mg/100 g, corresponding to removal levels from 84% to 100%. The distribution of peptides according to their size was used as an approach for nutritionally evaluating the hydrolysates. The results indicated that the best oligopeptide content was obtained when corolase PP was used with an enzyme:substrate ratio of 1% and the initial protein concentration of 1,56 g/100 mL.

**Keywords:** rice, corolase PP, activated carbon, enzymatic hydrolysis, phenylalanine removal, dietary supplement.



## INTRODUÇÃO

Os hidrolisados protéicos apresentam diversas vantagens funcionais e nutricionais em relação às proteínas integrais. Em geral, esses preparados enzimáticos possuem menor imunogenicidade que a de proteínas e de peptídeos de elevado peso molecular (TAKASE et al., 1979). Além disso, vários estudos demonstram que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos são utilizadas mais efetivamente quando comparadas a uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (HARA et al., 1984; FRØKJAER, 1994; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994)

Os hidrolisados protéicos são muito utilizados, em diversos países, na alimentação de pessoas que apresentam dificuldades na absorção de proteínas, como idosos, crianças com diarreia e portadores de fibrose cística (SMITHERS & BRADFORD, 1991; AUBES-DUFAU et al., 1995), e indivíduos com necessidade aumentada de proteínas, como os atletas (FRØKJAER, 1994). A utilização dos hidrolisados também pode ser benéfica para pacientes que apresentam desordens no metabolismo de aminoácidos, como a fenilcetonúria (CLEMENTE, 2000). Esta é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepática fenilalanina-hidroxilase, que converte a fenilalanina (Phe) em tirosina (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; TRAHMS, 1998; MARTINS et al., 1993; OUTINEN et al., 1996; PIETZ et al., 1999; SHIMAMURA et al., 1999).

As proteases são as enzimas empregadas no preparo desses hidrolisados. Nesse trabalho, utilizou-se a corolase PP, um complexo enzimático proteolítico obtido do pâncreas suíno, que além de possuir atividade de endo-proteinase, apresenta também amino- e carboxipeptidases. A corolase PP apresenta melhor atividade em pH neutro ou levemente alcalino, e temperatura ótima entre 40 e 50 °C (AB ENZYMES, 2001).

O tratamento da fenilcetonúria é essencialmente dietético e baseia-se na restrição da ingestão de Phe, de forma que o paciente deve evitar o consumo de alimentos ricos em proteínas. Torna-se necessário, portanto, o uso de formulações constituídas por misturas de aminoácidos livres ou hidrolisados protéicos, isentos ou com baixos teores de Phe, de forma a suprir as necessidades protéicas e garantir o crescimento e desenvolvimento normais destes indivíduos (MIRA & MÁRQUEZ, 2000).

Os hidrolisados protéicos com teor reduzido de Phe são preparados a partir da ação de uma protease, que expõe a Phe, permitindo sua remoção por um meio adsorvente (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al.,

1999). O teor de Phe residual deve, então, ser quantificado, por métodos como análise de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa (ALAIZ et al., 1992), cromatografia de fase delgada (HEATHCOTE & HAWORTH, 1969), detecção por sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999), espectrofotometria derivada segunda (EDS) (BRANDTS & KAPLAN, 1973; MATSUSHIMA et al., 1975; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a,b; O'HAVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1998) e cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), método desenvolvido no mesmo laboratório no qual presente estudo foi realizado (CARREIRA et al., 2002). A EDS foi utilizada com êxito em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório em que foi feito o presente estudo, na determinação do grau de hidrólise de hidrolisados protéicos (SILVESTRE et al., 1993), na caracterização de aminoácidos aromáticos, avaliação do grau de exposição de Phe e determinação da taxa de encapsulamento de hidrolisados protéicos (MORAIS et al., 2005) e na avaliação da remoção de Phe de hidrolisados de leite em pó desnatado (SOARES et al., 2004; LOPES et al., 2004) e de soro de leite em pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b).

Levando-se em conta a posição relevante que o arroz ocupa na dieta do brasileiro, seria interessante a sua utilização como matéria-prima para o desenvolvimento de hidrolisados com baixo teor de Phe. Cerca de 12,3 % da energia e 9,2 % da proteína ingeridos na dieta média do brasileiro são fornecidos pelo arroz e o consumo *per capita* de arroz no Brasil foi de 36,3 kg/habitante no ano de 2001 (FAO, 2002; IRRI, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) tem sido utilizada com êxito na caracterização de perfil peptídico de hidrolisados, em estudos desenvolvidos no mesmo laboratório onde realizou-se o este trabalho (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2002; SOARES et al., 2004; LOPES et al., 2004; DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; MORAIS et al., 2005; DELVIVO et al., 2005a,b). É interessante que se conheça o perfil peptídico de hidrolisados protéicos para uso em dietas especiais pois, segundo GONZÁLEZ-TELLO (1994), eles devem apresentar as seguintes características: alto teor de di- e tri-peptídeos, massa molecular média de 500 Da e não conter peptídeos maiores que 1000 Da.

Os objetivos deste trabalho foram otimizar a extração da proteína do arroz, avaliar a utilização do carvão ativado na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz, obtidos pela ação da corolase PP, e caracterizar o perfil peptídico destes hidrolisados, visando o desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

A corolase PP foi adquirida da AB Enzymes (Darmstadt, Alemanha). e os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O carvão ativado (granulado n.119, 20 a 50 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR). O arroz polido tipo 1 foi obtido no comércio de Belo Horizonte, MG. Os demais reagentes (benzoato de sódio, ácido sulfúrico concentrado, ácido clorídrico concentrado, hidróxido de sódio, sulfato de sódio, sulfato de cobre, óxido de selênio, ácido bórico, éter etílico, ácido fosfórico, fosfato de sódio bibásico, fosfato de sódio monobásico) foram de grau analítico.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizado no fracionamento dos hidrolisados protéicos, foi constituído de uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietilaspirtamida)-silica], 250 x 9,4 mm, 5  $\mu\text{m}$  e 200 Å (PolyIC, Columbia, MD), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico em UV-VIS (série HP 1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software HP Chemstation (Avondale, EUA). O ácido fórmico foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação de Água Aries (Vaponics, EUA). As membranas de celulose usadas na filtração das amostras (0,20  $\mu\text{m}$ ) e dos solventes (0,45  $\mu\text{m}$ ) foram adquiridas da Sartorius (Goettingen, Alemanha).

### MÉTODOS

#### 1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ARROZ

Inicialmente, o arroz foi moído (moinho Marconi TE 020 série 870348, Piracicaba, SP). Os teores de umidade, lípidos cinzas totais e proteínas do arroz foram determinados de acordo com os métodos descritos na AOAC (1995). O teor de umidade foi determinado por dessecação em estufa convectiva (Quimis Q-314M242 série 020, Diadema, SP) a 105° C, por 6 h; o teor de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl; os lípidos, por extração com éter etílico (Soxhlet); os minerais, por incineração em mufla a 550° C; e os

carboidratos, por diferença. O fator utilizado na conversão do teor de nitrogênio em proteína, no método de micro-Kjeldahl foi 5,95, baseado no teor de nitrogênio da fração glutelina do arroz (16,8 g N/100g de proteína), como sugerido por JULIANO (1993).

## 2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ARROZ

Foi realizada uma extração alcalina para obtenção do extrato protéico bruto de arroz, utilizando-se o método citado por CONNOR et al. (1976). Alguns parâmetros foram testados, de forma a otimizar o rendimento de extração. Assim, a 10 g de arroz moído, foram adicionados 50 mL de água destilada e quantidade suficiente de uma solução de hidróxido de sódio 3 mol/L, até atingir o pH de 9,0 a 12,0. A mistura foi agitada por 15 ou 60 min, em agitador magnético e, então, foi centrifugada em velocidade de 106, 425 ou 2660 x g por 10 min. A fração líquida (Sn1) foi separada e o resíduo sólido foi lavado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. A mistura foi novamente centrifugada por 5 min. A fração líquida obtida (Sn2) foi adicionada ao Sn1, e a fração sólida foi lavada duas vezes com água destilada, recolhendo-se sempre a fração líquida e adicionando-a à fração Sn1. Tanto a fração líquida quanto a sólida foram, então, neutralizadas com solução de ácido clorídrico 3 mol/L, congeladas e liofilizadas. À fração líquida, após liofilização foi denominada Extrato Protéico de Arroz (EPA). Na Tabela II.1, são apresentados os parâmetros utilizados na extração das proteínas do arroz.

**Tabela II.1 – Parâmetros empregados na extração das proteínas do arroz**

Extrato	pH	Tempo de agitação (min)	Velocidade de centrifugação (x g)
EPA1	9,0	15	2660
EPA2	10,0	15	2660
EPA3	10,0	60	2660
EPA4	12,0	15	2660
EPA5	12,0	60	2660
EPA6	12,0	60	106
EPA7	12,0	60	425

O teor de proteína do EPA obtido foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, para se avaliar o Rendimento da Extração (R%), calculado pela equação:

$$R(\%) = \frac{\% \text{ proteína EPA} \times \text{Massa EPA}}{\% \text{ proteína arroz} \times \text{Massa arroz}} \times 100 \quad (1)$$

sendo:

% proteína EPA corresponde ao teor de proteína no EPA, em g/100g; Massa EPA é a massa do EPA obtido após a liofilização, em g; % proteína arroz é o teor de proteína na amostra inicial de arroz, em g/ 100g; e Massa arroz é a quantidade de arroz utilizada na extração, em g.

A condição que levou ao maior rendimento de extração foi utilizada para obter o EPA usado no preparo dos hidrolisados enzimáticos.

### **3 PREPARO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ**

Foram preparados seis hidrolisados enzimáticos, utilizando-se a corolase PP. A cada uma das soluções de EPA em água (concentrações de 1 a 3 g/100 mL), adicionou-se benzoato de sódio e ajustou-se o pH para 9,0, que manteve-se inalterado até o final da reação. As soluções foram levadas a banho-maria a 25 °C e adicionou-se a enzima em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato desejada (E:S). Após 5 h de hidrólise, a reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico, suficiente para reduzir o pH para 3. Posteriormente, os hidrolisados foram congelados e liofilizados (Liofilizador Freezone, modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA). As condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela II.2.

**Tabela II.2 – Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de arroz pela ação da corolase PP**

Hidrolisado	Concentração de EPA (g/100 mL)	E:S (%)
H1	1	1
H2	1	2
H3	2	1
H4	2	2
H5	3	1
H6	3	2

E:S = relação enzima:substrato

#### **4 REMOÇÃO DE Phe DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ**

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos de arroz pela utilização do carvão ativado, como meio adsorvente. Foi utilizado o procedimento de passagem por coluna, desenvolvido no mesmo laboratório onde se realizou o presente trabalho (SOARES et al., 2004). O carvão foi hidratado com água purificada por 10 min e, em seguida, colocado em seringa descartável de 20 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. Preparou-se uma solução de hidrolisado (0,8 g/100mL), que foi aplicada à coluna, sob pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP), recolhendo-se o eluato.

#### **5 AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE Phe**

A avaliação da eficiência de remoção de Phe, pelo carvão ativado, foi realizada pela medida do teor de Phe livre, no EPA e seus hidrolisados (após tratamento com carvão), empregando-se a técnica desenvolvida no mesmo laboratório em que o presente estudo foi realizado (LOPES et al., 2004), baseada na Espectrofotometria Derivada Segunda (EDS). O teor de Phe livre corresponde à Phe que foi liberada pela hidrólise ácida. Desta forma, as soluções de hidrolisados (0,8 g/100 mL de água purificada), previamente submetidas ao tratamento com carvão ativado, e a solução de EPA (0,2 g/100 g de água purificada), foram colocadas em tubos especiais de hidrólise e evaporadas em Centrivap (Labconco, EUA) até resíduo. Posteriormente, foi realizada a hidrólise ácida, adicionando-se HCl 5,7 mol/L, e colocando-se em estufa a 110 °C por

24 h. Após este tempo, as amostras foram reconstituídas com água purificada para 10 mL, filtradas em papel de filtro qualitativo e o pH foi ajustado para 6,0, com solução de fosfato de sódio bibásico 1,0 mol/L.

Para a determinação do teor de Phe pela EDS, preparou-se, inicialmente, uma curva-padrão de Phe na presença de Tyr e Trp. Para tal, soluções estoque dos aminoácidos aromáticos, Phe, Tyr e Trp, foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0), nas concentrações de  $6,05 \times 10^{-4}$  mol/L;  $5,52 \times 10^{-4}$  mol/L e  $4,90 \times 10^{-4}$  mol/L, respectivamente. Em seguida, pipetou-se 10 mL de cada uma destas soluções para um erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura homogeneizada por agitação. A partir desta solução foram preparadas, por diluições sucessivas, soluções contendo Phe em concentrações variando de 0,067 a  $2,018 \times 10^{-4}$  mol/L. Estas soluções foram, então, submetidas às leituras de absorvância na faixa de 250 a 280 nm em espectrofotômetro (CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra). Os espectros de derivada segunda foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro. Dos quatro picos negativos obtidos, foram utilizados os valores de área e altura do 3º e 4º picos para traçar a curva padrão em função da concentração de Phe.

Para medir o teor de Phe livre nas amostras, traçaram-se os espectros das soluções obtidas após a hidrólise ácida na mesma faixa de comprimento de onda da curva padrão. Posteriormente, traçou-se os espectros de derivada segunda, e levou-se à curva padrão os valores de área ou altura dos picos negativos escolhidos acima, para encontrar a concentração de Phe.

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

$$\% \text{ Remoção de Phe} = \frac{\text{teor de Phe inicial} - \text{teor de Phe final}}{\text{teor de Phe inicial}} \times 100 \quad (2)$$

sendo,

teor de Phe inicial = teor de Phe no extrato protéico de arroz

teor de Phe final = teor de Phe no hidrolisado, após tratamento com carvão.

## **6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ**

A caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados consistiu no fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação.

O fracionamento dos peptídeos foi realizado por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE et al. (1994a). As amostras foram dissolvidas a uma concentração de 1 g/100mL em uma solução de ácido fórmico 0,05 mol/L (pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min. A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45 µm, e desgaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 13,5 a 18,0 min (peptídeos grandes, com mais de 7 aminoácidos); F2, de 18,0 a 21,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 aminoácidos); F3, de 21,5 a 22,5 min (di- e tri-peptídeos); e F4, de 22,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados de proteína de arroz. Após a multidetecção das frações a 230, 280 e 300 nm, para se eliminar a interferência da absorção dos aminoácidos aromáticos, calcula-se a ACF. Esta, por sua vez, é levada a uma curva padrão, para se encontrar a quantidade de peptídeos de cada fração, preparada como descrito em outros trabalhos realizados no mesmo laboratório em que o presente estudo foi desenvolvido (SILVESTRE et al., 1994b; MORATO et al., 2000; LOPES et al., 2004).

## **7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan a 5% de probabilidade, para comparar o rendimento de extração das proteínas do arroz e o teor final de Phe no EPA e nos hidrolisados, após tratamento com carvão ativado. Para se comparar a quantidade dos peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas foi adotado um delineamento fatorial, sendo as médias comparadas pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade. As curvas padrão foram obtidas por análise de regressão (PIMENTEL-GOMES, 2000).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ARROZ

Na Tabela II.3, são mostrados os teores dos principais componentes do arroz polido utilizado no presente trabalho. Pode-se observar que os valores encontrados para proteínas e carboidratos estão próximos aos citados em bases de dados oficiais, como USDA (2004) e USP (2005), e aos relatados por JULIANO (1993). Quanto aos teores de lípidos e cinzas totais, os valores encontrados se aproximam de alguns (USP, 2005, para lípidos; USDA, 2004 e JULIANO, 1993, para cinzas totais) e se diferenciam de outros (USDA, 2004 e JULIANO, 1993, para lípidos; USP, 2005, para cinzas totais) citados na literatura consultada. Isto pode ser explicado pelo fato de que os fatores ambientais afetam a composição do grão de arroz. Os métodos empregados na determinação destes componentes podem, também, influenciar nos resultados obtidos, embora não tenham sido mencionados na literatura consultada. Segundo JULIANO (1993), o teor de proteína tende a aumentar devido à aplicação de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. Além disso, vários outros fatores contribuem para aumentar o teor de proteína, como curto período de crescimento, condições climáticas, alta salinidade ou alcalinidade do solo, temperaturas muito elevadas ou muito baixas e presença de doenças ou pragas. De acordo com esse mesmo autor, um aumento no teor de proteína essencialmente acompanha uma redução no teor de carboidratos.

**Tabela II.3 – Composição química do arroz polido, cru, em g/100g**

Nutrientes	Valores obtidos <sup>1</sup>	USDA <sup>2</sup>	USP <sup>3</sup>	JULIANO <sup>4</sup>
Umidade	12,52	11,62	12,33	-
Proteína	8,05	7,13	6,73	6,3-7,1
Lípidos	1,05	0,66	0,89	0,3-0,5
Cinzas totais	0,65	0,64	0,48	0,3-0,8
Carboidratos	77,73	79,95	79,57	77-89

1 valores obtidos no presente trabalho

2 USDA (2004)

3 USP (2005)

4 JULIANO (1993)

## 5 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ARROZ

Pode-se observar na Tabela II.4 que, dependendo da condição, o método empregado foi eficiente na extração das proteínas do arroz. O maior rendimento (84,74%) foi obtido em pH 12,0, após 60 min de agitação e centrifugação de 425 x g.

**Tabela II.4 – Teores de proteína e Rendimentos de Extração, para as diferentes condições de extração**

Extrato	Peso (g)	Teor de Proteína (g/100g)	Rendimento de Extração (%)
EPA1	0,75	69,58	61,32 <sup>d</sup>
EPA2	0,75	63,37	58,73 <sup>d</sup>
EPA3	0,75	62,83	58,23 <sup>d</sup>
EPA4	0,88	59,77	65,00 <sup>c</sup>
EPA5	1,05	60,33	78,28 <sup>b</sup>
EPA6	1,48	19,63	35,90 <sup>e</sup>
EPA7	0,88	77,92	84,74 <sup>a</sup>

EPA = extrato protéico de arroz. Os resultados representam médias de triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

O efeito do pH sobre o rendimento de extração pode ser, também, observado na Tabela II.4. Assim, o aumento do pH de 9,0 (EPA1) para 10,0 (EPA2) não afetou o rendimento de extração, o qual elevou-se ao passar do pH 10,0 para 12,0 (EPA4).

Quanto à influência do tempo de agitação, observa-se que foi ausente no pH 10,0, enquanto que em pH 12,0 o emprego de 60 min (EPA5) produziu maior rendimento de extração do que o obtido com 15 min de agitação (EPA4).

A velocidade de centrifugação também afetou o rendimento de extração, tendo o mesmo sido aumentado ao se passar de 106 x g (EPA6) para 425 x g (EPA7) e diminuído com o emprego de 2660 x g (EPA5). Uma hipótese para o fato de que a velocidade de 425 x g tenha sido mais eficiente que a de 2660 x g (84,7 e 78,3% de extração, respectivamente), seria a de que, na alta velocidade mais alta, parte do amido disperso na fase líquida pode ter precipitado, carreando consigo algumas proteínas.

Não foram encontrados na literatura dados referentes ao teor de proteínas de extratos protéicos de arroz. Entretanto, vários autores relataram resultados referentes à

extração alcalina de proteínas do farelo de arroz. CONNOR et al. (1976) obtiveram um concentrado protéico contendo de 23 a 31% de proteína, a partir do farelo de arroz. Este resultado foi inferior ao obtido para o EPA1, para o qual foram utilizadas condições semelhantes de extração. Já LINDSAY et al. (1977), utilizando a mesma matéria-prima e condições semelhantes, obtiveram produtos com teores de proteína variando de 19,44 a 54,00%, o que se aproxima mais do resultado encontrado no presente estudo.

Quanto ao Rendimento de Extração, cerca de 65% das proteínas do farelo de arroz foram extraídas em pH 9,0 com 15 min de agitação, segundo LINDSAY et al. (1977), resultado semelhante ao obtido para o EPA1 (61,32%), que utiliza as mesmas condições. TANG et al. (2002) obtiveram rendimentos de extração de 56,2 a 66,6%, utilizando processamentos físicos e enzimáticos na extração da proteína do farelo de arroz. Estes resultados são inferiores aos obtidos neste trabalho, o que sugere que a extração alcalina é mais eficiente no que se refere à quantidade de proteína extraída.

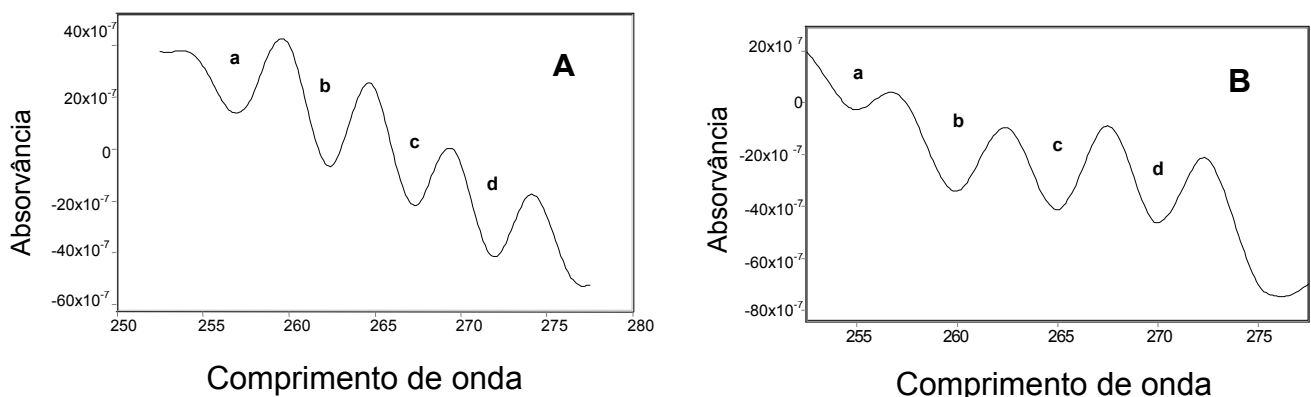
Em alguns trabalhos encontrados na literatura, a extração da proteína foi feita visando a obtenção do amido do arroz (LUMDUBWONG & SEIB, 2000; WANG & WANG, 2004). Nestes trabalhos, os resultados do rendimento da extração protéica não foram apresentados, porém o amido obtido por WANG & WANG (2004), por meio da extração alcalina, apresentou um teor de proteínas significativamente inferior ao obtido com o uso de proteases, sugerindo que o uso de solução alcalina foi mais eficiente na remoção das proteínas do arroz.

## **6 ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA SEGUNDA: CURVA PADRÃO E ESPECTROS**

A curva padrão de Phe escolhida, obtida por meio da EDS, refere-se à que foi traçada empregando-se a área de pico "c" (Figura II.1), pois esta apresentou o maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) quando comparada à altura. Constatou-se, também, que a regressão linear para Phe foi significativa ( $p < 0,01$ ). As equações da reta e os coeficientes de determinação obtidos foram os seguintes:  $y = 3,0077x + 0,7587$  e  $R^2 = 0,9576$ . Outros autores também relataram resultados semelhantes ao relacionarem a área e/ou altura do pico de absorção de Phe, em presença de Tyr e Trp, com a concentração de Phe (ZHAO et al., 1996; ICHIKAWA & TERADA, 1977). O mesmo foi descrito em trabalhos anteriores desenvolvidos no mesmo laboratório do presente trabalho (SOARES et al.; 2004; LOPES et al., 2004; DE MARCO, 2004, SILVA, 2004;

MORAIS et al., 2005; DELVIVO et al., 2005a,b). No entanto, alguns autores encontraram números de picos negativos diferentes aos deste estudo, no espectro da Phe (ICHIKAWA & TERADA, 1977; MICLO et al., 1995). Segundo LEVILLAIN & FOMPEYDIE (1986), esta variação na espectro da Phe poderia estar associada às diferenças nas formas utilizadas do aminoácido padrão (livre ou N-acetil-éster), na aparelhagem empregada, em especial o espectrofotômetro e o software, como também no tipo de solvente e os valores de pH.

Observa-se, ainda, na Figura II.1 que o espectro do hidrolisado H3 assemelha-se ao da Phe, com picos negativos situados em comprimentos de onda similares. ICHIKAWA & TERADA (1979) também relataram esta semelhança entre os espectros de aminoácidos padrões e o de proteína, ao empregar a EDS para determinar a quantidade de resíduos de Phe em diversas proteínas desnaturadas ou nativas. Resultados similares já haviam sido obtidos no mesmo laboratório onde foi realizado o presente trabalho, ao estudar os espectros de absorvância e o de derivada segunda de hidrolisados de enzimáticos de caseína (MORAIS et al., 2005), de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2004; SOARES et al., 2004) e de soro de leite em pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b).



**Figura II.1 – Espectros de derivada segunda.** (A) da Phe em pH 6,0, na presença de Tyr e de Trp; (B) do hidrolisado H3 em pH 6,0.

## 4 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE Phe

Pode-se observar, na Tabela II.5, que o uso do carvão ativado foi eficiente na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz obtidos pela ação da corolase PP. O percentual de remoção variou de 89 a 100%, e o teor final de Phe nos hidrolisados foi de 0,39 a 68,34 mg de Phe/100 g de hidrolisado. O teor inicial de Phe no EPA era de 611,9 mg de Phe/100 g de extrato. Os resultados foram apresentados em termos de teor final de Phe (em mg de Phe/100 de hidrolisado) e porcentagem de remoção de Phe, sendo a primeira forma a mais indicada 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).

Acrescenta-se, ainda, que, numa formulação dietética para fenilcetonúricos contendo apenas hidrolisado protéico de arroz, o teor de Phe por 100 g de produto variaria de 0,39 a 68,34 mg. Considerando que, de maneira geral, as formulações dietéticas contêm 25% de proteína que, nesse caso, seriam fornecidas pelo hidrolisado protéico de arroz (60 % de proteína), o teor de Phe por 100 g do produto cairia para 0,16 a 28,48 mg. No caso de reconstituição do arroz por meio da reincorporação do hidrolisado protéico ao amido previamente separado, o teor de Phe estaria na faixa de 0,05 a 9,11 mg por 100 g do produto. Portanto, em qualquer um dos três casos citados acima, o teor de Phe estaria bem abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002), que é de 0,1 g de Phe por 100 g de produto, em formulações para fenilcetonúricos, mesmo empregando o hidrolisado protéico com menor remoção de Phe.

Resultados semelhantes (75 a 99% de remoção) foram obtidos no mesmo laboratório onde o presente trabalho foi realizado, utilizando-se carvão ativado para remover a Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2004a; SOARES et al., 2004) e de soro de leite em pó (DE MARCO, 2004; SILVA, 2004; DELVIVO et al., 2005a,b). Outros autores também relataram resultados de remoção de Phe próximos aos obtidos neste trabalho, utilizando carvão ativado. Assim, LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) conseguiram remover 92% da Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio obtidos pela ação da papaína e de uma protease do *Aspergillus oryzae*. MOSZCZYNSKY & IDZIAC, em 1993, empregaram uma mistura de três enzimas (carboxipeptidase A, aminopeptidase e quimotripsina) na hidrólise de caseína, obtendo, após tratamento com carvão, cerca de 90% de remoção de Phe.

Níveis de remoção de 97% foram relatados por KITAWAGA et al. (1987) em hidrolisados de proteínas do soro de leite obtidos pela ação da actinase.

Por outro lado, COGAN et al. (1981) relataram resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho (36% de remoção), ao utilizar a enzima Rhozima 62 na produção de hidrolisados de caseína. Este resultado pode ser devido ao tipo de enzima utilizada na hidrólise e à menor proporção de carvão para remoção de Phe (0,5 g de carvão/g de proteína, contra 88,5 g de carvão/g de proteína, utilizados no presente trabalho). Não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando a proteína do arroz na produção de hidrolisados com baixo teor de Phe.

Um das grandes vantagens do atual trabalho em relação aos de outros autores, refere-se à possível otimização do processo dos pontos de vista tecnológico e econômico, uma vez que resultados favoráveis à remoção de Phe foram obtidos com o emprego de apenas uma enzima, com tempo inferior e menores quantidades de carvão e relação E:S.

**Tabela II.5 – Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de arroz, obtidos pela ação da Corolase PP**

Hidrolisados	Teor final de Phe (mg Phe/100g de hidrolisado)	Remoção de Phe (%)
H1	1,57 <sup>b</sup>	100
H2	1,77 <sup>b</sup>	100
H3	5,26 <sup>b</sup>	99
H4	0,39 <sup>b</sup>	100
H5	68,05 <sup>a</sup>	89
H6	68,34 <sup>a</sup>	89

Teor final de Phe = teor de Phe dos hidrolisados, após tratamento com carvão ativado e hidrólise ácida. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

## 7 EFEITO DOS PARÂMETROS HIDROLÍTICOS SOBRE A REMOÇÃO DE Phe

Foram analisados os seguintes parâmetros: concentração inicial de extrato protéico e relação enzima:substrato.

Comparando-se os resultados obtidos para os hidrolisados H1, H3 e H5, ou H2, H4 e H6 (Tabela II.2), pode-se avaliar o efeito da concentração do substrato protéico (EPA). Assim, observa-se que o aumento da concentração de EPA de 1 g/100 mL (0,78 g de proteína/100 mL – H1 e H2) para 2 g/100 mL (1,56 g de proteína/100 mL – H3 e H4) não teve efeito na remoção de Phe. A elevação desta concentração inicial para 3 g/100 mL (2,34 g de proteína/100 mL – H5 e H6), porém, foi prejudicial, uma vez que levou a um aumento no teor final de Phe (Tabela II.5). Seria esperado que este aumento na concentração protéica levasse a uma maior probabilidade da enzima entrar em contato com o substrato, levando a uma maior exposição da Phe e, conseqüentemente, uma maior remoção deste aminoácido. No entanto, o efeito da hidrólise enzimática na remoção de Phe é muito complexo, como será visto adiante.

Na avaliação da influência da relação E:S podem ser comparados os resultados obtidos para os hidrolisados H1 com H2, H3 com H4 e H5 com H6 (Tabela II.2). Observa-se na Tabela II.5 que, nos três casos, o aumento de duas vezes na relação E:S não teve efeito para a remoção de Phe.

O efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe foi avaliado em vários trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo. No primeiro trabalho, foi mostrado que o aumento de dez vezes na relação E:S da associação das enzimas protease do *Aspergillus oryzae* e papaína (de 1 para 10% e de 2 para 20 %, respectivamente), para hidrolisar leite em pó desnatado, foi prejudicial para a remoção de Phe, tendo aumentado significativamente o seu teor final de 0,060 para 0,231 mg/ 100 mg de proteína (LOPES et al., 2004). Por outro lado, na associação de uma protease do *Aspergillus oryzae* com pepsina, para hidrolisar essa mesma fonte protéica, esse mesmo aumento na E:S das duas enzimas não afetou a remoção de Phe (SOARES et al., 2004). Empregando-se a pancreatina e a papaína na hidrólise do soro de leite, o aumento da relação E:S de 0,01% para 0,1% e de 0,1% para 1,0%, mostraram resultados variados sobre a remoção de Phe, sendo benéfico, prejudicial ou sem efeito, dependendo da temperatura da reação hidrolítica e do emprego ou não da ultrafiltração (DELVIVO et al., 2005a,b). Em outro trabalho desenvolvido no mesmo laboratório, a pancreatina foi imobilizada em alumina e carvão ativado para hidrolisar o soro de leite. Nesse caso, passando-se a relação E:S de 0,01 para 1% houve uma redução no teor final de Phe, e de 1% para 2% não foi observada qualquer alteração (SILVA et al., 2004). No caso de ter empregado a papaína nessas mesmas condições, o aumento da relação E:S não teve efeito sobre a remoção de Phe (DE MARCO, 2004), como observado no presente trabalho.

Apesar de se esperar que o aumento da relação E:S levaria sempre a um maior grau de hidrólise e, conseqüentemente, a uma liberação de Phe mais pronunciada, facilitando a sua remoção, o conjunto de todos esses resultados indica que, na prática, esse procedimento é mais complexo do que o teoricamente esperado, e o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe depende de diversos fatores, tais como o tipo e concentração de enzima e de substrato e a temperatura da reação hidrolítica.

## 8 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ARROZ

Os hidrolisados H3 e H4 foram analisados quanto à distribuição de peptídeos e aminoácidos livres, pois, entre os que apresentaram o menor teor final de Phe, estes utilizaram maior concentração protéica inicial (1,56 g/100 mL), o que tornaria a etapa de secagem mais econômica, quando do seu preparo em larga escala.

Os teores de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas estão apresentados na Tabela II.6.

**Tabela II.6 – Teores de peptídeos e de aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados protéicos de arroz**

Frações cromatográficas	Hidrolisados	
	H3	H4
Grandes peptídeos (> 7 aminoácidos)	15 <sup>d/1</sup>	20 <sup>b/2</sup>
Peptídeos médios (4 a 7 aminoácidos)	34 <sup>a/2</sup>	37 <sup>a/1</sup>
Di- e tri-peptídeos	32 <sup>b/1</sup>	21 <sup>b/2</sup>
Aminoácidos livres	20 <sup>c/2</sup>	22 <sup>b/1</sup>

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

Observa-se que, do ponto de vista nutricional, o perfil peptídico do hidrolisado H3 foi superior ao do H4, por ter apresentado maior teor de oligopeptídeos (F2 + F3 = 66% e 58%, respectivamente) e menor teor de grandes peptídeos (F1 = 15% e 20%,



respectivamente) e de aminoácidos livres (F4 = 20% e 22%, respectivamente). Estes resultados indicam, ainda, que o aumento da E:S de 1% (H3) para 2% (H4) foi prejudicial para o perfil peptídico. Portanto, este procedimento (duplicação da E:S) não apresentou qualquer vantagem para os hidrolisados protéicos, além de ser pouco viável economicamente. Ressalta-se, ainda, que não foram encontrados na literatura dados sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de arroz.

## CONCLUSÕES

As proteínas do arroz foram extraídas de forma eficaz com o uso de solução alcalina, atingindo-se um rendimento de extração de cerca de 85%. Até 100% da Phe de hidrolisados protéicos de arroz obtidos pela ação da corolase PP foram removidos pela utilização do carvão ativado, sendo que, dos parâmetros testados, apenas a concentração protéica inicial influenciou na remoção de Phe. Os teores finais de Phe de todos os hidrolisados foram inferiores a 0,1 g/100 g, possibilitando seu uso no preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos. Os melhores resultados foram obtidos para valores concentração protéica inicial de 0,78 e 1,56 g/100 mL. O melhor perfil peptídico foi obtido com uma E:S de 1% e uma concentração protéica inicial de 1,56 g/100 mL.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB ENZYMES. *Corolase PP*: Description and Specification. Rev. Nr. 02. 2001, 2 pp.
- ALAIZ, M.; NAVARRO, J.L.; GIRON, J.; VIOQUE, E. Amino acids analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemanolate. *J. Chromatogr.*, v. 591, n.1, p.181-186, 1992.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dez. 2003, p. 33.
- AOAC (Association Of Official Agricultural Chemists). *Official methods of analysis of AOAC International*. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2 v.

- AUBES-DUFAU, I., SERIS, J-L., COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, n. 8, p.1982-1988, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 nov. 2002, p. 83.
- BRANDTS, J.F. and KAPLAN, L.J. Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, v. 12. n. 10, p. 2011-2024, 1973.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivative analysis of UV / visible spectra. *American Laboratory*, v. 12, p. 101-112, 1980.
- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.22, n.3, 229-232, 2002.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 11, n. 7, p. 254 - 262, 2000.
- COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food and Agric.*, v.32, n. 5, p.459-466, 1981.
- CONNOR, M.A.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. *Cereal Chemistry*, v. 53, n. 4, p. 488-496, 1976.
- DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso de carvão ativado e de amberlite xad-4 para remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina. *Tecno-Lógica*, 2005a (No prelo).
- DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; FIGUEIREDO, A.F.S.; DE AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE M.P.C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 2005b (submetido para publicação).
- DE MARCO, L.M. *Uso da papaína imobilizada em carvão ativado e em alumina no preparo de formulações sirtéticas para fenilcetonúricos, à base de soro de leite*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 99 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- FAO (Food and Agriculture Organization) *Food Balance Sheet 2002*. Rome: FAO, 2002. [s.p.].
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Techn.*, v. 48, n.10, p. 86-88, 1994.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular – weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRANT, A and BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chromat.*, v. 347, p. 219-235, 1985.
- HARA, H.; FUNABIKI, R.; IWATA, M.; YAMAZAKI, K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J. Nutr.*, v.114, p.1122-1129, 1984.

- HEATHCOTE, J. G.; HAWORTH, C. An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose. II. The quantitative determination of amino acids in protein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v. 43, p. 84-92, 1969.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 2, p. 438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 671, n. 1, p. 33-37, 1981b.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 580, n. 1, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 494, n. 1, p. 267-270, 1977.
- IRRI (International Rice Research Institute). *World rice statistics, 2001*. Manila: IRRI, 2001. [s.p.].
- JULIANO, B.O. *Rice in human nutrition*. Rome: FAO, 1993. 168 p.
- 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. *Enzyme*, v. 38, n. 1-4, p. 321 - 327, 1987.
- LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrométrie dérivée: intérêt, limites et applications. *Analysis*, v. 14, n. 1, p. 1-20, 1986.
- LINDSAY, G.W.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Protein concentrates from wheat shorts, rice bran, and soy flour by extraction with cheese wheys. *Journal of Food Science*, v. 42, n. 5, p. 1365-1369, 1977.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Science and Technology*, 2004 (In press).
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 4, p. 938-942, 1991.
- LUMDUBWONG, N.; SEIB, P.A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour. *Journal of Cereal Science*, v. 31, n. 1, p. 63-74, 2000.
- MARTINS, A.M.; FISBERG, R.M.; SCHMIDT, B.J. *Fenilcetonúria: abordagem terapêutica*. Temas de pediatria NESTLÉ, n. 54, 1993, p. 1 - 12.
- MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA, K. Derivative absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal. Biochem.*, v. 65, n. 1-2, p. 362 - 368, 1975.
- MICLO, I.; PERRIN, E.; DRIOU, A.; MELLET, M.; LINDEN, G. Determination of the ratios of the aromatic amino acids residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.*, v. 46, n. 2, p. 186-192, 1995.

- MIRA, N.V.M. e MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Revista Saúde Pública*, v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.
- MORAIS, H. A; DE MARCO, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria*, 2005. (In press).
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 29, n. 3, p. 302-306, 1993.
- O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, n. 9, 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, Helsink, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.*
- PIETZ, J.; KREIS, R.; RUPP, A.; MAYATEPEK, E.; RATING, D.; BOESCH, C.; BREMER, H.J. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenilketonuria. *J. Clin. Inv.*, v. 103, n. 8, p. 1169-1178, 1999.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477 p.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, n. 10, p. 753-761, 1998.
- SHEN, J.L. Soy protein solubility: the effect of experimental conditions on the solubility of soy protein isolates. *Cereal Chem.*, v. 53, n. 6, p. 902-909, 1976.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M.. Peptide mixture and products thereof. *Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.*
- SILVA, V.D.M. *Uso da pancreatina imobilizada em carvão ativado e em alumina no preparo de formulações sirtéticas para fenilcetonúricos, à base de soro de leite*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 119 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SILVESTRE, M.P.C., DAUPHIN, C., HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta.*, v. 282, p. 603-612, 1993.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hidrolsates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, 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, n. 12, p. 2783-2789, 1994b.

- SMITHERS, G.; BRADFORD, R.S. New casein products: fresh opportunities for the dairy industry, *Food Res. Quart.*, v. 51, n. 1-2, p. 92-98, 1991.
- SOARES, R.L.D.; DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L.M.; AGUIAR, M.J.B.; JUNQUEIRA, R.G.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego do carvão ativado para a remoção de fenilalanina de leite em pó. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 22, n.1, p. 65-84, 2004.
- TAKASE, M.; FUKUWATERI, Y. ; KAWASE, K.; KIYOSOWA, I.; OGASA, K.; SUZUKI, S.; KUROUME, T. Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate. *J. Dairy Sci.*, v. 62, n. 10, p. 1570 - 1576, 1979.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, N.S.; SHELLHAMMER, T.H. Protein extraction from heat-stabilized rice bran 1 – Physical processing and enzyme treatments. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, n. 25, p. 7444-7448, 2002.
- TRAHMS, C.M. Cuidado nutricional nos distúrbios metabólicos. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. *Alimentos nutrição e dietoterapia*. 9. ed. São Paulo: Roca, p. 745-775, 1998.
- USDA (United States Department of Agriculture). Nutrients database for standard reference: Rice, white, long grain, regular, raw, unenriched. Reference, Release 17, 2004. Disponível em: <[http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl)> . Acesso em 10 jan 2005.
- USP (Universidade do Estado de São Paulo). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2005. Disponível em <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>> . Acesso em 10 jan 2005.
- 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.
- ZHAO, Q.; SANNIER, F.; GARREAU, I.; LECOEUR, C.; PIOT, J.M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides: application to hemorphins. *J. Chromatogr. A*, v. 723, n. 1, p. 35-41, 1996.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O uso do carvão ativado mostrou-se eficiente na remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de arroz, conforme mostrado nos dois capítulos deste trabalho. Foram atingidos até 100% de remoção, porém os resultados variaram de acordo com as condições hidrolíticas utilizadas, como tipo de enzima, relação E:S e concentração inicial de substrato. Desta forma, seria interessante a realização de testes empregando-se valores diferentes dos estudados no presente trabalho relacionados a concentrações de extrato protéico de arroz e de enzima, temperatura, faixa de pH e tempo de hidrólise. Outras enzimas comerciais poderiam ser utilizadas, como proteases de origem vegetal ou microbiana. No intuito de reduzir os custos do processo, algumas sugestões poderiam ser apresentadas. Assim, poder-se-ia testar a imobilização das enzimas, permitindo sua reutilização para o preparo de hidrolisados protéicos destinados à elaboração de suplementos dietéticos. Estas enzimas poderiam ser produzidas no mesmo laboratório em que o presente trabalho foi realizado, a partir de microrganismos ou extratos vegetais. Um estudo sobre a recuperação e reutilização do carvão ativado seria de grande importância, levando-se em conta a quantidade elevada deste meio empregada para a remoção de Phe. Embora a extração alcalina tenha sido eficiente na obtenção do extrato protéico de arroz, alcançando-se até 85% de extração, outros métodos poderiam ser testados, como a utilização direta de proteases alcalinas, promovendo, ao mesmo tempo, a extração protéica e a hidrólise enzimática, o que eliminaria uma etapa do processo.

Fontes protéicas alternativas poderiam ser utilizadas, como soja, feijão, milho e farinha de trigo, de forma a diversificar a oferta de alimentos para fenilcetonúricos.

Uma vez que o carvão ativado remove aminoácidos hidrofóbicos por adsorção, é importante avaliar a perda de tirosina e triptofano dos hidrolisados protéicos de arroz, para uma posterior suplementação destes aminoácidos na formulação destinada a fenilcetonúricos. Para esta avaliação, sugere-se o uso da espectrofotometria derivada segunda (EDS), por ser um método simples, rápido e de baixo custo. Um aminograma dos hidrolisados também poderia ser empregado, para verificar possíveis perdas destes e de outros aminoácidos, além de fornecer informações mais detalhadas do valor nutricional destes produtos.

A composição química do arroz utilizado esteve próxima aos valores de referência, apesar de vários fatores interferirem nos teores de nutrientes do arroz. Além disso, seria

interessante, do ponto de vista nutricional, a determinação de outros componentes, como vitaminas e minerais.

A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) foi utilizada na avaliação nutricional dos hidrolisados, baseando-se na distribuição dos peptídeos nas amostras, de acordo com o tamanho da cadeia. Foram obtidos hidrolisados de alto valor nutricional, com elevado teor de oligopeptídeos (até 66%) e menores teores de grandes peptídeos e aminoácidos livres. O emprego da ultrafiltração, apesar do elevado custo, poderia melhorar ainda mais o perfil peptídico dos hidrolisados, reduzindo o teor de grandes peptídeos, o que também contribuiria para a diminuição da imunogenicidade destas preparações.

Os hidrolisados protéicos, após a remoção de Phe, poderiam ser reincorporados ao amido de arroz e peletizados, produzindo assim um sucedâneo do arroz destinado a dietas de fenilcetonúricos. Esses hidrolisados poderiam, igualmente, ser utilizados como fonte protéica em outros tipos de formulações com baixo teor de Phe.

Além do uso na elaboração de produtos para fenilcetonúricos, sugere-se que os hidrolisados protéicos de arroz sejam utilizados para outros fins. Devido ao elevado teor de glutamina dos cereais, esses hidrolisados poderiam ser empregados como fonte deste aminoácido, de ação imunomoduladora, na prevenção da translocação bacteriana, entre outras patologias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB ENZYMES. *Corolase PP*: Description and Specification. Rev. Nr. 02. 2001, 2 p.
- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: *IDF (Inter. Dairy Fed.) Seminar on Protein & Fat globule modifications*, p. 97-105, 1993.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S.; MARRIAGE, B.; MANTIA, C.; GAFFIELD, B.; PORTERFIELD, M.; HUNT, M.; MCMASTER, N.; BERNSTEIN, L.; PARTON, P.; KUEHN, M.; LEWIS, V. Nutrient intake and grow of infants with phenylketonuria undergoing therapy. *J. Ped. Gastr. Nutr.* v. 27, n. 3, p. 287-291, 1998.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI S. Protocolo 1 – Phenylketonuria (PKU). In: Ross Products Division, Abbott Laboratories. *The ross metabolic formula system - Nutricion support protocol*. 3.ed. Columbia: Keziaz Strvat, 1997.
- ADACHI, S.; KIMURA, S.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v. 55, n. 4, p. 925 - 932, 1991.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v.6, p.29-33, 1981.
- AGUIAR, M.J.B. Experiências dos programas de triagem neonatal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA, 14, 2002, Ribeirão Preto. *Anais ...* Ribeirão Preto: SBGC, 2002, p.16.
- ALAIZ, M.; NAVARRO, J.L.; GIRON, J.; VIOQUE, E. Amino acids analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemanolate. *J. Chromatogr.*, v. 591, n. 1, p. 181-186, 1992.
- AMIOT, J.; BRISSON, G.J. Continuous automatic nitrogen determination for gel chromatography of protein enzymatic hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v. 193, n. 3, p. 496-499, 1980.
- ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P.A. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. *Food Rev. Int.*, v. 9, n. 4, p. 629-655, 1993.
- ANTONOV, V.K. *Chemistry of proteolysis*. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 495 p.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dez. 2003, p. 33.
- AOAC (Association Of Official Agricultural Chemists). *Official methods of analysis of AOAC International*. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2 v.
- ARAI, S.; MAEDA, A.; MATSUMURA, M.; HIRAO, N.; WATANABE, M. Enlarged scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.*, v. 50, p. 2929-2931, 1986.
- AUBES-DUFAU, I., SERIS, J-L., COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, n. 8, p. 1982-1988, 1995.



- BADOUD, R.; PRATZ, G. Simple and rapid quantitative determination of lysinoalanine and protein hydrolysate amino acids by high-performance liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride. *Chromatographia*, v. 19, p. 155-164, 1984.
- BECHTEL, D.B.; POMERANZ, Y. Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. The starchy endosperm. *Am. J. Bot.*, v. 65, p. 684-691, 1978.
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr. B Biomedical Sci. Appl.*, v. 336, n. 1, p. 93-104, 1984.
- BLAU, N.; ERLANDSEN, H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol. Gen. Metab.*, v. 82, n. 2, p. 101-111, 2004.
- BOZA, J.J.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O; GIL, A. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, n. 4, p. 872-875, 1995.
- BRANDTS, J.F.; KAPLAN, L.J. Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem.*, v. 12, n. 10, p. 2011-2024, 1973.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 269, de 17 de novembro de 1988. Aprova a norma anexa sobre classificação, embalagem e marcação de arroz. *Diário Oficial*, Brasília, 28 nov. 1988, p. 23564-23573.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 nov. 2002, p. 83.
- BURGARD, p. Development of intelligence in early treat phenylketonuria. *Eur J Pediatr*, v. 159, n. 2, p. 574-579, 2000.
- BURTS, C.A.; ASHWOOD, E.R. Tietz - *Fundamentos de química clínica*. 4.ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1996.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivative analysis of UV/visible spectra. *American Laboratory*, v. 12, p. 101-112, 1980.
- CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. UNICAMP, Campinas, 1998 (Tese de Doutorado).
- CARISANO, A. Rapid and sensitive method for the determination of proline by reversed-phase high performance liquid chromatography with automated pre-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.*, v. 318, p. 132–138, 1985.
- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 3, p. 229-232, 2002.
- 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, 345p, 1989.

- CHOBERT, J-M.; BERTRAND-HARB, C.; NICOLAS, M.G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 5, p. 883–892, 1988.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 11, n. 7, p. 254 - 262, 2000.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Proposed draft standard for rice*. FAO Standards Programme CX/CPL/90/5. Rome: FAO, 1990. 8 p.
- COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food and Agric.*, v. 32, n. 5, p. 459-466, 1981.
- CONNOR, M.A.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. *Cereal Chem.*, v. 53, n. 4, p. 488-496, 1976.
- DEESLIE, W.D.; CHERYAN, M. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Food Sci.*, v. 57, n. 2, p. 411-413, 1991.
- DE MARCO, L.M. *Uso da papaína imobilizada em carvão ativado e em alumina no preparo de formulações sirtéticas para fenilcetonúricos, à base de soro de leite*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 99 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso de carvão ativado e de amberlite xad-4 para remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina. *Tecno-Lógica*, v. 8, n. 2, 2005a (no prelo).
- DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; FIGUEIREDO, A.F.S.; DE AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE M.P.C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 2005b (no prelo).
- DIZDAROGLU, M. Weak anion-exchange high-performance liquid chromatography of peptides. *J. Chromatogr.*, v. 334, p. 49-69, 1985.
- EGGUM, B.O.; CABRERA, M.I.Z.; JULIANO, B.O. Protein and lysine digestibility and protein quality of cooked Filipino rice diets and milled rice in growing rats. *Plant Foods Hum. Nutr.*, v. 42, p. 163-170, 1992.
- EUBER, J.R.; PUSKI, G.; HARTMAN JR., G.H. Method for making soluble rice protein concentrate and the product produced therefrom. 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.
- FAO (Food and Agriculture Organization) *Food Balance Sheet 2002*. Rome: FAO, 2002. [s.p.].
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, v. 48, n. 10, p. 86-88, 1994.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, n. 3, p. 343-359, 1990.

- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRANT, A and BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chromat.*, v. 347, p. 219-235, 1985.
- GRIMBLE, G.K. & SILK, D.B.A. Peptides in human nutrition. *Nutr. Research Rev.*, v. 2, p. 87-108, 1989.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-9, 1986.
- HAMADA, J.S. Characterization of protein fractions of rice bran to devise effective methods of protein solubilization. *Cereal Chem.*, v. 74, n. 5, p. 662-668, 1997.
- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v. 5, n. 6, p. 559-71, 1992.
- HARA, H.; FUNABIKI, R.; IWATA, M.; YAMAZAKI, K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J. Nutr.*, v. 114, n. 6, p. 1122-1129, 1984.
- HARTSUCK, J.A.; LIPSCOMB, W.N. Carboxypeptidase A. In: BOYER, P.D. *The enzymes*. 3 ed. New York: Academic Press, 1971. p. 1-55.
- HEATHCOTE, J. G.; HAWORTH, C. An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose. II. The quantitative determination of amino acids in protein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v. 43, p. 84-92, 1969.
- HESS, G.P. Chymotrypsin – chemical properties and catalysis. In: BOYER, P.D. *The enzymes*. 3 ed. New York: Academic Press, 1971. p. 213-245.
- HIBINO, K.; KIDZU, T.; MASAMURA, T.; OHTSUKI, K.; TANAKA, K.; KAWABATA, K.; FUJII, S. Amino acid composition of rice prolamin peptides. *Agric. Biol. Chem.*, v. 53, n. 2, p. 513-518, 1989.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. et Biophys. Acta*, v. 494, n. 1, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 580, n. 1, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 2, p. 438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochimica et Biophysic. Acta*, v. 671, n. 1, p. 33-37, 1981b.
- ILIEV, I.; TCHORBANOV, B. Determination of tryptophan in protein hydrolysates and fermentation media using gel chromatography. *Biothechnol. Applied Biochem.*, v. 16, n. 1, p. 29-33, 1992.
- IRRI (International Rice Research Institute). *World rice statistics, 2001*. Manila: IRRI, 2001. [s.p.].

- JULIANO, B.O. *Rice in human nutrition*. Rome: FAO, 1993. 168 p.
- KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S., SOARES, R.D.L., REIS, D.G. Receitas especiais para fenilcetonúria. Belo Horizonte: Folium, 2001.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. SILK, D.B. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v.26, n. 9, p.907-913, 1985.
- KIM, W.; ERLANDSEN, H.; SURENDRAN, S.; STEVENS, R.C.; GAMEZ, A.; MICHOLS-MATALOM, K.; TYRING, S.K.; MATALON, R. Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Mol. Ther.*, v. 10, n. 2, p. 220-224, 2004.
- 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. *Enzime*, v. 38, n. 1-4, p. 321-327, 1987.
- LAHL, W.J. ; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994
- LANDRY, J.; DELHAYE, S.; VIROBEN, G. Tryptophan content of feedstuffs as determined from three procedures using chromatography of barytic hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 1, p. 51-52, 1988.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J. M., GUILLOCHON, D; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *Chromatographia* ,v. 31, p. 499-504, 1991.
- LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZZENEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatogr. A*, v. 881, n. 1-2, p. 1-21, 2000.
- LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrométrie dérivée: intérêt, limites et applications. *Analysis*, v. 14, n. 1, p. 1-20, 1986.
- LEVY, H. L. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, n. 5, p. 1811-1813, 1999.
- LINDSAY, G.W.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Protein concentrates from wheat shorts, rice bran, and soy flour by extraction with cheese wheys. *J. Food Sci.*, v. 42, n. 5, p. 1365-1369, 1977.
- LIPSCOMB, W.N. Carboxipeptidase A mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 77, n. 7, p. 3875-3878, 1980.
- LOPES, D.C.F; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Tech.*, 2004 (In press).
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic production of a low-phenilalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, n. 4, p. 938-942, 1991.
- LUMDUBWONG, N.; SEIB, P.A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour. *J. Cereal Sci.*, v. 31, n. 1, p. 63-74, 2000.
- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, n. 12, p. 1163-1169, 1992.

- MARCO, D.; WAITZBERG, D.L. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: WAITZBERG, D.L.(Ed.) *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 499-464.
- MARTINS, A.M.; FISBERG, R.M.; SCHMIDT, B.J. *Fenilcetonúria: abordagem terapêutica*. Temas de pediatria NESTLÉ, n. 54, 1993. p. 1-12.
- MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA K. Derivative absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal. Biochem.*, v. 65, n. 1-2, p. 362-368, 1975.
- MICLO, I.; PERRIN, E.; DRIOU, A.; MELLET, M.; LINDEN, G. Determination of the ratios of the aromatic amino acids residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.*, v. 46, n. 2, p. 186-192, 1995.
- MILUPA. Protein substitutes for the dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia, 1995
- MIRA, N.V.M. e MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Revista Saúde Pública*, v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.
- MORAIS, H. A; DE MARCO, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria*, 2005. (In press).
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, v. 13, n. 5, p. 843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 29, n. 3, p. 302-306, 1993.
- O'FLYNN, M.E.; HOLTZMAN, N.A.; BLASKOVICF, M.; AZEN, C.; WILLIAMSON, M.L. Diagnosis of phenylketonuria. *Am. J. Dis. Child.*, v. 134, p. 769-774, 1980.
- O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, n. 9, 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, Helsink, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.*
- PARK, Y.K. Produção de enzimas industriais de origem animal. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.) *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blugher, 2001. v. 3. p. 363 - 371.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.
- PIETZ, J.; KREIS, R.; RUPP, A.; MAYATEPEK, E.; RATING, D.; BOESCH, C.; BREMER, H.J. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenilketonuria. *J. Clin. Inv.*, v. 103, n. 8, p. 1169-1178, 1999.
- 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.*, New York, v. 23, p. 1871-1875, 1984.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 1975. 573 p.

- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, n. 10, p. 753-761, 1998.
- SANTOS, M.F.; SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H. Hidrolisado enzimático para dietoterapia de fenilcetonúricos. *Biotechnol. Ciên. Desenv.*, v. 29, p.152-157, 2003.
- SARKISSIAN, C.N.; SHAO, Z.; BLAIN, F.; PEEVER, R.; SU, H.; HEFT, R.; CHANG, T.M.; SCRIVER, C.R. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, n. 5, p. 2339-2344, 1999.
- SAUNDERS, R.M.; CONNOR, M.A; EDWARDS R.H.; KOHLER, G.O. Preparation of protein concentrates from shorts and wheat millrun by a wet alkaline process. *Cereal Chem.*, v. 52, n. 1, p. 93-101, 1975.
- SCHMIDL, M.K.; TAYLOR, S.L.; NORDLEE, J.A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.*, v. 48, p. 77-85, 1994.
- SCHIMIDT, B. J. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos. *Ped. al dia*, v.3, p. 257-260, 1987.
- SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. The hyperphenylalaninemias. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE D. (Ed). *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. p. 1015 - 1075, 1997.
- SHEN, J.L. Soy protein solubility: the effect of experimental conditions on the solubility of soy protein isolates. *Cereal Chem.*, v. 53, n. 6, p. 902-909, 1976.
- 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.*
- SIEMENSMA, A.D.; WEIJER, W.J.; BAK, H.J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 4, p. 16-21, 1993.
- SIGMA-ALDRICH. Bioquímicos e reagentes: para pesquisa de ciências da vida. São Paulo, 2004, 2944 p.
- SILVA, V.D.M. *Uso da pancreatina imobilizada em carvão ativado e em alumina no preparo de formulações sirtéticas para fenilcetonúricos, à base de soro de leite*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 119 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SILVESTRE, M.P.C., DAUPHIN, C., HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta.*, v. 282, p. 603-612, 1993.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hidrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, 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, n. 12, p. 2783-2789, 1994b.

- SMITHERS, G.; BRADFORD, R.S. New casein products: fresh opportunities for the dairy industry, *Food Res. Quart.*, v. 51, n. 1-2, p. 92 - 98, 1991.
- SOARES, R.L.D.; DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L.M.; AGUIAR, M.J.B.; JUNQUEIRA, R.G.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego do carvão ativado para a remoção de fenilalanina de leite em pó. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 22, n.1, p. 65-84, 2004.
- SOARES, R.D.L.; SANTOS, J.S.; KANUFRE, V.C.; STARLING, A.L.P.; REIS, D.G.; ALVES, M.R.A.; AGUIAR, M.J.B. Manutenção do aleitamento materno em crianças com fenilcetonúria: Protocolo de atendimento do Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais-PETNN-MG. In: XIV Congresso Brasileiro de Genética Clínica, 5, 2002, Ribeirão Preto (SP). *Anais, SBGC*, Ribeirão Preto (SP) p. 22.
- STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. *Rev. Méd. Minas Gerais*, v.9, 106-110, 1999.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 3. ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1988.
- SUGIMOTO, T.; TANAKA, K.; KASAI, Z. Molecular species in the protein body II (PB-II) of developing rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.*, v. 50, p. 3031-3035, 1986.
- SVENNING, C.; MOLLAND, T. ; LANGSRUD, T. ; VEGARUD, G.E.A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: *IDF (International Dairy Federation) Seminar on Protein & Fat globule modifications.*, p. 96-106, 1993.
- TAKASE, M.; FUKUWATERI, Y. ; KAWASE, K.; KIYOSOWA, I.; OGASA, K.; SUZUKI, S.; KUROUME, T. Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate. *J. Dairy Sci.*, v. 62, n. 10, p. 1570-1576, 1979.
- TANAKA, K.; YOSHIDA, T.; ASADA, K.; KASAI, Z. Subcellular particles isolated from aleurone layer of rice seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 155, p. 136-143, 1973.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, N.S.; SHELLHAMMER, T.H. Protein extraction from heat-stabilized rice bran 1 – Physical processing and enzyme treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 7444-7448, 2002.
- TESMER, E.; VETTER, M.; RAFFLER, G.; SCHWEIKHARDT, F. Process of making phenylalanine-free food for infants and small children. Milupa GmbH & Co. KG, Friedrichsdorf, Germany, Patents US 1996000682627, A23L 1/305, A23L 1/304; 09/10/1996; 07/04/1998.
- TRAHMS, C.M. Cuidado nutricional nos distúrbios metabólicos. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. *Alimentos nutrição e dietoterapia*. 9. ed. São Paulo: Roca, p. 745-775, 1998.
- USDA (United States Department of Agriculture). Nutrients database for standard reference: Rice, white, long grain, regular, raw, unenriched. Reference, Release 17, 2004. Disponível em: <[http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl)> . Acesso em 10 jan 2005.
- USP (Universidade do Estado de São Paulo). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2005. Disponível em <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>> . Acesso em 10 jan 2005.
- VASCONCELLOS A.M.H; SANTOS NETO, A.L.C.; GRASSIANO, D.M.; OLIVEIRA, C.P.H. Method for removing phenylalanine from acid hydrolysate of casein. *Biotechnol. Bioeng.* v. 56, p. 1324 - 1329, 1989.
- VENDRELL, J.; AVILÉS, F. Complete amino acids analysis of proteins by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 358, p. 401 – 413, 1986.

- VERNEUIL, B.; BRESSOLIER, P.H.; JULIEN, R. Quantification of amino acids and di- and tripeptides in nutritional interest protein hydrolysates by ligand exchange chromatography in combination with Edman degradation. 4<sup>th</sup> Symposium on Purification Technologies, p. 253-258, 1990.
- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.
- VISSER, S., SLANGEN, C. J., ROBBEN, A. J. P. M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, n. 1-2, p. 205-209, 1992.
- VONK, H.J.; WESTERN, J.R.H.; *Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion*. London: Academic Press, 1984. p. 94-129.
- WANG, L.; WANG, Y.J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, v. 39, n. 2, p. 291-296, 2004.
- WHITHAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food science*. 2. ed. California: Marcel Dekker, 1994. 625 p.
- YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, p. 123-179, 1975.
- YAMASHITA, M., ARAI, S.; FUJIMAKI, M. A low-phenylalanine, high-tyrosine plastein as an acceptable dietetic food. Method of preparation by use of enzymatic protein hydrolysis and resynthesis. *J. Food Sci.*, v. 41, n. 5, p. 1029-1032, 1976.
- YVON, M.; CHABANET C.; PÉLISSIER, J.P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid solution. *Int. J. Peptide Protein Res.*, v. 34, n.1, p. 166-176, 1989.
- 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.
- ZHANG, Y.; DORJPALAM, B; HO, C. T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose. *J. Agric. Food Chem.*, v. 40, n. 12, p. 2467 - 2471, 1992.
- ZHAO, Q.; SANNIER, F.; GARREAU, I.; LECOEUR, C.; PIOT, J.M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides: application to hemorphins. *J. Chromatogr. A*, v. 723, n. 1, p. 35-41, 1996.
- ZIEGLER, F; OLLIVIER, J.M.; CYNOBER, L.; MASINI, J.P.; COUDRAY-LUCAS, C.; LEVY, E.; GIBOUDEAU, J. Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides and non-degraded proteins. *Gut.*, v. 31, p.1277-1283, 1990.

## 142 Referências



# APÊNDICE

## OUTRAS PUBLICAÇÕES

### 1 ARTIGOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS ESPECIALIZADOS

#### 1.1 Temas diversos

BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluation of a functional properties of a blood protein. *Pakistan Journal of Nutrition*, (No prelo. Aceito em dezembro de 2004).

VIANA, F.V.; SILVA, V.D.M.; DELVIVO, F.M.; BIZZOTTO, C.S.; SILVESTRE, M.P.C. Quality of ham pâté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, (No prelo. Aceito em 20 de dezembro de 2004).

BOTELHO, F.V.; ENÉAS, L.R.; CESAR, G.C.; BIZZOTTO, C.S.; TAVARES, E.; OLIVEIRA, F.A.; GLÓRIA, M.B.A.; SILVESTRE, M.P.C.; ARANTES, R.M.E.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Effects of eggplant (*Solanum melongena*) on the atherogenesis and oxidative stress in LDL receptor knock out mice (LDLR<sup>-/-</sup>). *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 1259-1267, 2004

VIANA, F.R.; BIZZOTTO, C.S.; DIAS, D.R.; OLIVEIRA, A.L.; SILVESTRE, M.C.P. Bovine blood constituents as fat replacers in ham pâté. *Food Technology and Biotechnology*, v. 42, n. 1, p. 5-10, 2004.

VIANA, F.R.; SILVA, V.D.M.; BIZZOTTO, C.S.; LABOISSIÈRE, L.H.E.S.; DRUMOND, M.F.B.; OLIVEIRA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. Incorporação de globina e plasma bovinos, como substitutos de gordura em patê de presunto: efeito sobre a composição química, textura e características sensoriais. *Alimentos e Nutrição*, v. 14, n. 1, p. 77-85, 2004

### 2 RESUMOS DE ARTIGOS E ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO EM ANAIS DE CONGRESSOS E SIMPÓSIOS

#### 1.1 Relacionados ao tema do trabalho de dissertação

BIZZOTTO, C.S.; SOUZA, M.C.R.; LOPES, D.C.F.; SILVESTRE, M.P.C. Perfil peptídico e exposição de fenilalanina em hidrolisados protéicos. *XI Semana de Iniciação Científica da UFMG*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2002. Resumo 2w5w30.

SOUZA, M.C.R.; BIZZOTTO, C.S.; LOPES, D.C.F.; SILVESTRE, M.P.C. Remoção de fenilalanina em hidrolisados protéicos. *XI Semana de Iniciação Científica da UFMG*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2002. Resumo 2w5w1.

## 1.2 Temas diversos

SILVA, V.D.M.; VIANA, F.R.; BIZZOTTO, C.S.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Aproveitamento de proteínas sub-utilizadas como substituto de gordura em patê de presunto. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIENCIA DE ALIMENTOS, 5., 2003, Campinas. [Resumos] Campinas: Unicamp, 2003. 1 CD-ROM.

BIZZOTTO, C.S.; VIANA, F.R.; SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Composição química, textura e características sensoriais de patê de presunto com redução de gordura. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIENCIA DE ALIMENTOS, 5., 2003, Campinas. [Resumos] Campinas: Unicamp, 2003. 1 CD-ROM.

BOTELHO, F.V.; ENÉAS, L.R.; CÉSAR, G.C.; ARANTES, R.E.; SILVESTRE, M.P.C., GLORIA, M.B.A.; BIZZOTTO, C.S.; TAVARES, E.; MALACRIDA, C.R.; OLIVEIRA, F.A.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Efeito da ingestão da solução de *Solanum melongena* na aterogênese e no estresse oxidativo em camundongos deficientes do receptor de LDL. *XXIII Consórcio das Instituições Brasileiras das Áreas de Alimentação e Nutrição (XXIII CIBRAN)*. Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 2002.

Este trabalho recebeu o prêmio (1º lugar) de Menção Honrosa.

BOTELHO, F.V.; ENÉAS, L.R.; CÉSAR, G.C.; ARANTES, R.E.; SILVESTRE, M.P.C.; GLORIA, M.B.A.; BIZZOTTO, C.S.; TAVARES, E.; MALACRIDA, C.R.; OLIVEIRA, F.A.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Efeito da ingestão do extrato de *Solanum melongena* na aterogênese e no estresse oxidativo em camundongos deficientes do receptor de LDL. *III Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade & Qualidade de Vida*. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2002. Trabalho apresentado como Tema Livre.

Este trabalho foi selecionado entre os 4 melhores trabalhos científicos.

BOTELHO, F.V.; ENÉAS, L.R.; CESAR, G.S.; BIZZOTTO, C.S.; TAVARES, E.; MALACRIDA, C.R.; OLIVEIRA, F.A.; SILVESTRE, M.P.C.; GLORIA, M.B.A.; ARANTES, R.M.E.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Effects of *Solanum melongena* extracts on the atherogenesis and oxidative stress in LDL receptor knock out mice (LDLR<sup>-/-</sup>). *XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, Caxambu, Minas Gerais, Brasil, 2003.