

MICHELY CAPOBIANGO

**EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FUBÁ DE
MILHO E OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS
PROTÉICOS COM BAIXO TEOR DE
FENILALANINA**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2006

MICHELY CAPOBIANGO

**EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FUBÁ DE
MILHO E OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS
PROTÉICOS COM BAIXO TEOR DE
FENILALANINA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre

Co-orientador: Prof. Dr. José Virgílio Coelho

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2006

A todos que sempre apoiaram...

... especialmente, meus pais, Emilson e Helena,

meus irmãos Emilson Filho e Gabriela.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades na vida.

À Professora Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre, por ter me recebido tão bem no laboratório, pela orientação deste trabalho, pela confiança, amizade, incentivos e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. José Virgílio Coelho, co-orientador deste trabalho, pela disposição de ensinar, incentivo e serenidade.

Aos Professores Dra. Maria Beatriz de Abreu Glória, Dr. Valbert Nascimento Cardoso, Dr. Sérgio Duarte Segall, pelas importantes contribuições na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira pelos esclarecimentos e ajuda sempre atendendo às inúmeras dificuldades, sem medir esforços para discutir resultados.

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.

Às funcionárias da secretaria de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pelas colaborações.

Ao funcionário Marcos pela constante convivência e ajuda.

Especialmente, aos meus pais, Emilson e Helena, por me incentivar e me apoiar sempre, pela confiança, e exemplo de vida.

Aos meus irmãos, Emilson e Gabi, pelo carinho, amor e amizade.

Aos meus primos, Fernanda, Paula e Hugo, pela convivência, amizade e paciência.

Aos meus grandes amigos que me incentivaram e apoiaram. Pelos grandes momentos de diversão e aprendizado.

A todos os amigos do Laboratório, pela convivência diária e ajuda constante na realização deste trabalho, pela amizade e momentos de descontração.

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

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1 DADOS RELEVANTES DO MILHO.....	12
1.1 Características agrônômicas e sócio-econômicas do milho.....	12
1.2 Estrutura do grão.....	14
1.3 Classificação.....	15
1.4 Composição centesimal.....	16
1.5 As proteínas do milho.....	17
1.6 Valor nutricional do milho.....	18
2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO QUÍMICA DAS PROTEÍNAS.....	19
3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS.....	21
4 FENILCETONÚRIA.....	23
4.1 Diagnóstico e tratamento.....	24
4.2 Substitutos protéicos.....	26
5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS.....	27
5.1 Corolase PP.....	29
6. MÉTODOS DE REMOÇÃO DE FENILALANINA.....	30
7. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENILALANINA.....	31
TRABALHO EXPERIMENTAL.....	33
1 APRESENTAÇÃO.....	33
2 CAPÍTULOS.....	
2.1 CAPÍTULO I Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho	34
2.2 CAPÍTULO II Ação da corolase PP e uso do carvão ativado na obtenção de hidrolisados protéicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina.....	50
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE TABELAS

	Páginas
1 Produção, importação e exportação de milho.....	13
2 Composição centesimal aproximada das principais partes do milho.....	17
3 Distribuição das frações de proteínas no milho (% base seca).....	17
4 Conteúdo de aminoácidos essenciais da proteína do gérmen e do endosperma do milho.....	18
5 A qualidade de proteína do milho e de outros grãos de cereais.....	19
I.1 Parâmetros utilizados na extração enzimática das proteínas do fubá de milho.....	41
I.2 Composição centesimal do fubá de milho.....	43
I.3 Teor de proteínas no resíduo e rendimento da extração química das proteínas do fubá de milho, com diferentes métodos de extração.....	43
I.4 Teor de proteínas no resíduo e rendimento da extração enzimática das proteínas do fubá de milho.....	45
II.1 Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados de proteínas obtidas do fubá de milho pela ação da corolase PP.....	55
II.2 Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de fubá de milho, obtidos pela ação da corolase PP.....	58
II.3 Efeito da relação proteína: carvão sobre a remoção de fenilalanina....	65
II.4 Efeito do modo de emprego de CA sobre a remoção de fenilalanina...	66

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
1 Distribuição percentual de milho no mundo.....	13
2 Distribuição do consumo de milho no Brasil.....	14
3 Estrutura do grão de milho.....	15
4 Vias metabólicas da Phe dependentes da fenilalanina-hidroxilase e BH₄	34
5 Principais etapas do trabalho experimental desenvolvido no capítulo 1	34
6 Principais etapas do trabalho experimental desenvolvido no capítulo 2	52
I.1 Efeito da temperatura no rendimento da extração enzimática.....	47
I.1 Efeito do tempo no rendimento da extração enzimática.....	48
II.1 Efeito da concentração do extrato protéico sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.....	61
II.2 Efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.....	62
II.3 Efeito da liofilização sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA: carvão ativado

E:S: relação entre a proporção (p/p) da enzima e do substrato

EDS: espectrofotometria derivada segunda

EPF: extrato protéico de fubá de milho

FAO: Food and Agriculture Organization

HPA: hiperfenilalaninemia

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

Phe: fenilalanina

PKU: fenilcetonúria

Trp: triptofano

Tyr: tirosina

UV: ultravioleta

RESUMO

Levando-se em conta a posição que ocupa o milho na dieta do brasileiro, este cereal foi utilizado neste trabalho como matéria-prima para o desenvolvimento de formulações dietéticas à base de hidrolisados protéicos, visando sua incorporação na dieta de fenilcetonúricos. Diferentes métodos químicos e um enzimático foram testados para a extração das proteínas do fubá de milho. Dentre os métodos químicos testados, o alcalino-alcoólico seqüencial foi o mais eficiente, tendo alcançado 88 % de rendimento. No método enzimático, empregando uma protease de *Bacillus liccheniformis*, as variáveis, tempo e temperatura influenciaram a extração protéica, sendo os melhores resultados obtidos a 5, 15 e 24 h a 55 °C, atingido-se uma média de 84 % de rendimento. Em seguida, foram preparados dez hidrolisados enzimáticos a partir do extrato protéico obtido, utilizando-se a corolase PP. Diversas condições, tais como, concentração protéica inicial, relação enzima:substrato, emprego da liofilização, relação proteína: carvão e o modo de emprego do carvão ativado foram testadas, com o intuito de se obter um baixo teor final de fenilalanina. Após passagem dos hidrolisados por coluna de carvão ativado para remover a Phe, este aminoácido foi dosado por espectrofotometria derivada segunda. O emprego da enzima corolase PP e o uso do carvão ativado mostraram ser eficientes, obtendo-se hidrolisados com teor final de Phe dentro do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Palavras-chaves: fubá de milho, extração protéica, enzimas, hidrolisados protéicos, carvão ativado, remoção de fenilalanina.

ABSTRACT

Extraction of proteins from Brazilian corn flour and obtention of protein hydrolysates with low phenylalanine content. Considering the important position of corn in the diet of the Brazilian people, this cereal was used as raw matter to prepare dietary supplements for phenylketonuria based on protein hydrolysates. Initially, different chemical methods and an enzymatic one were tested for protein extraction from Brazilian corn flour. For the chemical extraction, the sequential alkaline-alcoholic method was the most efficient, reaching a yield of 88 %. For the enzymatic extraction, a protease of *Bacillus licheniformis* was used. The time and the temperature employed in this method influenced the extraction yield. The best results were obtained for 5, 15 and 24 h at 55 °C, reaching a yield of 84 %. Then, ten enzymatic hydrolysates were prepared by the action of corolase PP. Aiming the reduction of phenylalanine content, different conditions were tested, such as protein extract concentration; enzyme:substrate ratio; protein:activated carbon ratio; mode of use of activated carbon and the use of lyophilization. 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 corolase PP and the activated carbon showed to be efficient to obtain protein hydrolysates with Phe content within the limit established Brazilian legislation.

Key-words: Corn flour, protein extraction, enzymes, protein hydrolysates, activated carbon, phenylalanine removal.

INTRODUÇÃO

Os grãos de cereais constituem a principal fonte alimentar da maioria das pessoas nos países em desenvolvimento, e esforços têm sido feitos no sentido de aumentar sua produção. No caso do milho, o melhoramento genético e o aumento da eficiência tecnológica têm contribuído para isto. Nos países em desenvolvimento, a maior parte da produção de milho é destinada ao consumo humano, enquanto que nos países desenvolvidos a produção é destinada à indústria e ração animal. Por causa desta importância na alimentação, o melhoramento genético tem tido um importante papel no desenvolvimento de genótipos com alta qualidade e conteúdo protéico (FAGEER & TINAY, 2004).

Levando-se em conta a posição que ocupa o milho na dieta do brasileiro, seria de grande interesse utilizá-lo como matéria-prima para o desenvolvimento de suplementos dietéticos, à base de proteínas. Estes produtos possuem diversas aplicações relevantes para as áreas de nutrição e saúde (alimentação de idosos e crianças, prevenção e/ou tratamento de doenças, etc.), como também, a obtenção de ingredientes ou agentes funcionais para alimentos e medicamentos. Dado o grave problema econômico e social do tratamento de pacientes com fenilcetonúria (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003), a presente pesquisa foi direcionada para o desenvolvimento de formulações dietéticas à base de hidrolisados protéicos para estes pacientes.

Segundo KAMPEN (1995), 85 a 90 % das proteínas do milho compõem a fração glutelina e prolamina, solúveis em soluções alcalina e alcoólica, respectivamente. Na maioria dos trabalhos encontrados sobre a extração química das proteínas de cereais, o etanol e uma solução de hidróxido de sódio são empregados como solventes em concentrações variadas (LANDRY & MOUREAUX, 1970; PAULIS & WALL, 1977; NEWMANN & WALL, 1984; LANDRY, 1997; YOUSIF & TINAY, 2000; FAGEER & TINAY, 2004).

Os trabalhos encontrados na literatura, abordando a extração enzimática de proteínas, foram realizados com outros alimentos, tais como arroz e soja, na obtenção de um isolado protéico (EUBER et al., 1991; FISCHER et al., 2001; TANG et al., 2002; WANG & WANG, 2004; AGBOOLA et al., 2005), não sendo encontrados relatos que utilizassem o milho e derivados. Em alguns trabalhos, o interesse dos autores estava voltado para a separação das proteínas (EUBER et al., 1991; FISCHER et al., 2001,

TANG et al., 2002). Em outros casos, a utilização deste método estava associada à separação do amido (WANG & WANG, 2004, AGBOOLA et al., 2005).

A fenilcetonúria (PKU) é o resultado de um erro inato do metabolismo, de herança autossômica recessiva. Caracteriza-se por um defeito ou deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase, que é responsável pela conversão da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). Sem a restrição da ingestão de fenilalanina da dieta, este aminoácido e seus metabólitos se acumulam no sangue e em outros tecidos, e a Tyr se torna ausente, afetando o sistema nervoso (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS et al., 1996; OUTINEN et al., 1996; TRAHMS, 1998; PIETZ et al., 1999; SHIMAMURA et al., 1999).

O tratamento da fenilcetonúria consiste em dieta alimentar específica e individualizada, com controle da ingestão diária de fenilalanina, complementada por fórmula de aminoácidos, especialmente elaborada para essa doença. Desta forma, o uso de substitutos protéicos, constituídos de misturas de L-aminoácidos ou de hidrolisados protéicos, torna-se indispensável (MILUPA, 1995). No Brasil, os produtos disponíveis são importados, de alto custo e constituídos apenas de aminoácidos livres (ACOSTA & YANNICELLI, 1997). Além disso, a dieta é composta de verduras, legumes e frutas.

Hidrolisados protéicos são produtos destinados, primeiramente, para uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional. Nos anos 70 iniciou-se no Japão a investigação sobre a possibilidade de produção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina (MIRA & MARQUEZ, 2000). O processo enzimático é o mais indicado para a produção de tais hidrolisados, pois preserva as propriedades sensoriais e não promove aumento na osmolaridade do meio (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

Diversos autores estudaram a produção desses hidrolisados em escala laboratorial, alguns em escala piloto, que consistem de duas etapas: 1) liberação da fenilalanina pela hidrólise enzimática e 2) remoção da fenilalanina liberada por técnicas e procedimentos diferenciados (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993).

Considerando que em nosso país as formulações usadas em suplementos nutricionais são, normalmente, importadas e de elevado custo, o interesse do laboratório onde foi realizado o presente estudo voltou-se para a preparação destas formulações, contendo os hidrolisados protéicos como a principal fonte de aminoácidos na forma mais disponível, isto é, de oligopeptídeos, especialmente di e tri-peptídeos. Por esta razão, diversos hidrolisados protéicos têm sido preparados e diferentes condições hidrolíticas

testadas neste laboratório, para obter perfis peptídicos adequados nutricionalmente (SILVESTRE et al., 1994a,b; MORATO et al., 2000; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; MORAIS et al., 2005; LOPES et al., 2005a,b).

Este trabalho teve como objetivos otimizar a extração da proteína do fubá de milho, por alguns métodos químicos e um enzimático, e avaliar a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos de fubá de milho, obtidos pela ação da corolase PP e do uso do carvão ativado (CA), empregando diferentes condições de hidrólise, relação proteína: carvão e o modo de emprego do carvão ativado.

REVISÃO DE LITERATURA

1 DADOS RELEVANTES DO MILHO

1.1 Características agrônômicas e sócio-econômicas do milho

O milho, juntamente com o arroz e o trigo, constituem um dos mais importantes grãos de cereais no mundo, fornecendo nutrientes para seres humanos e animais e servindo como material básico para a produção de amido, óleo e proteína, bebidas alcoólicas, adoçantes e, mais recentemente, como combustível.

Botanicamente, o milho ou *Zea mays* pertence à família das gramíneas (Gramineae). O seu plantio originou-se mais provavelmente na América Central, particularmente no México, de onde se estendeu ao norte do Canadá e Sul da Argentina, alcançando posteriormente a Europa (FAO, 1992).

MANGELSDORF & REVES (1939) demonstraram que o milho cresce em diversas regiões agrícolas do mundo (FAO, 1992), podendo crescer em altas e baixas altitudes nos trópicos e acima de 50° de latitude nas regiões temperadas (EVERES [s.d.]).

O potencial de crescimento geográfico para o milho é maior que muitos outros grãos de cereais e sua distribuição mundial por região é demonstrada na Figura 1.

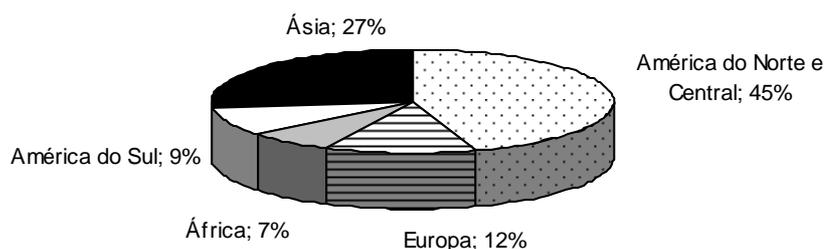


Figura 1 - Distribuição percentual de milho no mundo.

Fonte: EVERES [s.d.].

O milho é o cereal que apresenta maior produtividade, comparado com os outros grãos, com uma média mundial de 4,3 toneladas por hectare durante os últimos três anos, superior às 3,8 e 2,7 toneladas por hectare para o arroz e o trigo, respectivamente (EVERES [s.d.]). A importância econômica da produção de milho no Brasil e no mundo está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Produção, importação e exportação de milho

Região ou País	Produção ^a	Importação ^b		Exportação ^b	
	(milhões de toneladas)	(milhões de toneladas)	(milhões de dólares)	(milhões de toneladas)	(milhões de dólares)
Mundo	692.034	83.273	14.593	83.266	11.775
Brasil	34.859	330	36	5.031	597.336

^a referente ao ano de 2005. Fonte: FAO (2006).

^b referente ao ano de 2004. Fonte: FAO (2006).

No ano de 2005, o Brasil alcançou uma superfície cultivada de 12.960 milhões de hectares, com um rendimento de 30.396 hectograma/hectare. O consumo *per capita* de milho no Brasil foi de 21,0 kg/habitante no ano de 2002, fornecendo cerca de 180 calorias/dia e 4,0 g proteína/dia por habitante (FAO, 2006).

Os principais *cultivares* de milhos destinados á produção de alimentos incluem o verde (doce), o de pipoca e o ceroso ou farináceo. O milho farináceo é um grão com o endosperma macio, muito usado na obtenção de amido e como alimento no México,

Guatemala e Países Andinos. O milho duro é muito utilizado na indústria de ração para animais e para produção de silagem (FAO, 1992; EMBRAPA, 2006). Não foi encontrado na literatura o tipo de milho mais consumido no Brasil.

O milho possui várias finalidades, podendo ser destinado ao consumo humano, como ração para criações de animais, sendo esta a sua principal utilização, e é uma das principais matérias primas para a indústria de alimentos. Desse cereal, é possível obter óleo, fubá, canjica, grifos, farelo, amido, amilose, amilopectina, zeína e fibras. Uma das principais aplicações do milho na indústria de alimentos é o uso do grão desgerminado e moído para a produção de *fast food* em forma de alimentos extrusados conhecidos como *snacks*. O uso depende da região e das influências da população onde é consumido (EVERES [s.d.]; GONÇALVES et al., 2003). A Figura 2 a seguir demonstra as principais distribuições do consumo do milho no Brasil.

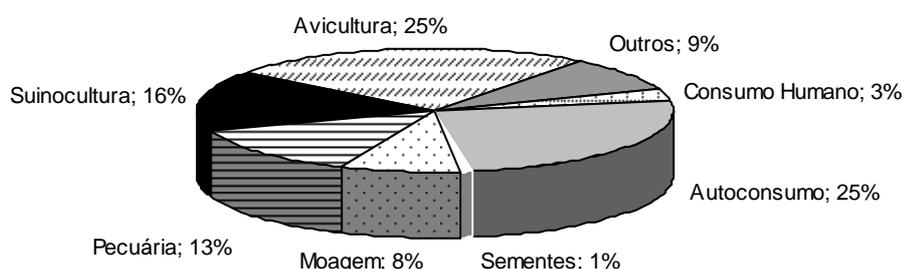


Figura 2 - Distribuição do consumo de milho no Brasil.

Fonte: Pessoa, 2004.

1.2 Estrutura do grão

O grão de milho bruto contém uma camada externa e a semente propriamente dita (Figura 3), sendo formado pelo pericarpo, gérmen ou embrião e o endosperma (FAO, 1992). O endosperma corresponde à maior parte do grão de milho e é composto basicamente de amido (aproximadamente 80 %), além de outros 7 % de glúten que envolvem os grânulos de amido e de pequena porcentagem de gordura e demais componentes. A película é a parte que recobre o grão. Devidamente processada, ela é empregada como ingrediente em rações animais. A água corresponde a

aproximadamente 16 % do grão de milho. O gérmen é a parte vegetativa do grão e fonte de óleo do milho, é um componente importante para alimentos, produtos farmacêuticos e aplicações industriais. As frações remanescentes do gérmen são processadas e podem ser utilizadas como ingredientes em rações animais (Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho - Abimilho, 2004).

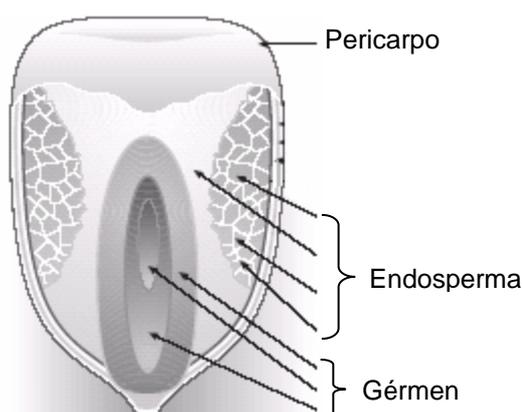


Figura 3 – Estrutura do grão de milho

Fonte: FAO, 1992

1.3 Classificação

Segundo a Portaria nº 11, de 12 de abril de 1996, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Secretaria de Desenvolvimento Rural (BRASIL, 2004), o milho sob a forma de grãos, destinado à comercialização interna, é classificado em grupos, classes e tipos, segundo sua consistência, coloração e qualidade.

Assim sendo, o milho, segundo a sua consistência é classificado em 4 (quatro) grupos, duro, mole, semiduro e misturado. O duro apresenta o mínimo de 95 %, em peso, com as características de duro, e uma quantidade de endosperma córneo maior que a amiláceo (farináceo), apresenta a forma predominantemente ovalada e com a coroa convexa e lisa, característica do *Zea mays* indurata. O mole apresenta o mínimo de 90 %, em peso, com as características de mole, uma quantidade de endosperma amiláceo ou farináceo maior que a do córneo, é predominantemente dentado e com a coroa apresentando uma contração ou depressão/ característica de *Zea mays* indentada. O semiduro apresenta o mínimo de 75%, em peso, de consistência semi-dura, intermediária entre duro e mole. O misturado não está compreendido nos grupos anteriores,

especificando-se no "certificado de classificação" as percentagens da mistura de outros grupos.

O milho, segundo a sua coloração, é ordenado em 3 (três) classes amarelo, branco e mesclado. O amarelo é constituído de milho que contenha no mínimo 95 %, em peso, de grãos amarelos, amarelo pálido e/ou amarelo alaranjado. O branco é constituído de milho que contenha no mínimo 95 %, em peso, de grãos brancos. O mesclado é constituído de milho que não se enquadre nas exigências das classes de milho branco e do amarelo, mencionando-se no "certificado de classificação" a percentagem das classes que o compõe.

E segundo a sua qualidade, é classificado em 3 (três) tipos, tipo 1, tipo 2 e tipo 3, sendo todos constituídos de milho seco, grãos regulares e com umidade de 14,5 %, variando a tolerância de matérias estranhas. O tipo 1 tem tolerância máxima de 1,5 % de matérias estranhas, impurezas e fragmentos; 11 % de grãos avariados, com máximo de 3 % de grãos ardidos e brotados (percentagem em peso). O tipo 2 tem tolerância máxima de 2 % de matérias estranhas, impurezas e fragmentos; 18 % de grãos avariados, com máximo de 6 % de grãos ardidos e brotados (percentagem em peso). O tipo 3 tem tolerância máxima de 3 % de matérias estranhas, impurezas e fragmentos; 27 % de grãos avariados, com máximo de 10 % de grãos ardidos e brotados (percentagem em peso).

1.4 Composição centesimal

Há diferenças importantes na composição química do milho entre as suas principais partes, que pode variar de acordo com o tipo de semente, tipo de solo, qualidade do fertilizante e condições climáticas. O pericarpo é caracterizado pelo elevado conteúdo de fibra (87 %), dos quais 67 % correspondem à hemicelulose, 23 % à celulose e 0,1 % à lignina (FAO, 1992). O endosperma possui os maiores conteúdos de amido, por volta de 9 % de proteína e baixo conteúdo lipídico. Finalmente, o gérmen é caracterizado pela alta fração lipídica (35 %) e também contém uma quantidade relativamente elevada de proteína e minerais, como pode ser observado na Tabela 2. (TOSELLO, 1987)

Tabela 2 - Composição centesimal aproximada das principais partes do milho

Fração	Grão(%)	Amido (%)	Proteína (%)	Lipídios(%)	Açúcares(%)	Cinza (%)
Grão inteiro		71,5	10,3	4,8	2,0	1,4
Endosperma	82,3	86,4	9,4	0,8	0,6	0,3
Embrião	11,5	8,2	18,8	34,5	10,8	10,1
Pericarpo	5,3	7,3	3,7	1,0	0,3	0,8
Ponta	0,8	5,3	9,1	3,8	1,6	1,6

Fonte: TOSELLO (1987).

1.5 As proteínas do milho

O milho é umas das principais fontes de alimentos para milhões de pessoas, principalmente na América Latina e África, sendo uma fonte de carboidratos e proteínas. O conteúdo de proteínas em diferentes tipos de milho varia entre 6 a 12% na base seca, sendo que aproximadamente 75% das proteínas estão contidas no endosperma.

As proteínas do grão de milho podem ser classificadas em seis frações de acordo com LANDRY & MOUREAUX (1970), como albumina, globulina, zeína, glutelina 1, glutelina 2 e glutelina 3. A zeína é caracterizada pela classe de prolaminas, que ocorre especificamente em cereais, e é a maior classe das proteínas constituintes do milho, aproximadamente 45 – 50 %. A tabela a seguir demonstra a distribuição das frações de proteínas e sua solubilidade.

Tabela 3 - Distribuição das frações de proteínas no milho (% base seca)

Proteína	Solubilidade	Grão inteiro	Endosperma	Gérmen
Albumina	água	8	4	30
Globulina	sal	9	4	30
Glutelinas	álcali	40	39	25
Zeína	álcool	39	47	5

Fonte: SHUKLA et al., 2000.

O conteúdo de aminoácido da proteína do gérmen é bastante diferente das do endosperma. Os aminoácidos essenciais estão expressados na Tabela 4 como

porcentagem de miligrama do peso (mg %) e como miligrama por grama de Nitrogênio (mg/g N).

Tabela 4 - Conteúdo de aminoácidos essenciais da proteína do gérmen e do endosperma do milho

Aminoácido	Endosperma ^a		Gérmen ^b		FAO/WHO
	mg %	mg /g N	mg %	mg /g N	
Triptofano	48	38	144	62	60
Treonina	315	249	622	268	250
Isoleucina	365	289	578	249	250
Leucina	1 024	810	1 030	444	440
Lisina	228	180	791	341	340
Total aminoácidos sulfurados	249	197	362	156	220
Fenilalanina	359	284	483	208	380
Tirosina	483	382	343	148	380
Valina	403	319	789	340	310

^a1,16 % Nitrogênio.

^b2,32 % Nitrogênio

Fonte: FAO, 1992.

A proteína do gérmen contribui com uma quantidade relativamente alta de certos aminoácidos, embora não forneça o bastante de proteína de alta qualidade. O gérmen fornece lisina e triptofano, dois aminoácidos essenciais limitantes na proteína do milho. A proteína do endosperma é pobre em lisina e triptofano, como a proteína do grão inteiro.

1.6 Valor nutricional do milho

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

Uma comparação da qualidade da proteína do milho e de outros cereais é demonstrada na Tabela 5, expressa como % de caseína, usada como proteína de

referência. A qualidade protéica do milho comum é similar a de outros cereais exceto à do arroz. Ambos, milho Opaco-2 e QPM (*Quality Protein Maize*) têm uma qualidade protéica não só mais alta do que a do milho comum, mas também significativamente mais elevada que de outros grãos de cereais (FAO, 1992).

Tabela 5- A qualidade de proteína do milho e de outros grãos de cereais

Cereal	Qualidade protéica (%) *
Milho comum	32,1
Milho Opaco-2	96,8
Milho QPM (<i>Quality Protein Maize</i>)	82,1
Arroz	79,3
Trigo	38,7
Aveia	59,0
Sorgo	32,5
Cevada	58,0
Centeio	64,8

* em relação à caseína (proteína de referência).
Fonte: FAO (1992).

2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO QUÍMICA DAS PROTEÍNAS

Diferentes procedimentos para a extração química das proteínas do milho são relatados na literatura, nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração podem variar no intuito de aumentar o rendimento do processo.

Na maioria dos trabalhos, o etanol e uma solução de hidróxido de sódio são empregados como solventes em concentrações variadas. Geralmente no milho, a fração protéica solúvel em etanol é maior do que a fração solúvel em álcali, e ambas constituem 80-90 % da proteína do milho (KAMPEN, 1995).

Em alguns casos o etanol foi empregado isoladamente com o objetivo de extrair as zeínas do milho (DICKY et al., 1998, 1999; SHUKLA et al., 2000). As melhores condições de extração da zeína do grão de milho foram determinadas por SHUKLA et al. (2000), que extraíram as zeínas com etanol a 70 % na proporção 8:1 líquido/sólido por

30-40 min a uma temperatura de 50 °C. A recuperação média das zeínas foi 50,6 % do total das proteínas do milho.

Em outros estudos, além do etanol empregou-se também uma solução de hidróxido de sódio (KAMPEN, 1995; HOJILLA-EVANGELISTA et al., 1992). Assim HOJILLA-EVANGELISTA et al. (1992) recuperaram 57 % das proteínas do milho floculado extraídas com etanol a 45 % e NaOH a 55 % a 0,1M.

KAMPEN (1995) patenteou um processo de recuperação de proteínas do grão de milho envolvendo a solubilização das proteínas em pH alcalino. Uma quantidade suficiente de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio foi adicionada para ajustar o pH de 9 a 12. Em seguida a solução de etanol a 60 % foi adicionada e agitada continuamente por 45 min. O resíduo foi separado do sobrenadante por centrifugação. O pH do sobrenadante foi ajustado a 8, pela adição de ácido sulfúrico ou clorídrico. Um concentrado protéico com 85 % do total de nitrogênio foi obtido por um processo de microfiltração em membrana.

Alguns autores utilizaram o cloreto de sódio com o hidróxido de sódio e/ou etanol (LANDRY & MOUREAUX, 1970; PAULIS & WALL, 1977; NEWMANN & WALL, 1984; LANDRY, 1997; YOUSIF & TINAY, 2000; FAGEER & TINAY, 2004). Assim PAULIS & WALL (1977) utilizaram NaCl a 0,5 M e, posteriormente, etanol a 70 % para extraírem as proteínas do endosperma do milho solúveis em sal e a zeína, respectivamente, e em seguida etanol a 70 %, acetato de sódio a 0,5 % e mercaptoetanol a 0,1 M para obterem as glutelinas. A extração com NaCl e etanol removeu 4 % e 41 % do total de nitrogênio, respectivamente, e a glutelina continha 20 % do total de nitrogênio.

Procedimentos mais complexos de extração das proteínas do milho, envolvendo a utilização de solventes diversos, foram, igualmente, relatados na literatura. Assim LANDRY e MOUREAUX (1970) descreveram um procedimento de extração de proteínas do grão de milho por fracionamento, no qual foram utilizados como meio extratores água destilada a 4 °C e solução de NaCl a 0,5 M, obtendo as frações 1 e 2, que continham albumina e globulina, aminoácidos livres e pequenos fragmentos de peptídeos, respectivamente. Em seguida, a terceira fração foi extraída com etanol a 60 % a 20 °C e 60 °C, e isopropanol a 55 % a 20 °C, isolando as prolaminas ou zeínas. A quarta fração, contendo glutelina tipo 1, foi separada com o uso de uma mistura de etanol a 60 %, 2-mercaptoetanol a 0,6 %, isopropanol a 55 % e 2-mercaptoetanol a 20 °C. Para se obter a quinta fração, glutelina tipo 2, empregou-se tampão borato pH 10 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,0125 M e NaOH a 0,02 M), com 2-mercaptoetanol a 0,6 % e NaCl a 0,5 M. E por último,

a sexta fração contendo glutelina tipo 3, foi obtida pela utilização de tampão borato pH 10 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,0125 M e NaOH a 0,02 M), com 2-mercaptoetanol a 0,6 % e sulfato dodecil de sódio a 0,5 %. Este procedimento foi também utilizado por YOUSIF & TINAY (2000) que reportaram uma recuperação de aproximadamente 99 % do total de proteínas, que foi confirmada por FAGEER & TINAY (2004). LANDRY (1997) empregando a mesma metodologia recuperou 63,4 % do total de proteínas, retendo apenas as frações 2, 3 e 4.

NEWMANN & WALL (1984) obtiveram um concentrado protéico a partir do milho em grão por duas seqüências diferentes de extração, recuperando mais de 96 % do total das proteínas para todas as amostras. As proteínas foram extraídas inicialmente com NaCl a 0,5 M durante 1 h a 4 °C e o resíduo lavado com água e novamente extraído com etanol a 70 % por 3 h à temperatura ambiente (25 °C). A partir de então, o resíduo foi submetido às duas seqüências de extração. Na primeira, foi utilizado como meio extrator o etanol a 70 % contendo 2-mercaptoetanol a 0,6 % por 1 h à temperatura ambiente (25 °C). Na segunda, o resíduo foi extraído com dodecil sulfato de sódio a 0,5 % em tampão borato a 0,025 M pH 10, por 3 h à temperatura ambiente (25 °C). Os respectivos resíduos das duas seqüências foram, posteriormente, extraídos com dodecil sulfato de sódio a 0,5 %, em tampão borato a 0,025 M pH 10, contendo 2-mercaptoetanol a 0,6 % por 1 h à temperatura ambiente.

3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS

Recentes trabalhos têm demonstrado que a extração enzimática do amido da farinha de cereais pode ser usada para produzir isolados ricos em proteínas, recuperando mais de 76 % destes compostos (AGBOOLA et al., 2005). Muitos autores têm utilizado diversas preparações enzimáticas na obtenção de extratos protéicos de soja, arroz e trigo (EUBER et al., 1991; FISCHER et al, 2001; TANG et al., 2002; WANG & WANG, 2004; AGBOOLA et al, 2005).

Para o preparo de um concentrado protéico de arroz, EUBER et al. (1991) utilizaram um sistema de amilase e proteases. O arroz foi primeiramente tratado com a α -amilase, em seguida, 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 diferentes tipos de proteases, em condições variadas de tempo (1 a 5 h), temperatura (40 a 60 °C) e pH (6,5 a 9,0). A quantidade de enzima utilizada

variou de 1 a 4 % em relação ao substrato. O pH final foi ajustado a 6,5-7,5 com ácido fosfórico ou acético. A protease foi inativada com aquecimento a 85-95 °C por 10 min. Os resultados alcançados foram específicos para cada tipo de enzima utilizada. Assim, para a associação de uma protease neutra de origem fúngica, com uma protease neutra bacteriana obtiveram-se 73,6 % de extração. Por outro lado, utilizando uma protease alcalina bacteriana este valor caiu para 47 %, enquanto que para uma protease neutra de origem fúngica foram alcançados 61 % de extração. Para o uso da pancreatina, os melhores resultados foram obtidos usando a relação enzima:substrato (E:S) de 2 %, com temperatura na faixa de 45-55 °C e o tempo de hidrólise que mostrou ser o mais eficiente foi de 3, 4 e 5 h. O rendimento das melhores condições testadas foi de 75 %.

FISCHER et al. (2001) avaliaram a extração de proteínas da farinha de soja desengordurada pelo uso de preparações enzimáticas contendo uma endoprotease (alcalase de grau alimentício do *Bacillus licheniformis*), um complexo de proteases (flavourzima do *Aspergillus oryzae*), seguido de uma preparação de carboidrase do *Aspergillus aculeatus* e do *Humicola insolens*. Diferentes condições de hidrólise foram testadas. A quantificação de proteínas e carboidratos do resíduo obtido foi utilizada para avaliar a extração. O uso das proteases mostrou-se eficiente na obtenção de 89-94 % das proteínas da farinha de soja, já as carboidrases não contribuíram na extração de proteínas. Entretanto, os autores sugeriram que a extração incompleta das proteínas se deve à interferência da matriz, provavelmente devido às interações entre proteínas e outros constituintes da amostra.

TANG et al. (2002) avaliaram o tratamento enzimático combinado ou não com processos físico na extração de proteínas do arroz desengordurado. A utilização de agitador ultrasônico combinado com uma amilase e uma protease extraíram 54-57,8 % das proteínas. A agitação, seguida do tratamento com amilase e protease, extraiu 5 % a mais de proteínas do que o tratamento sem agitação. E o emprego da alta pressão, combinado com as enzimas, extraiu 61,8 a 66,8 % de proteínas. Estes resultados sugerem que os processos físicos combinados com os tratamentos enzimáticos podem ser eficientes na extração de proteínas do arroz. Entretanto, comparando com os resultados de EUBER et al. (1991) não se observa vantagem do uso de processos físicos.

WANG & WANG (2004) avaliaram a extração protéica com o objetivo de obter amido do arroz. Assim, foi empregada uma protease neutra do *Bacillus subtilis*, (pH 7,5 a 55 °C) e a combinação dessa protease com o ultrassom. A concentração de enzima usada variou de 0,01; 0,03 e 0,05 % (p/p), e o tempo de ação da protease foi de 1,

2 e 5 horas, com agitação contínua em agitador magnético. O emprego da protease, isoladamente, provocou um aumento no teor de proteína do resíduo e, conseqüentemente, uma diminuição no rendimento da extração de proteínas. Isto ocorreu, possivelmente, devido ao menor tempo de reação da protease, que pode ter sido inativada pelo ultrassom.

4 FENILCETONÚRIA

As hiperfenilalaninemias (HPA) consistem de uma desordem primária do sistema de hidroxilação da fenilalanina (Phe). São diversos os tipos de hiperfenilalaninemias encontrados, dependentes do erro metabólico envolvido, formando, assim, um grupo heterogêneo de doenças, incluindo a fenilcetonúria clássica, a fenilcetonúria leve, a hiperfenilalaninemia transitória e as várias formas de deficiência de tetrahydrobiopterina (BH₄) (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

A fenilcetonúria (PKU) clássica é a mais comum das HPA. Nesse distúrbio, a fenilalanina não é metabolizada em tirosina devido à deficiência ou inatividade da fenilalanina hidroxilase, resultando no acúmulo de Phe no sangue e nos tecidos e na produção de metabólitos, como fenilactato, fenilacetato e fenilpiruvato, que acarretam retardo mental, microcefalia, hiperatividade ou comportamento autista, tremor, falhas de crescimento, convulsões, menor pigmentação da pele e cabelos e odor característico na urina. Esse quadro aparece quando o paciente não é diagnosticado e tratado precocemente (MIRA & MARQUEZ, 2000; SOUZA et al., 2002; SIRTORI et al., 2005).

A Phe é convertida em Tyr por meio de um sistema de hidroxilação complexo, envolvendo várias enzimas e coenzimas. A fenilalanina hidroxilase é responsável por inserir um átomo de oxigênio na Phe para formar o grupo hidroxila da Tyr. Esta enzima requer um co-fator, a tetrahydrobiopterina (BH₄), que transporta elétrons do NADH para o O₂ na hidroxilação da Phe. Durante a reação de hidroxilação, a coenzima é oxidada a dihydrobiopterina e, subseqüentemente, é reduzida novamente pela ação da enzima dihydrobiopterina redutase. O cofator BH₄ é essencial nas reações de hidroxilação da Phe, da Tyr e do triptofano (Trp) (STRYER, 1988; MARCO & WAITZBERG, 2000). A deficiência de BH₄ produz distúrbios no metabolismo destes aminoácidos, diminuindo a formação de catecolaminas, melanina e serotonina (Figura 4) (STRYER, 1988; MIRA & MARQUEZ, 2000).

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 (BURTS & ASHWOOD, 1996; MIRA & MARQUEZ, 2000).

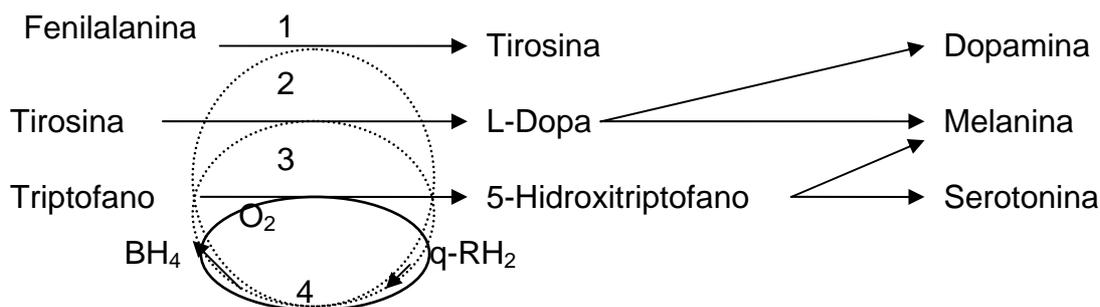


Figura 4 - Vias metabólicas da Phe dependentes da fenilalanina-hidroxilase e BH₄.

Tetrahydrobiopterina (BH₄) é um coenzima da hidroxilação de aminoácidos aromáticos, via fenilalanina-4-hidroxilase (1), tirosina-3-hidroxilase (2) e triptofano-5-hidroxilase (3). A diidrobiopterina quinoide (q-BH₂) formada é regenerada para BH₄ por NADH-BH₂ 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 BH₄, 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.

4.1 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico clínico é bastante difícil, porque a criança é aparentemente normal até o sexto mês de vida, quando podem surgir sinais como atraso de desenvolvimento, convulsões ou outras anormalidades neurológicas. Assim, uma triagem precoce, permitindo o diagnóstico e o tratamento o quanto antes, previne e evita estas graves conseqüências (SOUZA et al., 2002).

Deve-se frisar a importância para a saúde pública do Programa Nacional de Triagem Neonatal, empregado para diagnosticar erros inatos do metabolismo e doenças infecciosas (SOUZA et al., 2002). Criado em 2001, tem por objetivo o diagnóstico de doenças genéticas e acompanhamento dos indivíduos afetados. No estado de Minas Gerais o programa foi implantado pela Secretaria de Estado de Saúde em parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais. O Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico

(NUPAD) executa o tratamento e acompanhamento clínico, nutricional e psicológico de todos os indivíduos afetados, além de fornecer gratuitamente os substitutos protéicos. É um programa voltado à prevenção das manifestações das doenças e ao bem estar do indivíduo, da família e da sociedade (AGUIAR, 2002).

A incidência de PKU é variável, e ocorre em todos os grupos étnicos. Na Europa a prevalência é de 1 a cada 14.000 nascidos vivos, no Estados Unidos 1:15.000, já na Turquia 1:2.600 recém-nascidos e no Japão 1:120.000 recém-nascidos (WALTER et al., 2002; DA SILVA et al., 2003; KIM et al., 2004). No Brasil, a proporção é de 1:15.000 recém-nascidos testados, sendo que em Minas Gerais, a PKU ocorre a 1:20.000 (AGUIAR, 2002), sendo relatado um novo caso a cada mês (informação pessoal do NUPAD).

Os níveis sanguíneos de Phe em fenilcetonúricos podem ser maiores que 1200 $\mu\text{mol/L}$, e seu tratamento consiste na redução deste aminoácido na dieta para manter o seu nível sérico entre 120 a 360 $\mu\text{mol/L}$ (SCRIVER et al., 1997).

O tratamento da fenilcetonúria é dietoterápico e se baseia numa dieta restrita em proteínas, utilizando formulações especiais à base de aminoácidos livres ou hidrolisados protéicos, isentos ou com baixo teor de fenilalanina, de forma a manter os teores sanguíneos deste aminoácido perto da normalidade ao mesmo tempo em que se suprem as necessidades nutricionais para o bom desenvolvimento do indivíduo (MIRA & MARQUEZ, 2000; SIRTORI et al., 2005). Ressalta-se que a ingestão insuficiente de alguns aminoácidos essenciais resulta em um balanço nitrogenado negativo, contribuindo para a perda de peso, crescimento deficiente, entre outras ocorrências clínicas (TRAHMS, 1998). O Ministério da Saúde do Brasil preconiza a dietoterapia por toda a vida, para se evitar a neurodegeneração (BRASIL, 2002).

A quantidade de fenilalanina que pode ser ingerida depende dos níveis de Phe no plasma, da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase e da tolerância à Phe, que podem variar de indivíduo para indivíduo (MIRA & MARQUEZ, 2000). Além disso, a composição dos substitutos protéicos, a aceitabilidade, o tempo e a quantidade administrada podem influenciar a concentração da fenilalanina sanguínea (MaCDONALD et al., 2004).

Alguns estudos têm sido realizados com o intuito de propor alternativas ao tratamento dietético. Assim, 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). A terapia

gênica, também 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.

4.2 Substitutos protéicos

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

As misturas de L-aminoácidos foram adotados a partir da década de 80. Esses substitutos contêm todos os aminoácidos, com exceção da fenilalanina, em proporções recomendadas pela Food and Agriculture Organization (FAO), podendo ser acrescidas de carboidratos, vitaminas, sais minerais e lípidos (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003; MaCDONALD et al., 2003).

Embora essas misturas de aminoácidos ofereçam facilidade na prescrição e distribuição aos pacientes, elas resultam em uma dieta dispendiosa, monótona, hiperosmótica e possuem odor e paladar desagradáveis. Essas misturas são usualmente administradas como bebidas e sua ingestão deve ocorrer em pequenas porções ao longo do dia. Caso a administração seja feita de uma só vez, pode aparecer uma série de efeitos adversos: náuseas, vômitos, diarreia, tonturas, mudanças na excreção de nitrogênio e no metabolismo catabólico. As formulações contendo misturas de aminoácidos disponíveis no mercado são importadas e caras. Dentre elas, encontram-se: Lofenalac, PKU-1, PKU-2, PKU-3 e XP Analog fornecidas pela Support Produtos Nutricionais e Rilla-I, Rilla-II e Rilla-III distribuídas pela Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Vittafix Ltda (MIRA & MARQUEZ, 2000; GUADIX et al., 2000; MaCDONALD et al., 2003).

Alguns pesquisadores têm apontado os hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe como o substituto mais adequado no tratamento dos fenilcetonúricos. Para a produção de tais hidrolisados, o processo enzimático vem sendo o mais indicado. Comumente são utilizadas nessa etapa, no mínimo duas enzimas, uma das quais com

especificidade para aminoácidos aromáticos (pepsina, carboxipeptidases) e outra com especificidade ampla, agindo sobre a maioria das ligações peptídicas, como a papaína e proteases de diversas origens (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

Os hidrolisados enzimáticos oferecem elevados teores de oligopeptídeos e apresentam vantagens para o preparo de fórmulas especiais. A absorção de di- e tripeptídeos é mais rápida e completa do que aquela observada para uma mistura equivalente de aminoácidos (GRIMBLE et al., 1987; ZIEGLER et al., 1990; SHIMAMURA, et al. 1999). O fato de os aminoácidos dos hidrolisados estarem, em grande parte, agrupados em peptídeos proporcionam menor osmolaridade das suas soluções, reduzindo a incidência de diarreia osmótica. Além disso, os hidrolisados podem ser aplicados em fórmulas de nutrição enteral devido a esta baixa osmolaridade (FURST et al., 1990; GONZÁLEZ-TELLO et al. 1994).

O desenvolvimento desses hidrolisados protéicos envolvem duas etapas: 1) liberação da fenilalanina pela hidrólise enzimática e 2) remoção da fenilalanina liberada por técnicas e procedimentos diferenciados, tais como tratamento com o carvão ativado ou uso de resina de troca iônica (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991, CLEMENTE, 2000).

Durante a hidrólise enzimática pode ocorrer o desenvolvimento de características organolépticas indesejáveis devido a exposição de aminoácidos hidrofóbicos e conseqüente produção de sabor amargo. No entanto, várias tentativas têm sido feitas para prevenir, remover, eliminar ou mascarar o amargor de peptídeos, como tratamento com carvão ativado, extração com álcool, precipitação isoelétrica, cromatografia em sílica gel, cromatografia de interação hidrofóbica, adição de polifosfatos, glicina ou ciclodextrina durante o processo de hidrólise e aplicação / tratamento de exopeptidases (COGAN et al., 1981; PEDERSEN, 1994; SAHA & HAYASHI, 2001). Recentemente, estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, com encapsulamento em lipoesferas (BARBOSA et al., 2002a) e em lipossomas (MORAIS et al., 2003) mostraram ser um procedimento eficiente para mascarar o sabor amargo de hidrolisados de caseína.

5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS

A hidrólise de proteínas é basicamente o resultado da clivagem de suas ligações peptídicas, liberando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. Este

processo pode ser realizado por enzimas, ácidos ou bases. O método químico é um processo de difícil controle, que origina produtos com reduzida qualidade nutricional, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar racemização dos aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1981; LAHL & BRAUN, 1994; CLEMENTE, 2000).

A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, como 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 (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995; CLEMENTE, 2000; GUADIX et al., 2000). Além disso, este método vem sendo freqüentemente usado para melhorar as propriedades nutricionais e funcionais das proteínas alimentares (PEDROCHE et al., 2004).

Recentemente, esses hidrolisados têm recebido uma especial atenção e tem apresentado elevado potencial como constituintes de produtos geriátricos, suplementos energéticos, soluções enterais e parenterais, e alimentos hipoalergênicos (PEDROCHE et al., 2004). O uso desses hidrolisados, como fonte de proteínas em pacientes hospitalizados, tem aumentando constantemente nas últimas duas décadas, sendo utilizados no controle da dieta de pacientes com doenças crônicas, como a aterosclerose, câncer e deficiências no fígado, no tratamento de fenilcetonúria, fibrose cística, doença de Crohn, intolerância e alergias alimentares (CLEMENTE, 2000; PEDROCHE et al., 2004).

Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente, com maior absorção gastrointestinal, quando comparados a uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou de proteínas intactas, apresentando assim um maior valor nutritivo (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994; GUADIX et al., 2000; PEDROCHE et al., 2004).

O processo de hidrólise enzimática também vem se destacando na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, tais como solubilidade, poder emulsificante, de aeração, de gelificação e textura, apresentando desta forma diversas aplicações na indústria de alimentos (ABERT & KNEIFEL, 1993). 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).

Algumas variáveis devem ser controladas durante a reação enzimática para se alcançar os resultados desejados, como a escolha da enzima, o pH, tempo e temperatura de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima: substrato, inativação

enzimática ao final do processo. Deve-se ter, também, um método eficiente para a determinação do grau de hidrólise (SILVESTRE et al., 1993; CÂNDIDO, 1998).

A escolha da enzima proteolítica é de extrema importância, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e ao teor de aminoácidos livres (CHATAUD et al., 1988; CLEMENTE, 2000).

Na produção de hidrolisados, associações de enzimas de ampla especificidade têm também sido empregadas, levando a uma hidrólise extensa, com maior porcentagem de pequenos peptídeos e aminoácidos, portanto melhor composição (REED, 1975; GUADIX et al., 2000). 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).

Ao final do processo deve-se interromper a reação pela inativação da enzima. Para isto, geralmente são empregadas mudança do pH ou temperaturas suficientemente altas para provocar a desnaturação da molécula enzimática, entre 80 °C e 90 °C, por 10 a 20 min (LOOSEN et al., 1991; BOBBIO & BOBBIO, 1992; NAKAMURA et al., 1993; SILVESTRE et al., 1994a,b; MORATO et al., 2000).

5.1 Corolase PP

A corolase PP é um preparado enzimático proteolítico, obtido de pâncreas suíno composto por varias enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina, amino e carboxipeptidase) (AB ENZYMES, 2001). Encontra-se armazenada no pâncreas sob a forma de quimiotripsinogênio que é ativado pela tripsina em processos seqüenciais. Esta enzima possui atividade de endopeptidase sendo específica para a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes à carboxila de aminoácidos aromáticos, expondo a fenilalanina, tirosina e triptofano (RAO et al., 1998). Apresenta-se como um pó sólido de cor bege, com odor característico.

A ação da corolase PP é maior em pH neutro a ligeiramente alcalino. A temperatura ótima de atuação deste preparado encontra-se na faixa de 45 a 55 °C (GUADIX et al., 2000).

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 (GUADIX et al., 2000).

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).

6 MÉTODOS DE REMOÇÃO DE FENILALANINA

A fenilalanina é um aminoácido comum que usualmente está presente em todas as proteínas de origem animal ou vegetal na proporção de 3 a 6%. A baixa ingestão de proteínas é preconizada no tratamento dietoterápico dos fenilcetonúricos, por isso, vários métodos têm sido propostos com o intuito de reduzir este aminoácido de alimentos (OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

Os métodos utilizados para a remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos é realizado segundo técnicas e procedimentos diferenciados como: adsorção em carvão ativado ou resinas, filtração em gel, peneira molecular, cromatografia de troca iônica, desaminação. Deve-se considerar que os métodos escolhidos para a remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, devem ser práticos, de fácil reprodução, ter custo/benefício adequado, apresentar reconstituição e utilização viáveis, além de resultarem em produtos palatáveis e seguros (ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

O carvão ativado tem sido amplamente utilizado na indústria como material adsorvente com diversas aplicações, tais como, separação de gases, remoção seletiva de substâncias e purificação de água, devido à natureza hidrofóbica, área de superfície com boas propriedades de adsorção e estabilidade térmica (VINU et al., 2006).

Vários autores vêm utilizando o carvão ativado para a remoção de fenilalanina. KITAGAWA et al. (1987) obtiveram hidrolisados de soro de leite que posteriormente foram tratados com carvão ativado removendo 97 % de Phe. Esses autores também observaram as perdas de tirosina e triptofano e sugeriram a adição dos mesmos. Este mesmo adsorvente foi utilizado por LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) em hidrolisados de caseína comercial e de leite em pó desnatado removendo 92 % da fenilalanina. SHIMAMURA et al. (1999) propuseram a passagem de hidrolisado protéico de soro de

leite em coluna contendo carvão ativado para adsorver aminoácidos aromáticos, especialmente Phe, com uma faixa de remoção entre 85 a 95 %. MOSZCZYNSKI & IDIZIAK (1993) removeram a fenilalanina de hidrolisados de caseínas empregando-se quatro tipos de carvão ativado (ácido, básico, neutro e grau analítico), três tipos de resinas de troca iônica Amberlite (IRA-458, IRA-401 e IRA-40Q) e o gel de filtração molecular Sephadex G-15. Dentre eles, o carvão ativado de grau analítico mostrou ser o suporte que proporcionou a maior remoção de fenilalanina (89,5 %).

Em estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, o carvão ativado foi utilizado com eficiência para a remoção de fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (93,6 a 99 %) (LOPES et al., 2002; SOARES et al., 2004), de soro de leite em pó (75 a 99 %) (DE MARCO et al., 2004; SILVA et al., 2006; DELVIVO et al., 2004; 2005) e de arroz (85 a 100 %) (BIZZOTTO et al., 2006a,b), utilizando diferentes enzimas e condições hidrolíticas.

As resinas de adsorção Amberlite XAD-4 e XAD-16, utilizadas por OUTINEN et al. (1996), removeram de 92 a 100 % da fenilalanina de hidrolisados protéicos, de soro de leite e de soja. Em contraste, VASCONCELLOS et al. (1989), ao empregarem a resina XAD-4, em hidrolisados ácidos de caseína, encontraram um valor inferior de remoção de fenilalanina (61 %). Valor semelhante foi alcançado por SANTOS et al. (2003), ao utilizar esse mesmo meio absorvente, obtendo-se 62,5 % de remoção de fenilalanina, em hidrolisados enzimáticos de caseína. Entretanto, segundo esses autores, os teores de fenilalanina ainda eram altos para serem utilizados na dieta dos fenilcetonúricos. A resina de adsorção Amberlite XAD-4 foi igualmente utilizada neste laboratório, tendo levado a uma remoção de fenilalanina da ordem de 95 % (DELVIVO et al., 2004, 2005).

7 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENILALANINA

A determinação da fenilalanina pode ser realizada por vários métodos descritos na literatura, tais como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa (ZEZZA et al., 1992), HPLC de troca iônica (FANG et al., 1992), HPLC hidrofílica (CARREIRA et al., 2002), sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999) e espectrofotometria derivada segunda - EDS (O'HARVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; RAGONE, et al., 1984; ROJAS et al., 1988; SILVESTRE et al., 1993).

A EDS é um método quantitativo e qualitativo, que baseia-se na derivação do espectro de absorção normal dos compostos analisados, sendo considerada uma técnica analítica simples, rápida e de custo relativamente baixo (O'HARVER, 1979; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981; RAGONE et al., 1984; ROJAS et al., 1988). Este método tem sido utilizado para separar o complexo espectro de absorção das proteínas nas contribuições individuais dos aminoácidos aromáticos e para quantificá-los, uma vez que esses apresentam bandas de absorção características na região do ultravioleta, entre 240 e 310 nm (O'HARVER, 1974; CAHILL & PADERA, 1980).

Diversos autores têm relatado a eficiência da EDS para quantificar resíduos de Phe, Tyr e Trp em proteínas ou em hidrolisados protéicos devendo-se controlar as variáveis como o pH e a adição de outras substâncias (ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981; O'HARVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980). Assim, ICHIKAWA & TERADA (1977, 1979, 1981), primeiramente, examinaram resíduos de Phe em proteínas, entre 245 e 270 nm e demonstraram que os resíduos dos aminoácidos de tirosina e triptofano não causaram diferenças significativas nas propriedades da Phe. Em outro estudo realizado posteriormente, por este mesmo grupo, foram encontrados resultados que concordavam com os descritos na literatura, empregando-se este método para determinar a Phe em proteínas desnaturadas. SILVESTRE et al. (1993) também empregaram a EDS para avaliar pureza de hidrolisados comerciais, indicando a adição de aminoácidos livres, de proteínas nativas ou mesmo de hidrolisados com diferentes graus de hidrólise. Além disso, esses autores demonstraram que a intensidade dos picos, no espectro de derivada segunda de proteína e peptídeos, está relacionada com a exposição dos aminoácidos aromáticos, sendo tanto maior quanto mais próximo o grupamento aromático estiver da posição C- ou N-terminal.

Em estudos realizados no laboratório onde foi desenvolvido o presente trabalho, a EDS foi empregada com várias finalidades: determinar o grau de exposição de fenilalanina, de tirosina e de triptofano em hidrolisados de caseína (BARBOSA et al., 2002), a taxa de encapsulamento em lipossomas e liposferas de hidrolisados de caseína (MORAIS et al., 2003, 2005); quantificar o teor de fenilalanina em hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (SOARES et al., 2004; LOPES et al., 2002, 2005), de soro de leite em pó (DE MARCO et al., 2004; SILVA et al., 2006; DELVIVO et al., 2004, 2005) e de arroz (BIZZOTTO et al., 2006a,b).

TRABALHO EXPERIMENTAL

1 APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho está apresentada na forma de fluxogramas, nas figuras 5 e 6. Os resultados foram divididos em dois capítulos e redigidos sob a forma de artigos científicos.

O primeiro capítulo refere-se à determinação da composição centesimal do fubá de milho e à otimização da extração das proteínas, por diferentes métodos químicos e um enzimático, visando o desenvolvimento de suplementos nutricionais diversos. Nos métodos químicos, empregou-se uma solução alcalina, isoladamente ou em associação com o etanol. No método enzimático, empregou-se uma protease de microorganismo (Protemax 580 L), específica para obtenção de isolados protéicos em alimentos, e avaliou-se o efeito do tempo e da temperatura. O rendimento da extração protéica, para todos os métodos, foi determinado por meio de cálculo, utilizando-se os teores de proteínas e de sólidos totais dos resíduos.

No segundo capítulo, a corolase PP, complexo enzimático proteolítico com atividade específica próxima dos aminoácidos aromáticos, foi utilizada no preparo dos hidrolisados do fubá de milho com baixo teor de Phe, empregando-se o extrato protéico obtido na extração enzimática do fubá. O carvão ativado foi utilizado 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 fubá de milho, assim como nos hidrolisados após tratamento com carvão. A concentração do extrato protéico, a relação E:S, o emprego da liofilização, a relação proteína: carvão e o modo de emprego de carvão foram testados.

CAPÍTULO I

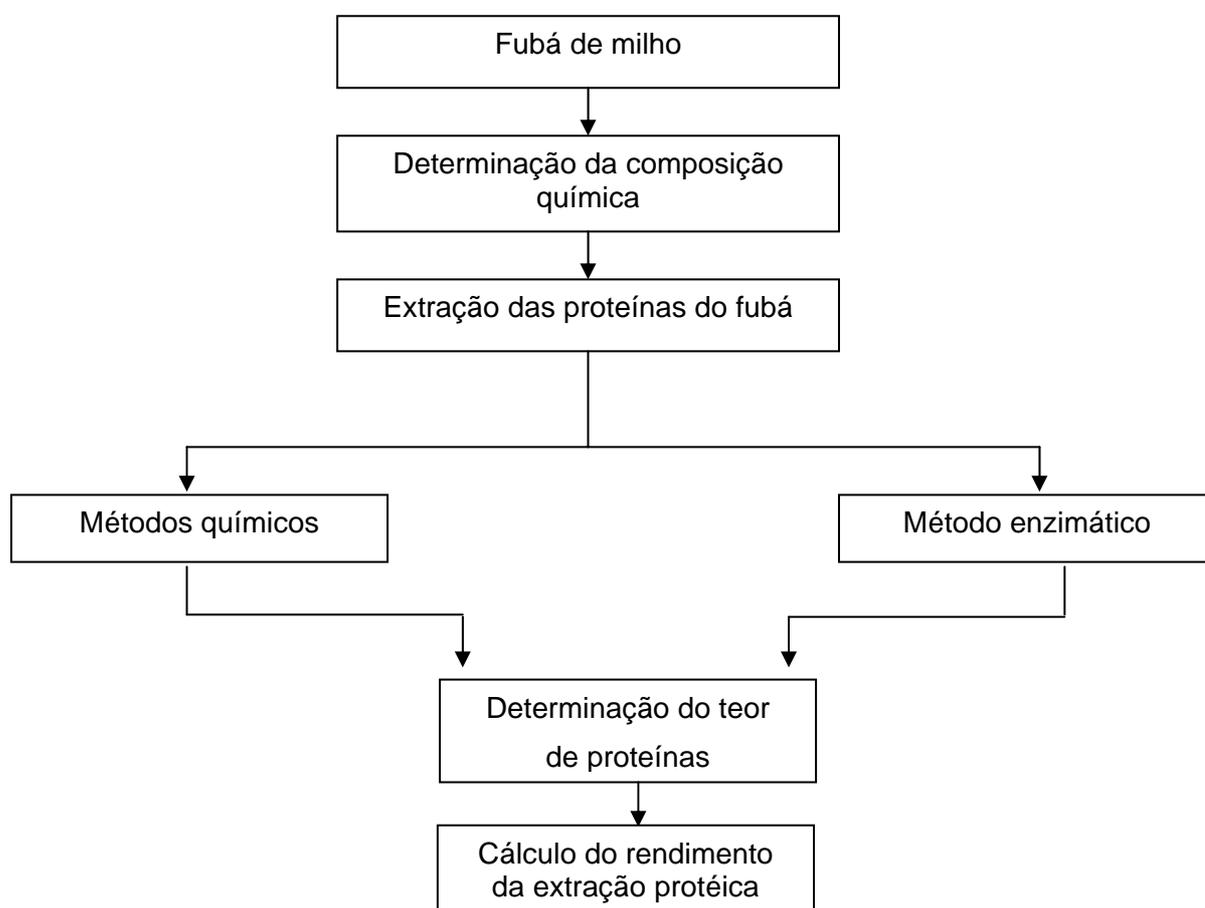


Figura 5 - Principais etapas do trabalho experimental desenvolvido no capítulo 1.

CAPÍTULO II

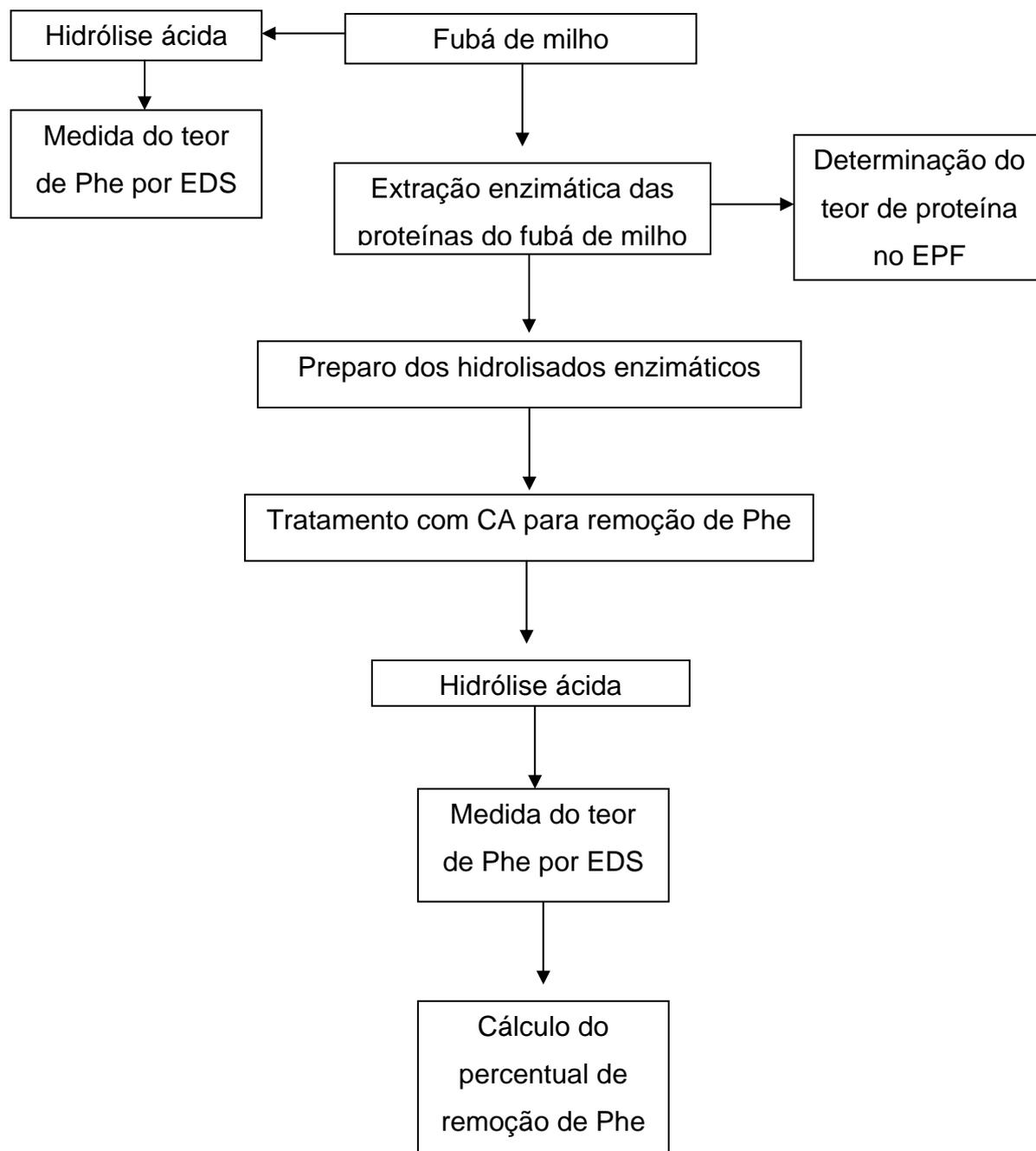


Figura 6 - Principais etapas do trabalho experimental do capítulo 2.
EDS: Espectrofotometria Derivada Segunda; EPF: Extrato Protéico do Fubá de Milho; CA: Carvão Ativado.

Capítulo I

EXTRAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO FUBÁ DE MILHO

RESUMO

Diferentes métodos químicos e um enzimático foram testados para extração das proteínas do fubá de milho. A avaliação do rendimento da extração protéica foi feita pela determinação do teor de proteína e de sólidos totais dos resíduos obtidos. Para a extração química das proteínas, uma solução alcalina, isoladamente ou em associação com etanol, foi empregada como solvente. O método alcalino-alcoólico seqüencial foi o mais eficiente, dentre os métodos químicos testados, tendo alcançado 88,2 % de rendimento. Por outro lado, o método alcalino (75,5 % de rendimento) apresenta a vantagem de não empregar etanol, reduzindo os custos do processo, pois evita-se a etapa de remoção desse solvente. Para a extração enzimática, foi utilizada uma protease de *Bacillus liccheniformis*. As variáveis, tempo e temperatura, empregadas no método enzimático influenciaram no rendimento da extração protéica do fubá de milho. Os melhores resultados foram obtidos a 5, 15 e 24 h a 55 °C, que não apresentaram diferença significativa, sendo que a condição mais vantajosa do ponto de vista econômico foi a de 5 h a 55 °C tendo atingido um rendimento de cerca de 83,8 %.

Palavras-chave: fubá de milho, método químico, método enzimático, extração protéica, rendimento de extração.

INTRODUÇÃO

O milho, juntamente com o arroz e o trigo, é um dos mais importantes grãos de cereais no mundo, fornecendo nutrientes para seres humanos e animais e servindo como material básico à produção de amido, óleo e proteína, bebidas alcoólicas, adoçantes e, mais recentemente, como combustível (FAO, 1992).

O milho é o cereal mais produtivo dentre os três grãos, com uma média mundial, durante os últimos três anos, de 4,3 toneladas por hectare, em comparação a 2,7 e 3,8 toneladas por hectare de trigo e arroz, respectivamente (EVERES [s.d.]). O consumo *per capita* de milho no Brasil foi de 19,5 kg/habitante no ano de 2001, fornecendo cerca de 158 calorias/dia e 3,7 g proteína/dia por habitante (FAO, 2006).

O milho é uma das principais fontes alimentares para milhões de pessoas, principalmente na América Latina e África, sendo uma fonte de carboidratos e proteínas. O conteúdo de proteínas em diferentes tipos de milho varia entre 6 a 12 % na base seca, sendo que aproximadamente 75 % das proteínas estão contidas no endosperma (FAO, 2006).

As proteínas do grão de milho podem ser classificadas em seis frações de acordo com LANDRY & MOUREAUX (1970), como albumina, globulina, zeína, glutelina 1, glutelina 2 e glutelina 3. A zeína é uma prolamina, que ocorre especificamente em cereais, e é a maior classe das proteínas constituintes do milho, correspondendo aproximadamente 45-50 % do total.

Diferentes procedimentos utilizando solventes para extrair as proteínas do milho são relatados na literatura, nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração variam no intuito de aumentar a eficiência do processo (LANDRY & MOUREAUX, 1970; PAULIS & WALL, 1977; NEWMANN & WALL, 1984; HOJILLA-EVANGELISTA et al., 1992; KAMPEN, 1995; LANDRY, 1997; DICKEY et al., 1998, 1999; SHUKLA et al., 2000; YOUSIF & TINAY, 2000; FAGEER & TINAY, 2004). O método usado para isolar as proteínas tem efeitos importantes nas suas propriedades (AGBOOLA et al., 2005). O tratamento alcalino das proteínas pode provocar a sua desnaturação pela desestabilização das estruturas terciárias e facilitar sua solubilização. Por outro lado, o pH alcalino pode aumentar as chances de racemização dos aminoácidos, a destruição de aminoácidos e levar a formação de novos compostos que poderiam alterar as propriedades nutricionais e funcionais das proteínas. (SGARBIERI, 1996).

Na maioria dos trabalhos encontrados sobre a extração química das proteínas de cereais, o etanol e uma solução de hidróxido de sódio são empregados como solventes em concentrações variadas (LANDRY & MOUREAUX, 1970; PAULIS & WALL, 1977; LANDRY, 1997; NEWMANN & WALL, 1984; YOUSIF & TINAY, 2000; FAGEER & TINAY, 2004). Geralmente no milho, a fração protéica solúvel em etanol é maior do que a fração solúvel em álcali, e ambas constituem 80-90 % da proteína do milho (KAMPEN, 1995).

Não foram encontrados na literatura trabalhos abordando a extração enzimática de proteínas do milho e derivados. Estudos foram realizados com outros alimentos, tais como arroz e soja, no qual o interesse dos autores estava voltado para a separação das proteínas destes alimentos (EUBER et al., 1991; FISCHER et al., 2001, TANG et al., 2002). Em outros casos, a utilização deste método estava associada à separação do amido (WANG & WANG, 2004; AGBOOLA et al., 2005).

Várias enzimas têm sido utilizadas na extração enzimática de proteínas. Entre estas, encontram-se a pancreatina, as proteases alcalina, fúngica ou bacteriana (EUBER et al., 1991); uma endoprotease (Alcalase de grau alimentício do *Bacillus licheniformis*); um complexo de proteases (Flavourzima do *Aspergillus oryzae*) seguido de uma preparação de carboidrase do *Aspergillus aculeatus* e do *Humicola insolens* (FISCHER et al., 2001); endoprotease e amilase (TANG et al., 2002); α -amilase (BAN 240 L) e protease (Promozyme 400 L) (AGBOOLA et al., 2005).

Visando a utilização do fubá de milho como matéria-prima para a produção de suplementos nutricionais diversos, este trabalho envolveu a determinação da composição química e a otimização da extração protéica, por métodos químicos e enzimáticos. Neste caso, a enzima empregada consistiu de uma protease de *Bacillus licheniformis*.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

O fubá de milho foi adquirido no comércio de Belo Horizonte, MG. A enzima Protemax 580 L foi cedida pela Prozyn (São Paulo, Brasil). O Kit de determinação de fibra alimentar total, TDF-100A, foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes foram de grau analítico.

MÉTODOS

1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FUBÁ DE MILHO

A composição centesimal do fubá de milho foi determinada segundo os métodos descritos na AOAC (1995). A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP) a 105 °C até peso constante; as cinzas ou minerais, por incineração, em mufla a 550 °C; os lípidos, por extração com éter etílico, Soxhlet modificado (Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-kjeldahl; as fibras alimentares pelo método enzimático; os carboidratos, por diferença. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 5,65 específico para milho (NIELSEN, 1998).

2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FUBÁ DE MILHO

2.1 Extração química

Para a extração química das proteínas foi empregada uma solução alcalina, isoladamente ou em associação com o etanol, tendo sido utilizadas algumas variações. No primeiro caso, cujo procedimento está descrito abaixo, foi utilizado o método alcalino, descrito por CONNOR et al. (1976), e modificado por BIZZOTTO et al. (2006a) quanto ao pH, tempo de agitação e método de separação do resíduo.

A 10 g da amostra foram adicionados 50 mL de água destilada e o pH ajustado para 12 com uma solução de NaOH a 3 mol/L. Agitou-se em agitador magnético (Fisatom, São Paulo, Brasil), por 1 h. Centrifugou-se a 957 x g, por 10 min, a 25 °C (Centrífuga Jouan, BR 4i, Saint Herblain, França). Separou-se o sobrenadante e o resíduo foi lavado uma vez com 10 mL de NaOH a 0,1 mol/L e, em seguida, duas vezes com 10 mL de água destilada, tendo sido centrifugado nas mesmas condições citadas acima, após cada lavagem. O resíduo foi, então, pesado e submetido às determinações dos teores de proteína e de sólidos totais (AOAC, 1995).

Testou-se em seguida, uma modificação do método alcalino, aqui denominado de alcalino-alcalino. Nesse caso, a partir do resíduo obtido no método alcalino repetiu-se o mesmo procedimento de extração protéica.

Para a associação da solução alcalina com o etanol, seguiu-se, inicialmente, o método descrito por KAMPEN (1995), aqui denominado de alcalino-alcoólico simultâneo. Este método se assemelha ao alcalino, sendo que, além dos 50 mL de água destilada adicionados à amostra, 40mL de uma solução etanólica a 70% (v/v) foram adicionados, juntamente com um volume de solução de NaOH a 3 mol/L suficiente para atingir o pH 12.

Em seguida, foram testadas três modificações do método de KAMPEN (1995). Na primeira, aqui designada de método alcalino-alcoólico seqüencial, adicionou-se 40 mL de solução etanólica a 70% (v/v) ao resíduo, obtido como descrito para o método alcalino, e repetiu-se as etapas de centrifugação e lavagem, neste caso apenas com água destilada. Na segunda modificação, aqui denominada método alcoólico-alcalino seqüencial, seguiu-se o mesmo procedimento do método alcalino-alcoólico seqüencial, tendo sido alterada apenas a ordem de adição dos solventes. Na terceira modificação, aqui denominada de método alcalino-alcoólico com ajuste de pH, ajustou-se o pH de 12 para 7,0 do primeiro resíduo obtido pelo método alcalino-alcoólico seqüencial, após a extração alcalina, com ácido clorídrico a 3 mol/L. Logo após, realizou-se a segunda extração com solução etanólica a 70 % (v/v), como descrito para o método alcalino-alcoólico.

2.2 Extração enzimática

A extração enzimática foi baseada no método descrito por WANG & WANG (2004), sendo que alguns parâmetros, tais como, proporção de água inicial, pH, tempo de centrifugação e relação E:S foram modificados com o objetivo de aumentar o rendimento do processo.

A amostra de fubá de milho foi, inicialmente, passada em tamis de 50 mesh. Em seguida, foi suspensa em água na proporção de 1:5 (p/v) e agitada no ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 19.000 rpm por 5 min. Após ajuste do pH para 9,5, com solução de NaOH a 3 mol/L, levou-se ao banho de óleo a 55 °C ou 60 °C. A enzima Protemax 580 L foi adicionada na relação enzima:substrato (E:S) de 1:10 e a hidrólise foi realizada em diferentes tempos (Tabela I.1). Em seguida, centrifugou-se a 1700 x g por 15 min, a 25 °C. Separou-se o sobrenadante e o resíduo foi lavado duas vezes com água destilada, tendo sido centrifugado nas mesmas condições citadas acima,

após cada lavagem. O resíduo foi pesado e submetido às determinações dos teores de proteína e sólidos totais (AOAC, 1995).

Tabela I.1 – Parâmetros utilizados na extração enzimática das proteínas do fubá de milho

Amostras	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
EPF 1	55	1
EPF 2	55	5
EPF 3	55	15
EPF 4	55	24
EPF 5	60	1
EPF 6	60	5

EPF = Extrato protéico do fubá de milho.

2.3 Determinação do rendimento da extração protéica

O rendimento da extração protéica foi determinado indiretamente, empregando-se o teor de proteínas do resíduo. Para tal, empregou-se a Equação 1:

$$R(\%) = 100 - \left[\frac{\text{proteína no resíduo} \times \text{peso do resíduo} \times 100}{\text{proteína da amostra} \times \text{peso da amostra}} \right] \quad (1)$$

sendo:

Proteína no resíduo = teor de proteína no resíduo, obtido após a extração das proteínas do fubá de milho, em g/100 g; b.s.

Peso do resíduo = quantidade do resíduo obtido após a extração, b.s. (g);

Proteína da amostra = teor de proteína no fubá de milho, em g/ 100 g; b.s.

Peso da amostra = quantidade de fubá de milho utilizada na extração, em g.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram feitos em três repetições e as análises realizadas em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan a 5 % de probabilidade, para comparar o rendimento de extração das proteínas do fubá de milho (PIMENTEL-GOMES, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FUBÁ DE MILHO

Encontram-se na Tabela I.2 os resultados obtidos para os teores dos componentes do fubá de milho. De uma maneira geral, os valores encontrados no presente trabalho estão próximos dos citados na literatura. As diferenças observadas estão associadas aos teores de fibra alimentar, cujo valor obtido foi cerca de duas vezes maior que aos da marca Hikari (USP, 2005) e aos do fubá cru sem marca (USP, 2005). Além disso, comparando-se com os dados da tabela de composição de alimentos de FRANCO (1999), o teor de umidade aqui encontrado foi inferior, enquanto que os de cinzas totais e de carboidratos foram superiores, sendo que para as cinzas a diferença foi cerca de três vezes maior. Esta variação na composição química de um alimento pode estar relacionada às condições de cultivo, clima, solo e adubação. Além disso, GONÇALVES et al. (2003) relatam que o teor de proteína pode ser influenciado pelo grau de germinação do grão de milho. Os métodos empregados na determinação de fibra também podem influenciar nos resultados obtidos, embora não tenham sido mencionados na literatura consultada.

Tabela I.2 - Composição centesimal do fubá de milho

Componentes	Valores obtidos ¹	Teores (g/100 g)		
		USP ²	USP ³	FRANCO ⁴
Umidade	11,04 ± 0,04	12,40	9,88	16,42
Proteína	6,13 ± 0,20	5,70	6,90	7,80
Lípides	1,94 ± 0,18	2,20	2,16	2,20
Cinzas totais	0,48 ± 0,03	0,50	0,50	0,18
Fibra alimentar total	5,86 ± 0,08	2,80	4,04	-
Carboidratos	80,42	79,20	80,56	73,40

¹ Valores obtidos no presente trabalho com o desvio padrão. ² USP (2005), Fubá de milho da Hikari Indústria e Comércio Ltda. ³ USP (2005), Fubá de milho, sem marca. ⁴ FRANCO (1999).

2 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO QUÍMICA DAS PROTEÍNAS

Na Tabela I.3, estão apresentados os resultados obtidos para o rendimento da extração química das proteínas do fubá de milho, empregando-se os diferentes métodos.

Tabela I.3 – Teor de proteínas no resíduo e rendimento da extração química das proteínas do fubá de milho, com diferentes métodos de extração

Métodos de extração	Teor de proteína no resíduo (%)	Rendimento de extração (%)
Alcalino	1,79 ^{bc}	75,5 ^{bc}
Alcalino-alcalino seqüencial	2,10 ^{ab}	72,9 ^{cd}
Alcalino-alcoólico simultâneo	1,73 ^{bc}	75,7 ^{bc}
Alcalino-alcoólico seqüencial	0,95 ^d	88,2 ^a
Alcoólico-alcalino seqüencial	1,72 ^c	77,5 ^b
Alcalino-alcoólico com ajuste de pH	2,27 ^a	70,6 ^d

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

Como pode ser observado, o maior rendimento da extração foi alcançado pelo método alcalino-alcoólico seqüencial (88,2 %), uma vez que o emprego de uma solução alcalina, seguido de uma solução alcoólica a 70 %, mostrou ser o mais eficaz para aumentar a solubilidade das proteínas e, conseqüentemente, a porcentagem de rendimento de extração dos métodos testados. KAMPEN (1995) relata que o uso de

solventes, de forma seqüencial, na extração protéica, pode aumentar o rendimento para alguns tipos de matéria-prima, especificamente para cereais.

Além disso, os resultados aqui obtidos estão de acordo com o esperado teoricamente, ou seja, a maior parte da fração protéica do milho é solúvel em etanol e álcali, sendo facilmente extraída por estes solventes (KAMPEN, 1995).

Apesar do método alcalino ter apresentado menor rendimento do que o alcalino-alcoólico seqüencial, o emprego de apenas um solvente e a eliminação da etapa de remoção de álcool o torna mais econômico.

Não foram encontrados na literatura, dados sobre o rendimento de extração protéica do fubá de milho. Os poucos trabalhos encontrados referem-se ao grão de milho e, em apenas um, o rendimento da extração protéica foi superior ao obtido neste trabalho. Assim, KAMPEN (1995) conseguiu extrair 82 % das proteínas, empregando o método alcalino-alcoólico simultâneo, enquanto que no presente trabalho este mesmo método apresentou um rendimento de cerca de 76 %.

Por outro lado, HOJILLA-EVANGELISTA et al. (1992) relataram um rendimento de apenas 57 % ao utilizar o método alcalino-alcoólico simultâneo, bem inferior ao valor encontrado no atual trabalho (76 %).

Dois outros autores utilizaram métodos diferentes aos aqui empregados, e os seus rendimentos de extração foram inferiores. Assim, SHUKLA et al. (2000) obtiveram uma média de 50,6 % no rendimento de extração das proteínas do grão de milho, utilizando somente uma solução alcoólica a 70 %. LANDRY (1997) recuperou 63,4 % do total de proteínas do grão de milho, empregando extração por fracionamento através do emprego de solventes variados (NaCl a 0,5 mol/L, etanol a 60 %, 2-mercaptoetanol, tampão borato a 0,0152 mol/L, pH 10 e sulfato dodecil de sódio a 0,5 %).

Para o teor de proteína no resíduo após a extração protéica, apenas um relato foi encontrado na literatura (WANG & WANG, 2004). Neste caso, a matéria-prima utilizada foi o arroz, tendo sido empregado o método alcalino e o resultado foi de 0,12 %, inferior ao valor de 1,79 % obtido para o mesmo método aqui empregado.

3 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS

Na Tabela I.4 são apresentados os resultados do rendimento da extração enzimática das proteínas do fubá de milho encontrados no presente trabalho. Como pode-

se observar, os melhores resultados foram obtidos a 55 °C, com 5 h (EPF 2), 15 h (EPF 3) e 24 h de extração (EPF 4), tendo atingido o valor médio de 85,3 %. Por outro lado, para a amostra EPF 1, obteve-se o menor rendimento de extração (71,5 %).

A extração incompleta das proteínas, provavelmente se deve à interferência da matriz, devido às interações com outros constituintes da amostra, tais como lípidos e carboidratos (FISCHER et al., 2001). No caso de isolados protéicos do arroz, o amido é o maior contaminante e a sua elevada solubilidade na água parece ser responsável pelo baixo rendimento protéico (AGBOOLA et al., 2005).

Tabela I.4 – Teor de proteínas no resíduo e rendimento da extração enzimática das proteínas do fubá de milho

Amostras e parâmetros da extração	Teor de proteínas no resíduo (%)	Rendimento de Extração (%)
EPF 1 (55 °C, 1 h)	2,3 ^a	71,5 ^d
EPF 2 (55 °C, 5 h)	1,4 ^d	83,8 ^a
EPF 3 (55 °C, 15 h)	1,3 ^d	85,4 ^a
EPF 4 (55 °C, 24 h)	1,2 ^d	86,8 ^a
EPF 5 (60 °C, 1 h)	1,8 ^b	75,5 ^c
EPF 6 (60 °C, 5 h)	1,7 ^c	81,2 ^b

EPF = Extrato protéico do fubá de milho. Os resultados representam médias de triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância quanto ao rendimento da extração, em matéria seca.

Não foram encontrados na literatura relatos referentes à extração enzimática das proteínas do milho ou de seus derivados. Assim, considerando que alguns autores empregaram este método para a extração protéica de outros alimentos, os dados aqui obtidos foram comparados com os destes autores. Dessa forma, considerando a média dos três melhores resultados (85,3 %), verifica-se que este valor aproxima-se dos encontrados por FISCHER et al. (2001), que obtiveram um rendimento de 89-94 % das proteínas da farinha de soja, utilizando uma combinação de proteases (Alcalase e Flavourzima). EUBER et al. (1991), utilizando a pancreatina como enzima no processo de extração de proteínas do arroz, obtiveram 75 % de rendimento para as melhores condições testadas, valor este semelhante à amostra EPF 5 no presente trabalho. TANG et al. (2002) alcançaram rendimentos de extração de 56,2 a 66,6 %, utilizando

processamentos físicos (ultra-som, ultra-turrax, alta pressão) e enzimáticos na extração da proteína do farelo de arroz. Estes resultados são inferiores aos obtidos neste trabalho.

Com relação ao teor de proteínas do resíduo, observa-se na Tabela I.4 que variou de 1,2 % a 2,3 %, sendo menos elevado para extrações efetuadas a 55 °C, por 5 h (EPF 2), 15 h (EPF 3) e 24 h (EPF 4), para as quais não foram observadas diferenças significativas. WANG & WANG (2004), utilizando uma protease neutra (*Bacillus subtilis*) para a obtenção do amido de arroz por meio da extração enzimática das proteínas, obtiveram resultados inferiores, tendo o teor protéico nos resíduos variado de 0,53 a 0,88 %.

Em trabalho semelhante aos destes autores, AGBOOLA et al. (2005), encontraram apenas 0,15% de proteínas no resíduo do arroz, o que corresponde a um melhor resultado do que o de WANG & WANG (2004) e o do atual estudo. Por outro lado, FISCHER et al. (2001) relataram um teor elevado de proteína (15-20 %) no resíduo obtido da extração enzimática da farinha de soja.

3.1 Efeito da temperatura

Para comparar o efeito da temperatura no rendimento da extração das proteínas, deve-se comparar EPF 1 com EPF 5 (55 °C e 60 °C) e EPF 2 com EPF 6 (55 °C e 60 °C). Pode-se observar na Figura I.1, que a temperatura afetou o rendimento da extração, uma vez que houve diferença significativa entre os resultados. O efeito desejável associando a diminuição da temperatura com o aumento do rendimento, relacionado à redução de custos do processo, foi observado no caso de se utilizar o tempo de 5 h de extração (EPF 6 com EPF 2). O fato do rendimento de extração ter sido inferior a 60 °C pode estar relacionado à proximidade da temperatura de gelatinização do amido de fubá de milho, que está na faixa de 62 – 72 °C (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Neste processo, parte das proteínas ligadas às moléculas de amido, poderia estar inacessível à ação da enzima. Quando se utilizou 1 h de extração, este efeito não foi observado (EPF 1, 55 °C com EPF 5, 60 °C), o que poderia estar associado à ocorrência de menor gelatinização do amido devido ao tempo de reação ter sido insuficiente para que este processo ocorra.

Tal como o observado no atual estudo, para 5 h de reação, EUBER et al. (1991) empregando a pancreatina para a extração das proteínas do arroz, obtiveram um aumento do rendimento com a queda de temperatura de 60 °C para 55 °C,.

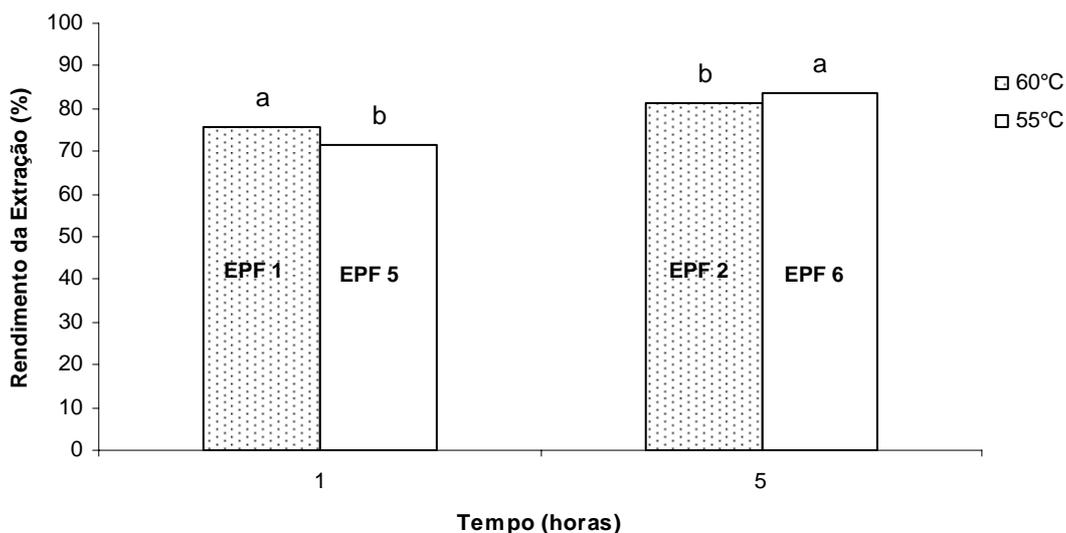


Figura I.1 - Efeito da temperatura no rendimento da extração enzimática.

3.2 Efeito do tempo

Para avaliar o efeito do tempo no rendimento de extração das proteínas (Figura I.2), são comparados entre si EPF (1 h), EPF 2 (5 h), EPF 3 (15 h) e EPF 4 (24 h). Assim, ao se passar de 1 h (EPF 1) para 5 h (EPF 2) houve um aumento significativo no rendimento de extração. Este resultado está de acordo com o esperado teoricamente, ou seja, o aumento no tempo de ação da enzima é importante para se elevar o rendimento de extração, pois produz uma hidrólise mais acentuada da molécula protéica, com a formação de peptídeos de cadeias mais curtas que são mais solúveis (FISCHER et al., 2001). Por outro lado, passando-se de 5 h (EPF 2) para 15 h (EPF 3), assim como de 15 h (EPF 3) para 24 h (EPF 4) não foram observadas diferenças significativas nos valores encontrados.

Estes resultados indicam, ainda, que considerando os riscos de contaminação e os custos para a aplicação do processo em larga escala, a condição mais vantajosa é representada pela extração por 5 h a 55 °C (EPF 2).

EUBER et al. (1991), empregando a pancreatina para a extração protéica do arroz, observaram que a diminuição do tempo de 5 h para 1 h teve o mesmo efeito negativo do presente trabalho, tendo reduzido o rendimento de extração de 76,5 % para 69,1 %.

Com o interesse em obter o amido do arroz, WANG & WANG (2004), empregaram uma protease neutra do *Bacillus subtilis* para a extração das proteínas tendo relatado que

a redução do tempo de hidrólise de 5 h para 1 h levou, desvantajosamente, a um aumento do teor protéico do resíduo (0,55 % para 0,88 %). Este resultado está de acordo com o presente trabalho a 55 °C (EPF 2 e EPF 1), uma vez que ao passar de 5 h para 1 h obteve-se uma elevação do teor protéico do resíduo.

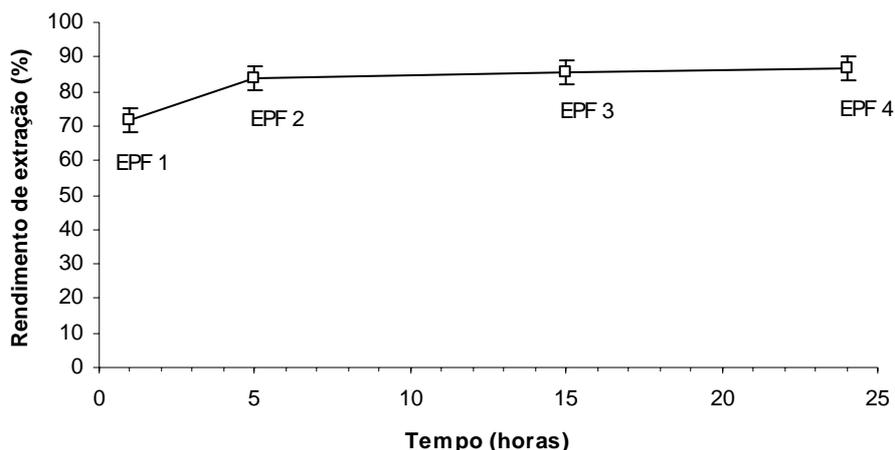


Figura I.2 - Efeito do tempo no rendimento da extração enzimática.

4 EXTRAÇÃO QUÍMICA X EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Comparando entre si, os melhores resultados obtidos por estes dois métodos de extração, observa-se, primeiramente, que o enzimático apresentou rendimento inferior (83,5 %) ao alcalino-alcoólico seqüencial (88,2 %). Entretanto, o emprego de enzimas, ao invés de solventes, reduz demasiadamente os riscos para a saúde, uma vez que, o pH fortemente alcalino podem alterar as propriedades nutricionais e funcionais das proteínas, aumentar as chances de racemização dos aminoácidos, provocar a destruição dos aminoácidos e a formação de novos compostos (SGARBIERI, 1996). Outra vantagem do método enzimático relaciona-se a uma maior digestibilidade protéica, uma vez que a hidrólise dá origem a oligopeptídeos que são absorvidos mais rápida e completamente que as proteínas intactas (GRIMBLE et al., 1986; ZIEGLER et al., 1990; EUBER et al., 1991; SHIMAMURA et al., 1999). Ressalta-se ainda, que ao contrário da extração química, no método enzimático não houve necessidade de se fazer a neutralização do resíduo e do sobrenadante, uma vez que o pH final da extração situava-se em torno

de 7,0. Isto se deve à hidrólise enzimática de proteínas, na qual ocorre a quebra das ligações peptídicas e, conseqüentemente a liberação de grupamentos terminais dos peptídeos. Em soluções aquosas, estes grupos se encontram na forma ionizável ($\text{COO}^- + \text{H}^+$), e os prótons livres, neutralizam a alcalinidade do meio (LEHNINGER et al., 1995; GUADIX et al., 2000).

CONCLUSÃO

O método alcalino-alcoólico seqüencial foi o mais eficiente, dentre os métodos químicos testados para extração das proteínas do fubá de milho, tendo alcançado 88,2% de rendimento. No método enzimático, para alguns casos (1 h para 5 h) o tempo e a temperatura empregados influenciaram no rendimento da extração protéica do fubá de milho, sendo que a condição de 5 h a 55 °C foi a mais vantajosa do ponto de vista econômico, tendo atingido um rendimento de 83,8 %.

Capítulo II

AÇÃO DA COROLASE PP E USO DO CARVÃO ATIVADO NA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE FUBÁ DE MILHO COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA

RESUMO

Visando o desenvolvimento de formulações dietéticas com baixo teor de fenilalanina (Phe), foram preparados dez hidrolisados enzimáticos à base de fubá de milho, obtidos pela ação da corolase PP. O carvão ativado (CA) foi empregado como meio adsorvente para remover a Phe, utilizando o processo de passagem em coluna e três procedimentos distintos foram testados. A eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda, determinando-se o teor de Phe livre no fubá de milho, assim como nos hidrolisados após tratamento com CA. O carvão ativado mostrou-se eficaz na remoção de Phe, tendo o percentual de remoção variado de 68,63 a 97,55 %, e o teor final de Phe de 18,80 a 240,75 mg Phe/100g de hidrolisado. Para os diversos parâmetros estudados, observaram-se efeitos variados sobre a remoção de Phe, sendo que os melhores resultados foram encontrados para a concentração do extrato protéico de 1 g/100 mL; relação enzima: substrato de 2 %; relação proteína: carvão de 1:88,5; o emprego de um tipo de carvão ativado (tipo A) e na ausência de liofilização.

Palavras-chave: hidrolisados protéicos, fubá de milho, carvão ativado, remoção de fenilalanina, corolase PP.

INTRODUÇÃO

Hidrolisados protéicos são produtos destinados, primeiramente, para uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional. Nos anos 70 iniciou-se no Japão investigações sobre a possibilidade de produção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina (MIRA & MARQUEZ, 2000). O processo enzimático é o mais indicado para a produção de tais hidrolisados, pois preserva as propriedades organolépticas e não promove aumento na osmolaridade do meio (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

Diversos autores estudaram a produção desses hidrolisados em escala laboratorial, alguns em escala piloto, que consistem de duas etapas: 1) liberação da fenilalanina pela hidrólise enzimática e 2) remoção da fenilalanina liberada por técnicas e procedimentos diferenciados (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993).

As proteases são as enzimas empregadas no preparo desses hidrolisados. Dentre estas, encontra-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).

A fenilcetonúria (PKU) é o resultado de um erro inato do metabolismo, de herança autossômica recessiva. Caracteriza-se por uma deficiência da conversão da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr), que produz alterações do sistema nervoso levando a retardo mental irreversível (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; TRAHMS, 1998; PIETZ et al., 1999; SHIMAMURA et al., 1999; SIRTORI et al., 2005).

O tratamento da fenilcetonúria consiste em dieta alimentar restrita em proteínas, utilizando fórmulas especiais ou com baixos teores de fenilalanina. No Brasil, os produtos disponíveis são importados, de alto custo e constituídos apenas de aminoácidos livres (ACOSTA & YANNICELLI, 1997). Dos alimentos permitidos na alimentação dos fenilcetonúricos, os cereais se enquadram na lista de alimentos que devem ser controlados (SOARES et al., 2004).

O milho possui várias utilizações, podendo ser destinado ao consumo humano, à ração para criações de animais, sendo esta a sua principal utilização, e formando a base de importantes produtos industrializados. O consumo *per capita* de milho no Brasil foi de 21,0 kg/habitante no ano de 2002, fornecendo cerca de 180 calorias/ dia e 4,0 g proteína/

dia por habitante (FAO, 2006). Neste sentido, levando-se em conta a posição que ocupa o milho na dieta do brasileiro, seria de grande interesse utilizá-lo como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de fenilcetonúricos.

Vários métodos têm sido utilizados para a remoção de fenilalanina, 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; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993; OUTINEN et al., 1996).

O carvão ativado vem sendo utilizado por vários autores para a remoção de fenilalanina 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. 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., 2005a,b), de soro de leite em pó (DE MARCO et al., 2004; SILVA et al., 2006; DELVIVO et al., 2004, 2005) e arroz (BIZZOTTO, et al, 2006a,b), utilizando diferentes enzimas e condições hidrolíticas.

Este trabalho teve como objetivo otimizar a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos de fubá de milho, obtidos pela ação da corolase PP, empregando-se o carvão ativado como meio adsorvente.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A corolase PP (complexo protéico obtido do pâncreas suíno) foi gentilmente cedida pela AB Enzimas Brasil Comercial Ltda (Barueri, São Paulo). A enzima Protemax 580 L (protease de *Bacillus liccheniformis*) foi cedida pela Prozyn (São Paulo, Brasil). O carvão ativado (granulado nº 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler;) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR). O fubá de milho foi adquirido no comércio de Belo Horizonte - MG.

MÉTODOS

1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para a extração das proteínas do fubá de milho foi utilizado o método enzimático, (capítulo I), cujo rendimento foi de 84 %. A amostra de fubá de milho foi, inicialmente, passada em tamis de 50 mesh. Em seguida, foi suspensa em água na proporção de 1:5 (p/v) e agitada no ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 19.000 rpm por 5 min. Após ajuste do pH para 9,5, com solução de NaOH a 3 mol/L, levou-se ao banho de óleo a 55 °C, com agitação contínua. A Protemax 580 L foi adicionada na relação E:S de 1:10 e a reação foi realizada por 5 h. Em seguida, centrifugou-se a 1700 x g por 15 min, a 25 °C. Separou-se o sobrenadante e o resíduo foi lavado duas vezes com água destilada, tendo sido centrifugado nas mesmas condições citadas acima, após cada lavagem. Os sobrenadantes foram reunidos e submetidos às determinações dos teores de proteína e sólidos totais (AOAC, 1995), sendo reservados para o preparo dos hidrolisados.

2 PREPARO DOS HIDROLISADOS

Foram preparados 10 (Tabela II.1) hidrolisados enzimáticos, utilizando-se a corolase PP, e três procedimentos distintos, com o intuito de avaliar a influência da concentração do extrato protéico, da relação enzima: substrato (E:S), do emprego da liofilização, da relação proteína: carvão e do modo de emprego do carvão ativado.

No caso dos hidrolisados H1 a H6, os extratos protéicos (EPF) foram, inicialmente, liofilizados (Liofilizador Freezone, modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA). Em seguida, foram preparadas soluções com concentrações de 1, 2 e 3 g/100 mL. Adicionou-se, então, benzoato de sódio (0,1 % p/v) e ajustou-se o pH para 9,0 com NaOH a 3 mol/L, que manteve-se inalterado até o final da reação. As soluções foram levadas ao banho-maria a 25 °C, e adicionou-se a enzima em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada (Tabela II.1). Após 5 h, a reação foi interrompida pelo abaixamento do pH para 3,0 com a adição de ácido fosfórico. Posteriormente, os hidrolisados foram liofilizados.

Para o preparo dos hidrolisados H7 e H8, seguiu-se o mesmo procedimento acima, exceto que tanto os extratos protéicos quanto os hidrolisados não foram submetidos à liofilização. Neste caso, a enzima foi adicionada diretamente em um volume previamente medido do extrato protéico. Os demais parâmetros estão citados na Tabela II.1.

Quanto ao preparo dos hidrolisados H9 e H10, foram utilizados os extratos protéicos na forma líquida e os hidrolisados obtidos não foram liofilizados, tal como ocorreu para as amostras H7 e H8. Entretanto, as condições de reação foram diferentes. Assim, para a hidrólise dos extratos, utilizou-se um banho de óleo, a 50 °C, com agitação contínua. Além disso, o pH não foi ajustado, tendo permanecido em torno de 7,0 (pH do extrato protéico). Outro parâmetro que variou neste processo refere-se à interrupção da reação hidrolítica que foi feita pelo aquecimento a 85 °C por 20 min. Os demais parâmetros estão citados na Tabela II.1.

Tabela II.1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados de proteínas obtidas do fubá de milho pela ação da corolase PP

Hidrolisado	Concentração de EPF (g/100 ml)*	pH	Temperatura (°C)	E:S	Interrupção da reação hidrolítica	Liofilização
H1	1	9,0	25	1:100	queda do pH	Sim
H2	1	9,0	25	2:100	queda do pH	Sim
H3	2	9,0	25	1:100	queda do pH	Sim
H4	2	9,0	25	2:100	queda do pH	Sim
H5	3	9,0	25	1:100	queda do pH	Sim
H6	3	9,0	25	2:100	queda do pH	Sim
H7	-	9,0	25	2:100	queda do pH	Não
H8	-	9,0	25	4:100	queda do pH	Não
H9	-	7,0	50	2:100	ação do calor	Não
H10	-	7,0	50	4:100	ação do calor	Não

E:S = relação enzima:substrato; Liofilização = dos extratos protéicos e dos hidrolisados. EPF = Extrato Protéico de Fubá de Milho; * teor de proteínas dos extratos protéicos: 28 %, em matéria seca.

3 REMOÇÃO DE FENILALANINA DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos de fubá de milho pela utilização do carvão ativado (CA), como meio adsorvente. Foi utilizado o procedimento de passagem por coluna, descrito por SOARES et al. (2004). O carvão foi hidratado com água purificada por 10 min e, em seguida, colocado em seringa descartável de 10 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. Para os hidrolisados de H1 a H6, passou-se pela seringa sob pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP), uma solução a 0,8 g/100mL, tendo sido recolhido o eluato. No caso das amostras H7 a H10, seguiu-se o mesmo procedimento, empregando-se um volume equivalente a esta mesma concentração.

4 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

O efeito da concentração do EPF foi testado para os valores de 1, 2 e 3 g/100 mL (Tabela II.1). Para o estudo da influência da relação E:S foram testados os valores de 1, 2 e 4 % (Tabela II.1). Como pode ser visto na Tabela II.1, o efeito da liofilização foi

igualmente avaliado. O efeito da relação proteína:carvão sobre a remoção de Phe, foi testado nas seguintes proporções 1:8, 1:16 e 1:88,5 para os hidrolisados H7 a H10. Finalmente, estudou-se o efeito do modo de emprego de carvão sobre a remoção de Phe, nestas mesmas amostras, utilizando quantidades iguais de três granulometrias diferentes (Tipo A, nº 119, 20 x 50 mesh; Tipo B, 12 x 25 mesh; Tipo C, 6 x 12 mesh) numa mesma coluna, para a relação 1:88,5. O modo de emprego refere-se ao uso do carvão tipo A isoladamente ou em associação com os tipos B e C. Na montagem da coluna contendo mais de um tipo de carvão, foi colocado por cima o carvão tipo C, seguido do carvão tipo B e, na parte inferior o carvão tipo A.

5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE FENILALANINA

A avaliação da eficiência de remoção de Phe, pelo carvão ativado, foi realizada pela medida do teor de Phe livre, no fubá de milho, no EPF e seus hidrolisados, após tratamento com CA, empregando-se a Espectrofotometria Derivada Segunda (LOPES et al., 2005a,b). As amostras foram submetidas à hidrólise ácida (HCl a 5,7 mol/L, 110 °C, 24 h) e, após ajuste do pH para 6,0, com solução de fosfato de sódio bibásico, foram submetidas às leituras de absorvância na faixa de 250 a 280 nm. Foram traçados os espectros de derivada segunda (Espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra) e a área do terceiro pico negativo foi usada para calcular a quantidade de Phe presente nas amostras, empregando-se a curva padrão. O software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA) foi utilizado para traçar os espectros da derivada segunda.

Para a curva padrão, soluções estoques de Phe ($6,05 \times 10^{-4}$ mol/L), Tyr ($5,52 \times 10^{-4}$ mol/L) e Trp ($4,90 \times 10^{-4}$ mol/L) foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0), em seguida, 10 mL de cada uma destas soluções foram misturadas e diluídas, sucessivamente, com a concentração de Phe variando de 0,067 a $2,018 \times 10^{-4}$ mol/L.

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

$$\% \text{ Remoção de Phe} = \frac{\text{teor de Phe inicial} - \text{teor de Phe final}}{\text{teor de Phe inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Na qual,

Teor de Phe inicial = teor de Phe no extrato protéico do fubá de milho

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

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan a 5 % de probabilidade, para comparar o teor final de Phe nos extratos protéicos e nos hidrolisados, após tratamento com carvão ativado. Para a avaliação do efeito de alguns parâmetros sobre a remoção de Phe, foi adotado um delineamento fatorial 3 x 4, 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 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Os resultados obtidos para a remoção de Phe dos diferentes hidrolisados protéicos do fubá de milho, estão apresentados na Tabela II.2. Os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg Phe/100 g de hidrolisado), sendo esta última forma a mais apropriada para os cálculos de adequação das prescrições dietéticas de substitutos protéicos destinados a fenilcetonúricos, além de atender a regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos (ANVISA, 2003). Os teores de Phe no fubá de milho e no extrato protéico foram de 167,0 mg Phe/100 g e 768,25 mg Phe/100 g do produto, respectivamente.

Tabela II. 2 – Percentual de remoção e teor final de Phe dos hidrolisados protéicos de fubá de milho, obtidos pela ação da corolase PP

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg Phe/100g de Hidrolisado)
H1	97,31 ^a	20,64 ^f
H2	97,55 ^a	18,80 ^f
H3	68,72 ^f	240,32 ^a
H4	82,52 ^{cd}	134,30 ^{cd}
H5	86,68 ^b	102,32 ^d
H6	79,01 ^e	161,25 ^b
H7	81,90 ^{de}	139,05 ^{bc}
H8	85,39 ^{bc}	112,23 ^{de}
H9	83,96 ^{bcd}	123,19 ^{cde}
H10	68,63 ^f	240,75 ^a

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

Como pode ser observado, o uso do carvão ativado mostrou-se eficaz na remoção de Phe dos hidrolisados protéicos do fubá de milho obtidos pela ação da corolase PP, tendo o percentual de remoção variado de 68,63 a 97,55 %, e o teor final de Phe de 18,80 a 240,75 mg Phe/100 g de hidrolisado. Estes seriam os teores de Phe numa formulação dietética contendo apenas hidrolisados protéicos do fubá de milho. Neste caso, somente os hidrolisados H1, H2 e H5 poderiam ser utilizados, pois os seus teores de Phe estariam dentro do limite permitido pela legislação brasileira, que é de 0,1 g de Phe por 100 g de produto (BRASIL, 2002).

Porém, se o interesse for o de utilizar o fubá de milho com baixo teor de Phe, no preparo de dietas para fenilcetonúricos, haveria necessidade de reincorporar ao resíduo da extração protéica, previamente separado, as proteínas hidrolisadas e submetidas à remoção de Phe, de maneira a se obter 6,13 % de proteínas (teor de proteínas do fubá de milho). Levando-se em conta que a média do teor de proteína do resíduo foi de 1,55 g/100 g, seria necessária a adição de 4,58 g de proteína para recuperar o teor original do fubá. Neste caso, a quantidade utilizada dos hidrolisados estaria por volta de 16,23 g (28,2 % de proteína), o que corresponderia a teores finais de Phe variando de 38,42 a 74,47 mg por 100 g de produto. Desta maneira, todos os hidrolisados protéicos poderiam constituir a base protéica da dieta.

Considerando que os suplementos nutricionais, de uma maneira geral, contêm 15 % de proteína (dieta hipercalórica com 1,5 kcal/ mL e elevado teor protéico), que poderiam ser fornecidas pelos hidrolisados protéicos de fubá de milho, o teor de Phe cairia para 10,0 a 128,1 mg/ 100 g de produto. Neste caso, os hidrolisados H1, H2, H4 a H9 poderiam representar a base protéica destes suplementos nutricionais, uma vez que seus teores de Phe estariam dentro do limite fixado pela legislação Brasileira.

Deve-se ressaltar que a presença de uma certa quantidade de Phe no produto final para fenilcetonúricos é desejável do ponto de vista nutricional uma vez que, por ser um aminoácido essencial, a Phe é fundamental para o crescimento normal de crianças. Além disso, as condições operacionais necessárias para atingir cerca de 100% de remoção de Phe, aumentariam demasiadamente os custos do processo (LOPES et al., 2005b; SOARES et al., 2006).

As amostras que apresentaram menor teor de Phe foram H1 e H2. Entretanto, o preparo destes hidrolisados envolve duas etapas de secagem, que prolongam e encarecem o processo. Além disso, o uso de banho-maria sem agitação, apesar de possibilitar o emprego de temperatura de apenas 25 °C, implica em um menor controle da reação e, conseqüentemente, baixa repetibilidade dos resultados.

Dentre os hidrolisados para os quais não se empregou a liofilização (H7, H8, H9 e H10), os melhores foram H8 e H9, que apresentaram menores teores finais de Phe do que H7 e H10. Ressalta-se, ainda, que o H9 apresenta algumas vantagens sobre o H8, uma vez que, no seu preparo, não houve necessidade do ajuste do pH e empregou-se uma relação E:S inferior. Apesar de que no preparo de H9 utilizar temperatura mais elevada (50 °C) do que no H8 (25 °C), o fato da hidrólise ser conduzida sob agitação contínua, propicia maior repetibilidade do processo.

Em estudos realizados anteriormente no mesmo laboratório, foram obtidos resultados semelhantes à maioria das amostras do presente trabalho, utilizando o carvão ativado para remover a Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (93,6 a 99 %) (LOPES et al., 2005a,b; SOARES et al., 2004), de soro de leite em pó (75 a 99 %) (DE MARCO et al., 2004; SILVA et al., 2006 ; DELVIVO et al., 2004, 2005) e de arroz (85 a 100 %) (BIZZOTTO et al., 2006a,b).

Outros autores também relataram níveis de remoção de Phe próximos aos obtidos no presente trabalho para alguns produtos. Assim, KITAGAWA et al. (1987), empregaram a actinase para hidrólise das proteínas do soro do leite, e após tratamento com carvão ativado, conseguiram remover 97 % de Phe. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) removeram

92 % de Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio obtidos pela ação de uma protease do *Aspergillus oryzae* e da papaína, tratados com carvão ativado. Empregando um sistema de três enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase), MOSZCZYNSKI & IDIZIAK (1993) removeram, através do carvão ativado, 90 % de Phe de hidrolisados de caseína. Entretanto, COGAN et al. (1981) alcançaram uma remoção de Phe de apenas 36 %, em hidrolisados de caseína preparados pela ação da enzima Rhozima 62. As diferenças nos resultados podem ter sido a vários fatores, tais como, a enzima proteolítica, a relação proteína: carvão (0,5 g de carvão/g de proteína, contra 88,5 g de carvão/g de proteína neste item do presente trabalho), e fonte protéica utilizada.

2 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

2.1 Efeito da concentração de extrato protéico

Para a avaliação do efeito da concentração do extrato protéico (EPF), foram comparados dois grupos de hidrolisados: H1, H3 e H5, ou H2, H4 e H6 (Figura II.1). Nota-se, no primeiro caso, que o aumento da concentração de EPF de 1 g para 2 g/100 mL (H1 e H3) foi altamente prejudicial, uma vez que elevou o teor final de Phe em mais de dez vezes. Aumentando-se ainda mais, a concentração de EPF de 2 g para 3 g/100 mL (H3 e H5), produziu uma queda significativa do teor de Phe, mas que continuou sendo muito superior ao teor obtido com 1 g/100 mL.

No segundo caso, tanto o aumento de 1 g para 2 g/100 mL (H2 e H4) quanto o de 2 g para 3 g/100 mL (H4 e H6), foram prejudiciais, uma vez que contribuíram para elevar o teor final de Phe, sendo o resultado mais desfavorável obtido ao se passar de 1 g para 2 g/100 mL.

Em estudo anterior, realizado no mesmo laboratório, avaliou-se o efeito dos mesmos valores de concentração do extrato protéico do arroz sobre a remoção de Phe (BIZZOTTO et al., 2006a,b). Observou-se que apenas o aumento de 2 g para 3 g/100 mL foi prejudicial, uma vez que elevou o teor final de Phe, resultado este semelhante ao obtido para o segundo caso avaliado no presente trabalho (H4 e H6).

O conjunto destes resultados demonstra que o efeito da concentração do extrato protéico sobre a remoção de Phe é mais complexo do que o esperado, e pode estar

associado aos outros parâmetros empregados no processo. Desta forma, o aumento da concentração protéica poderia levar a resultados tanto positivos quanto negativos. Assim, se por um lado contribuiria para aumentar a probabilidade da enzima entrar em contato com o substrato, levando a uma maior exposição e remoção da Phe; por outro, uma maior quantidade de proteínas poderia provocar uma sobrecarga na coluna de carvão, reduzindo, conseqüentemente, a remoção de Phe.

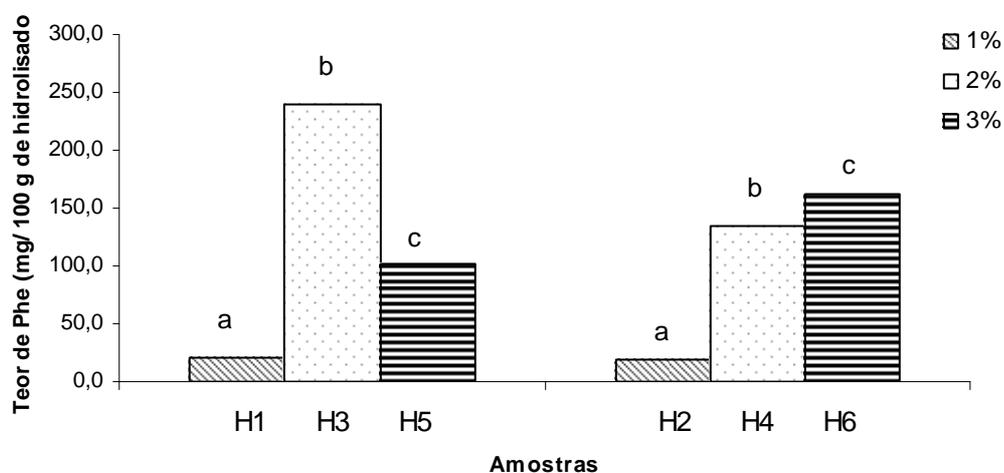


Figura II.1: Efeito da concentração do extrato protéico sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. EPF= Extrato protéico de fubá de milho. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade. Teor final de Phe dos hidrolisados após passagem na coluna de carvão ativado.

2.2 Efeito da relação enzima:substrato

Visando manter constantes os demais parâmetros (pH, temperatura, interrupção da reação hidrolítica), para se avaliar o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe, foram feitas as seguintes comparações: H1 com H2; H3 com H4; H5 com H6; H7 com H8 e H9 com H10 (Figura II.2).

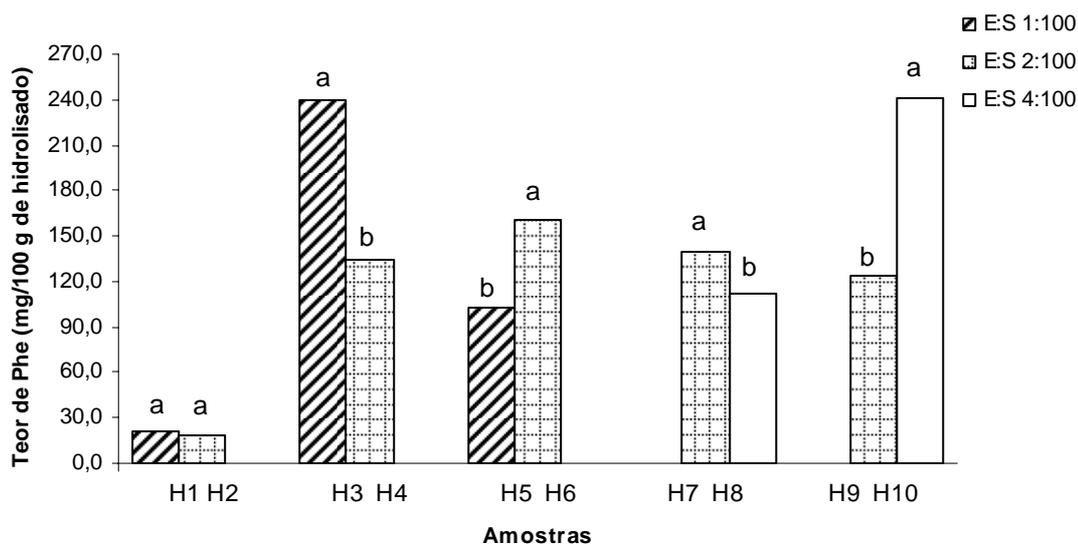


Figura II.2: Efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Pode se observar na Figura II.2, que o efeito desejável associando a diminuição da relação E:S com a redução do teor final de Phe dos hidrolisados, foi obtido em dois casos: de H6 para H5 (161,25 para 102,32 mg/100 g de hidrolisado) e de H10 para H9 (240,75 para 123,19 mg/100 g de hidrolisado). No caso de H2 para H1, a variação da E:S não teve efeito significativo sobre a remoção de Phe (18,80 para 20,64 mg/100 g de hidrolisado), enquanto que, para os outros dois casos (H4 para H3 e H8 para H7), a redução de E:S foi prejudicial, elevando o teor final de Phe (134,30 para 240,32 mg/100g de hidrolisado e 112,23 para 139,05 mg/100 g de hidrolisado, respectivamente).

Resultados semelhantes a alguns citados acima foram obtidos, anteriormente, em estudos realizados no mesmo laboratório. Assim, trabalhando com um outro cereal, o arroz, e com a mesma enzima aqui utilizada (corolase PP), BIZZOTTO et al. (2006b) mostraram que a redução da E:S de 2:100 para 1:100 não afetou a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos (1,77 e 1,57 mg/100 g de hidrolisado). Por outro lado, ao empregar a pancreatina, esta mesma alteração de E:S reduziu significativamente o teor final de Phe (63,53 para 8,12 mg/100 g de hidrolisado).

Além dos cereais, outras fontes protéicas foram estudadas anteriormente no mesmo laboratório, tais como leite em pó desnatado e soro de leite em pó. Os valores reportados nestes trabalhos foram bastante variados, sendo alguns semelhantes e outros

distintos dos aqui obtidos (LOPES et al., 2005a; SOARES et al., 2004; DE MARCO et al., 2004; SILVA et al., 2006).

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

2.3 Efeito da liofilização

O efeito da liofilização pode ser avaliado comparando-se o H6 com H7 (Tabela II.1). Como pode ser observado na Figura II.3, a etapa de liofilização foi prejudicial para a remoção de Phe, tendo elevado significativamente o seu teor final de 139,05 para 161,25 mg por 100 g de hidrolisado (H7 para H6).

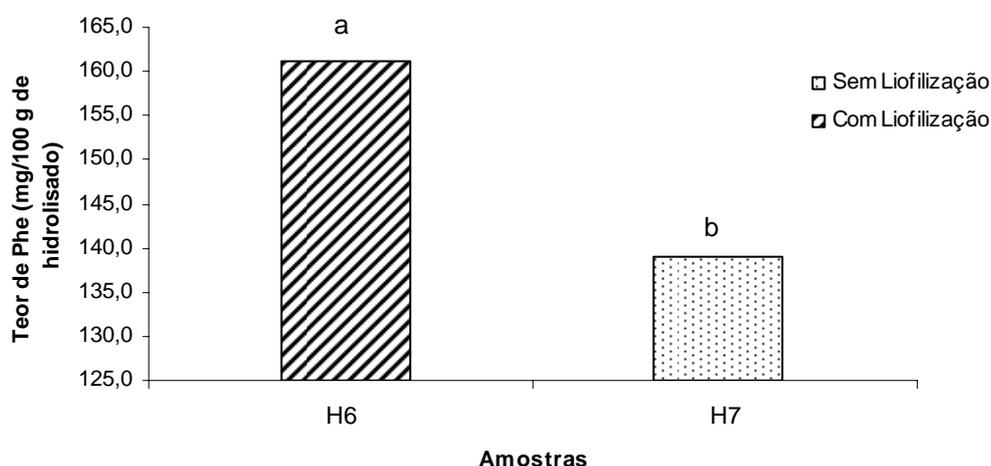


Figura II.3: Efeito da liofilização sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Uma explicação para este resultado poderia estar associada ao fato de que foi observado neste estudo que a liofilização provocou uma redução da solubilidade dos hidrolisados, o que poderia ter prejudicado a remoção de Phe.

Outra desvantagem da liofilização está associada à elevação significativa dos custos do processo, especialmente quando o interesse estiver voltado para a produção em larga escala.

2.4 Efeito da relação proteína:carvão

A avaliação do efeito da proteína:carvão sobre a remoção de Phe foi realizada com os hidrolisados de H7 a H10, os quais não foram submetidos ao tratamento de liofilização.

Pode-se observar na Tabela II.3 que a relação proteína: carvão afetou de maneira variada o teor final de Phe dos hidrolisados protéicos. Assim, a redução da relação proteína: carvão (maior quantidade de carvão) de 1:8 para 1:16 e de 1:16 para 1:88,5 foi benéfica para o hidrolisado H9, pois provocou uma queda no teor final de Phe. Para o hidrolisado H10, este mesmo efeito foi observado ao passar de 1:16 para 1:88,5. Por outro lado, no caso dos hidrolisados H7 e H8, a variação desta relação não afetou o teor final de Phe, podendo ser utilizada a menor quantidade de carvão para produzir o mesmo efeito. Isto seria benéfico do ponto de vista econômico, uma vez que o carvão é um dos itens que mais pesam no custo final do produto. Acrescenta-se ainda, que os dados da Tabela II.3 indicam que a relação 1:88,5 levou ao menor teor de Phe em 3 (H7, H8 e H9) das 4 amostras analisadas.

De todos os trabalhos encontrados na literatura, em apenas um (SOARES et al., 2004), desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho, foi avaliado o efeito da relação proteína: carvão sobre a remoção de Phe. Assim, observou-se que ao utilizar as relações de 1:60, 1:90 e 1:118 em hidrolisados de leite em pó não houve diferença significativa nos seus resultados, com uma média de remoção de Phe de 97 %. Estes resultados assemelham-se aos obtidos nos hidrolisados H7 e H8 do presente trabalho.

Tabela II. 3 - Efeito da relação proteína:carvão ativado sobre a remoção de fenilalanina

Hidrolisado	Relação proteína:carvão		
	Teor final de Phe (mg/ 100 g de produto)		
	1:8	1:16	1:88,5
H7	137,91 ^{az}	116,54 ^{ay}	139,05 ^{ay}
H8	113,05 ^{az}	104,91 ^{ay}	112,23 ^{ay}
H9	352,42 ^{ax}	289,08 ^{bx}	123,19 ^{cy}
H10	280,85 ^{ay}	280,09 ^{ax}	240,75 ^{bx}

Os resultados representam médias de triplicatas. Médias com letras iguais (a,b,c) não diferem entre si a 5 % de significância pelo teste de Duncan, na comparação da relação proteína: carvão de um mesmo hidrolisado (linha). Médias com letras iguais (x,y,z) não diferem entre si a 5 % de significância na comparação de uma mesma relação proteína: carvão para diferentes hidrolisados (coluna).

2.5 Efeito do modo de emprego do carvão ativado

Na Tabela II.4 estão apresentados o efeito do modo de emprego da CA. Observa-se que o emprego do CA tipo A isoladamente produziu melhores resultados (menor teor final de Phe) do que as associações com outros tipos B e C, para os hidrolisados H7 e H9. No caso do H8 não houve diferença significativa no emprego do carvão tipo A isoladamente ou em associação com os demais tipos. A associação dos três tipos de carvão (A,B e C) mostrou ser mais eficiente (menor teor final de Phe) apenas para uma das amostras analisadas (H10), para qual não houve diferença significativa entre o uso isolado do tipo A e sua associação com o B.

Observa-se, ainda, na Tabela II.4, que o emprego do carvão tipo A isoladamente levou ao menor teor final de Phe em 3 (H7, H8 e H9) das 4 amostras analisadas.

Deve-se ressaltar que, apesar de o emprego de apenas um tipo de carvão ser economicamente mais viável, na prática, o uso da associação dos 3 tipos de CA é a que deve apresentar melhor performance, no caso de produção em larga escala, uma vez que reduziria a pressão em uma coluna de grande porte. Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram esse efeito na remoção de Phe.

Tabela II. 4 – Efeito do modo de emprego de CA sobre a remoção de fenilalanina

Hidrolisado	Tipo de carvão ativado		
	Teor final de Phe (mg/ 100 g de produto)		
	Tipo A	Tipos A e B (1:1)	Tipos A, B e C (1:1:1)
H7	139,05 ^{by}	212,56 ^{ay}	203,82 ^{ay}
H8	112,23 ^{az}	107,56 ^{az}	108,39 ^{aw}
H9	123,19 ^{byz}	217,02 ^{axy}	230,63 ^{ax}
H10	240,75 ^{ax}	218,74 ^{ax}	149,27 ^{bz}

CA: Carvão Ativado; Relação proteína: carvão 1:88,5; Tipos de carvão ativado = Tipo A: 20x 50 mesh, Tipo B: 12 x 25 mesh, Tipo C: 6 x 12 mesh. Os resultados representam médias de triplicatas. Médias com letras iguais não diferem entre si a 5 % de significância pelo teste de Duncan, na comparação de diferentes tipos de carvão ativado de um mesmo hidrolisado (linha). Médias com números iguais (x,y,z,w) não diferem entre si a 5 % de significância na comparação de um mesmo tipo de carvão para diferentes hidrolisados (coluna).

CONCLUSÃO

O carvão ativado (CA) mostrou-se eficaz na remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de fubá de milho, empregando a corolase PP, tendo levado a teores finais de Phe que variaram de 18,80 a 240,75 mg Phe/100 g de hidrolisado. Este processo permitiria a utilização de todos os 10 hidrolisados aqui preparados em dietas para fenilcetonúricos, desde que fossem utilizados como fonte protéica na reconstituição do fubá de milho. Foram observados efeitos variados sobre a remoção de Phe ao se estudar diversos parâmetros, tais como concentração do extrato protéico, relação E:S, emprego da liofilização, relação proteína: carvão e modo de emprego do carvão ativado.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Dentre os métodos testados para a extração das proteínas do fubá de milho, o enzimático mostrou-se mais vantajoso, tendo atingido um rendimento de cerca de 84 %. Sugere-se a realização de estudos que envolvam a utilização deste método em escala piloto, com o objetivo de se avaliar a viabilidade econômica de sua aplicação industrial.

Pesquisas, ainda, devem ser realizadas empregando-se outras enzimas proteolíticas, de menor preço, para o preparo dos hidrolisados protéicos, assim como a combinação de diferentes tipos de enzimas, associando processamentos físicos e enzimáticos, com o intuito de aumentar o rendimento de extração. Além disso, a utilização de tecnologias como a ultra-filtração, podem, igualmente, ser empregadas para concentrar o extrato protéico, melhorando seu perfil peptídico e obtendo uma fonte rica em proteínas.

Sugere-se, também, a análise do perfil péptico dos hidrolisados obtidos dos extratos protéicos empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular para avaliar o grau de hidrólise das ligações peptídicas, e assim, relacionar o seu uso em pacientes com dificuldades digestivas.

Testes futuros, relacionados às propriedades funcionais destas proteínas isoladas, tais como a propriedade espumante, emulsificante, também podem ser feitos, com o objetivo de avaliar a interferência da extração na sua funcionalidade.

O resíduo obtido da extração protéica, com baixo teor de proteínas, também pode ser utilizado para outros fins, como uma fonte alimentar de pacientes portadores de patologias do fígado, dos rins, etc.

O mesmo resíduo pode ser submetido à avaliação da qualidade do amido, quanto as suas características reológicas e propriedades funcionais, visando o seu emprego em produtos de panificação.

O CA mostrou-se eficaz na remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de fubá de milho, empregando a corolase PP, tendo levado a teores finais de Phe que variaram de 18,80 a 240,75 mg Phe/100 g de hidrolisado. Contudo, outros aminoácidos aromáticos, tais como tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), também podem ser removidos pelo CA. Assim, propõe-se a realização do aminograma desses hidrolisados, para verificar possíveis perdas desses aminoácidos, assim como para avaliar, com mais detalhe, o valor nutricional destas preparações.

O uso de outras fontes protéicas, como matéria-prima (feijão, soja, outros cereais) para a obtenção de hidrolisados, e a forma de apresentação destes substitutos protéicos, tais como pastas, géis e até mesmo tabletes podem ser pesquisados, e desta forma diversificar a oferta de alimentos para fenilcetonúricos.

O extrato protéico obtido pode ser largamente aplicado na indústria alimentícia, como fonte protéica de suplementos nutricionais. Além disso, após passar por processos de remoção de fenilalanina, o hidrolisado pode ser reincorporado ao resíduo e tornando-se um alimento com baixo teor de Phe destinados a pacientes fenilcetonúricos. Este fubá de milho reconstituído com baixo teor de Phe, também, pode ser submetido ao processamento de extrusão e obtenção de *snacks*, assim como a obtenção de bebida nutritiva à base de milho, podendo futuramente, serem disponibilizados no mercado.

O carvão ativado foi eficiente para a remoção de Phe, mas a quantidade necessária para obter este benefício foi muito elevada. Desta forma, seria de grande importância a realização de um estudo sobre a recuperação e reutilização do CA.

Além disso, o emprego de outros meios adsorventes, como a Terra de diatomácea, podem ser testados para remoção de Phe, visando a redução dos custos do processo.

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.) *Sem. Prot. Fat Glob Modif.*, p. 97-105, 1993.
- ABIMILHO – Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho, 2004. Disponível em <<http://www.abimilho.com.br/riqueza.htm>>. Acesso em: 5 fev. 2004.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI S. Protocolo 1 – Phenylketonuria (PKU). In: Ross Products Division, Abbott Laboratories. *The ross metabolic formula system - Nutrition Support Protocol*. 3.ed. Columbia: Keziaz Strvat, 1997.
- ADACHI, S.; KIMURA, S.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* v. 45, p. 925-932, 1991.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29-33, 1981.
- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *J. Cereal Sci.*, v. 41, p. 283-290, 2005.
- AGUIAR, M.J.B. Experiências dos programas de triagem neonatal. In: XIV Congresso Brasileiro de Genética Clínica, 5, 2002, Ribeirão Preto (SP). Anais, SBGC, Ribeirão Preto (SP) p.16.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Arlington: *AOAC International*, 1995. 2 v.
- 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.
- 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.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; LOPES, D.C.F.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Microencapsulamento de hidrolisados de caseína em lipoesferas para mascarar o sabor amargo: avaliação físico-química e sensorial. *Rev. Bras. Ciên. Farmac.*, v. 38, p. 361 - 370, 2002a.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; SILVA, V.D.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Padronização de método analítico para avaliação do grau de exposição da fenilalanina em hidrolisados de caseína, por espectrofotometria derivada segunda. *Rev. Bras. Ciên. Farmac.*, São Paulo, v.38, n.1, p.113-119, 2002b.

- BARBOSA, C.M.S; MORAIS, H. A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, vol. 84 n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BIZZOTTO, C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Uso da pancreatina e do carvão ativado no preparo de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, 2006a. (Submetido para publicação).
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Ciên. Agrotec.*, 2006 b. (In press).
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. São Paulo: Varela, 1992. 222 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Secretaria de Desenvolvimento Rural. Portaria nº 11 de 12 de abril de 1996. Critérios para classificação do milho. Disponível em <http://www.engetecno.com.br/legislação/cereais_milho.htm> Acesso em : 6 fev. 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isenta de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 novembro 2002.
- BURTS, C.A.; ASHWOOD, E.R.T. - *Fundamentos de química clínica*. 4.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivate analysis of uv/visible spectra. *Amer. Laborat.*, v. 12, p. 101-112, 1980.
- CÂNDIDO, L.M.B. *Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (Oreochromus niloticus): composição, propriedades nutritivas e funcionais*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998. 207p. (Tese de Doutorado).
- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G., MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego de cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciên. Tecnol. Aliment.*, v.22, n.3, p.229-232, 2002.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; ORNELLAS, C.B.D.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farmac. Bonaerense*, v.23, n.1, p.17-25, 2004.
- CHATAUD, J.; DESREUMEUX, S.; CARTWRIGHT, T. Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. *Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1*. 14/12/1987, 20/07/1988.

- CHEFTEL, J-D.; CUQ, J-L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias-bioquímica-propiedades funcionales-valor nutricional-modificaciones químicas*. Acribia, 345p, 1989.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Sci. Techn.*, v.11, 2000.
- 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.
- COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.*, v. 32, p. 459-466, 1981.
- DA SILVA, L.C.S.; CARVALHO, T.S.; DA SILVA, F.B.; MORARI, L.; FRACHEL, A.A.; PIRES, R.; REFOSCO, L.F.; DESNICK, R.J.; GIUGLIANI, R.; PEREIRA, M.L.S. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Molec. Genetics Metab.*, v. 79, p. 17 - 24, 2003.
- DE MARCO, L. M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Imobilização da papaína em carvão ativado e em alumina, visando sua utilização no preparo de formulações dietéticas. *Tecno-Lóg.*, v. 8, n. 1, p. 83-89, 2004.
- 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-Lóg.*, v. 8, n. 2, 2004.
- 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. *Rev. Brás. Nutr. Clín.*, v. 20, p. 117-126, 2005.
- DICKEY, L.C.; DALLMER, M.F.; RADEWONUK, E.R.; PARRIS, N.; KURANTZ, M.; CRAIG, J.C. Zein batch extraction from dry-milled corn: cereal disintegration fluid shear. *Cereal Chem.*, v. 75, p. 443-448, 1998.
- DICKEY, L.C.; MCALOON, A.; CRAIG, J.C.; PARRIS, N. Estimating the cost of extracting cereal protein with ethanol. *Ind. Crops Products*, v. 10, p. 137-143, 1999.
- EMBRAPA. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). *Cultivares para 2005/2006* <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>>.br>, 2006. Acesso em: 20 fev. 2006.
- 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.
- EVERES, T. *Maize – a versatile performer on the world stage*. Disponível em <<http://www.satake.co.uk/noflash.html>>. Acesso em: 20 jan. 2004.

- FAGEER, A.S.M.; TINAY, A.H.E. Effect of genotype, malt pretreatment and cooking on in vitro protein digestibility and protein fractions of corn. *Food Chem.*, v.84, p. 613-619, 2004.
- 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). *FAO Statistical Databases* <<http://www.apps.fao.org/default.jsp>>, 2006. Acesso em: 5 fev. 2006.
- FAO (Food and Agriculture Organization). *Maize in Human Nutrition*. Rome:FAO, 1992. 168 p.
- FISCHER, M.; KOFOD, L.V.; SCHOLS, H.A.S.; PIERSMA, S.R.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 4463-4469, 2001.
- FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 307 p.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v.49, p. 343-359, 1990.
- GONÇALVES, R.A.; SANTOS, J.P.; TOMÉ, P.H.F.; PEREIRA, R.G.F.A.; ASCHERI, J.L.R.; ABREU, C.M.P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de griffts. *Cienc. Agrotec.*,v 27, p. 643-650, 2003.
- 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, p. 529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI, M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acids and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65-69, 1986.
- GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.Y; CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, v. 41, n.1, p.79-89, 2000.
- HOJILLA-EVANGELISTA, M.P.; JOHNSON, L.A.; MYERS, D.J. Sequential extraction processing of flaked whole corn: alternative corn fractionation technology for ethanol production. *Cereal Chem.*, v. 69, p. 643-647, 1992.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 671, p.33-37, 1981.

- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 494, p. 267-270, 1977.
- KAMPEN, W.H. Recovery of protein isolate and/or starch from cereal grains. United States Patent 5.410.021, 1995.
- 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. *Enz.*, v. 38, p. 321-327, 1987.
- LAHL, W.J. ; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, v. 48, p. 68-67, 1994.
- LANDRY, J. Comparison of extraction methods for evaluating zein content of maize grain. *Cereal Chem.*, v. 74, p. 188-189, 1997.
- LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of the glutelins of the grain corn: Selective extraction and composition in amino acids of the three isolated fractions. *Bull. Soc. Chem. Bio.*, v. 52, p. 1021-1037, 1970.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995. 761 p.
- LEVY, H.L. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, n. 5, p. 1811-1813, 1999.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P.R.; JULIEEN, A.R.; PEJOAN, C.H.; VERNEUIL, B. Procède pour preparer um hydrolysat enzymatique. Tessengerlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessengerlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *British Food J.*, v. 107, n.1, p. 42-53, 2005a.
- LOPES, D.C.F; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Technol.* , v. 38, n.5, pp 447-453, 2005b.
- LOPES, D.C.F.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; MARES-GUIA, T.R.; SANTORO, M.M.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para retirada de

fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado para fenilcetonúricos. *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, v. 17, p. 130-136, 2002.

LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, n. 4, p. 938-942, 1991.

MaCDONALD, A.; DALY, A.; DAVIES, P.; ASPLIN, D.; HALL, S.K.; RYLANCE, G.; CHAKRAPANI, A. Protein substitutes for PKU: What's new? *J. Inherit. Metab. Dis.*, v. 27, p.363-371, 2004.

MaCDONALD, A.; FERGUSON, C.; RYLANCE, G.; MORRIS, A.A.M.; ASPLIN, D.; HALL, S.K.; BOOTH, I.W. Are tablets a practical source of protein substitute in phenylketonuria? *Arch. Dis. Child.*, v. 88, p. 327-329, 2003.

MANGELSDORF, P.C.; REEVES, R.G. *The origin of Indian corn and its relatives*. Texas: Texas Agric. Exp. Stn., 1939.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p. 1163-1169, 1992.

MARCO, D.; WAITZBERG, D.L. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: WAITZBERG, D.L. (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, 1996. p. 1-12.

MILUPA. *Protein substitutes for the dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia*, 1995

MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. 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 Alimen.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.

MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. *J. Food Biochem.*, v.27, n.6, 2003.

MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, v. 13, p. 843-857, 2000.

MOSZCZYNSKI, P.; IDIZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *App. Biochem. Microbiol.*, v. 29, p. 302-306, 1993.

- NAKAMURA, T.; SYUKUNOBE, Y.; SAKURAI, T.; IDOTA, T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwiss.*, v.48, p.11-14, 1993.
- NEWMANN, P.E.; WALL, J.S. Chemical and physical properties of proteins in wet-milled corn gluten. *J. Cereal Chem.*, v. 61, p. 353-356, 1984.
- NIELSEN, S.S. *Food analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- O'HAVER, T. C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength.-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v.25, p.1548-1553, 1979.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. *Valio Oy, Helsinki, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.*
- PAULIS, J.W.; WALL, J.S. Fractionation and characterization of alcohol-soluble reduced corn endosperm glutelin proteins. *Cereal Chem.*, v. 54, p. 1223-1228, 1977.
- PEARCE, R.J. Food functionally uses or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, p. 15-23, 1995.
- PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol.*, v. 48, p.96-99, 1994.
- PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; LQARI, H.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. *Internat. Dairy J.*, v. 14, p. 527-533, 2004.
- PESSOA, A. Milho. Disponível em:<<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/economia/agric/producao/milho/index.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2004.
- 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 phenylketonuria. *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.*, v.23, p.1871-1875, 1984.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Am. Soc. Microb.*, v.6, p. 597-635, 1998.
- 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, p.753-761, 1988.
- SAHA, B.C.; HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.*, v. 19, p. 355-370, 2001.
- 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.*, v. 96, n. 5, p. 2339-2344, 1999.
- 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. eds. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. p.1015-1075, 1997.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos; propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- 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*.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M.; DE VOR, R.E. Solvent extraction of zein from dry-milled corn. *Cereal Chem.*, v. 77, p. 724-730, 2000.
- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite para o preparo de formulação dietética. *Alimen. Nutr.*, 2006 (Submetido para publicação).
- SILVESTRE, M.P.C., DAUPHIN, C., HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta.*, v. 282, p.603-612, 1993.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, p.2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2783 - 2789, 1994b.
- SIRTORI, L.R.; DUTRA-FILHO, C.S.; FITARELLI, D.; SITTA, A.; HAESER, A.; BARSCHAK, A.G.; WAJNER, M.; COELHO, D.M.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.;

- GIUGLIANI, R.; DEON, M.; VARGAS, C.R. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochem. Biophysic. Acta.*, v.1740, p. 68-73, 2005.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M. P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 2006 (In press).
- 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.
- SOUZA, C.F.M.; SCHWARTZ, I.V.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciência & Saúde Coletiva.*, v. 7, p. 129-137, 2002.
- SPRONSEN, F.J.V.; RIJIN, M.V.; BEKHOF, J.; KOCH, R.; SMIT, P.G.A. Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, p. 153-157, 2001.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 3. ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1988.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, S.; SHELLHAMMER, T.H. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran.1. physical processing and enzyme treatments. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p. 7444-7448, 2002.
- TOSELLO, G. A. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. *Melhoramento e produção do milho*. Fundação Cargill: Campinas, 2 ed., 1987. p. 375-403.
- 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.
- USP (Universidade do Estado de São Paulo). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2005. Disponível em <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em 15 out 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.
- VINU, A. HOSSAIN, K.Z.; KUMAR, G.S.; ARIGA, K. Adsorption of L-histidine over mesoporous carbon molecular sieves. *Carbon.*, v. 44, p. 530-536, 2006.
- WALTER, J.H.; WHITE, F.J.; HALL, S.K.; MACDONALD, A.; RYLANCE, G.; BONEH, A.; FRANCIS, D.E.; SHORTLAND, G.J.; SCHMIDT, M.; VAIL, A. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria. *The Lancet.*, v. 360, p. 55-57, 2002.
- WANG, L.; WANG, Y.J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *J. Cereal Sci.*, v. 39, p. 291-296, 2004.

- YOUSIF, N.E.; TINAY, A.H.EI. Effect of fermentation on protein fractions and in vitro protein digestibility of maize. *Food Chem.*, v. 70, p. 181-184, 2000.
- 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.
- ZIEGLER, F; OLLIVIER, J.M.; CYNBER, 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.

122 Referências