

WENDEL DE OLIVEIRA AFONSO

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS
DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE
LEITE COM ELEVADO TEOR DE DI-
TRIPLEPTÍDEOS PARA UTILIZAÇÃO EM
NUTRIÇÃO CLÍNICA**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2008**

WENDEL DE OLIVEIRA AFONSO

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS
DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE
LEITE COM ELEVADO TEOR DE DI-
TRIPLEPTÍDEOS PARA UTILIZAÇÃO EM
NUTRIÇÃO CLÍNICA**

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

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2008**

*Todo este trabalho é dedicado à DEUS,
à minha família original, meus pais (Afonso e Ilza) e minha irmã (Angelita),
à e minha família profissional (BROMATOLOGIA P&D – UFMG) e
a todos aqueles que me ajudaram, cientes ou não disto!*

AGRADECIMENTOS

À DEUS;

À Professora Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre por me receber, confiar no meu trabalho e por todas as oportunidades que sempre me apresentou;

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

À pesquisadora Viviane Dias Medeiros Silva pela infinita colaboração nos mínimos detalhes deste trabalho;

Aos alunos e amigos Letícia Menicucci e Vinícius Demoro por toda dedicação, afinho e cuidados neste trabalho;

Ao funcionário Marcos Laje pela convivência e constante ajuda;

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

Especialmente, aos meus pais, Afonso e Ilza, por acreditarem em todo o meu trabalho sem mesmo conhecê-lo a fundo;

À minha irmã Angelita pela amizade e incondicional apoio;

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

Muito obrigado!

“É preferível a angustia da busca à paz da acomodação”
(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SIGLAS / ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	15
1. SORO DE LEITE	15
2. AS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE	16
2.1. β-lactoglobulina	17
2.2. α-lactalbumina	18
2.3. Aplicações clínicas das proteínas do soro de leite	18
3. CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE	21
4. HIDROLISADOS PROTÉICOS	22
4.1. Importância nutricional	22
4.2. Processo de hidrólise	26
4.3. Proteases	27
5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS	29
TRABALHO EXPERIMENTAL	31
CAPITULO I	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. MATERIAL	37
2.2. MÉTODOS	38
2.2.1. Determinação da composição química do concentrado protéico do soro de leite	38
2.2.2. Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite	38
2.2.3. Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite	39
2.2.4. Análise estatística	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE	41
3.2. Caracterização dos hidrolisados do Concentrado Protéico do Soro de Leite	42
3.2.1. Perfil peptídico dos hidrolisados protéicos	42
3.2.2. Teor de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados	44
3.3. Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos	46
3.3.1. Efeito da concentração da matéria-prima	47
3.3.2. Efeito da relação E:S	48
3.3.3. Efeito do tempo de hidrólise	50
4. CONCLUSÃO	51

CAPITULO II.....	52
RESUMO	52
ABSTRACT	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. MATERIAL.....	56
2.2. Métodos	56
2.2.1. Determinação da composição química do concentrado protéico do soro de leite.....	56
2.2.2. Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite.....	57
2.2.3. Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite	58
2.2.4. Análise estatística	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE.....	59
3.2. Caracterização dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite	60
3.2.1. Perfil peptídico dos hidrolisados protéicos.....	60
3.2.2. Teores de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados.....	62
3.3. Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos.....	64
3.3.1. Efeito da concentração da matéria-prima	65
3.3.2. Efeito da relação E:S.....	67
3.3.3. Efeito do tempo de hidrólise	68
4. CONCLUSÃO	70
CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
OUTRAS PUBLICAÇÕES	85

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela I.1 - Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....	39
Tabela I.2 - Composição química do concentrado protéico do soro de leite.	41
Tabela I.3 - Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite obtidos pela ação da subtilisina.....	45

Capítulo II

Tabela II.1 - Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo de hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....	57
Tabela II.2 - Composição química do concentrado protéico do soro de leite.	59
Tabela II.3 - Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite obtidos pela ação da pancreatina.....	63

LISTA DE FIGURAS

Trabalho experimental

Figura 1– Principais etapas do trabalho experimental.....32

Capítulo I

Figura I.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado S1 a 230 nm.....42

Figura I.2 - Efeito da concentração de matéria-prima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....47

Figura I.3 - Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.49

Figura I.4 - Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....50

Capítulo II

Figura II.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado P1 a 230 nm.....60

Figura II.2 - Efeito da concentração de matéria-prima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....66

Figura II.3 - Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....67

Figura II.4 - Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....69

LISTA DE SIGLAS / ABREVIATURAS

α-La	α -lactalbumina
β-Lg	β -lactoglobulina
ACF	Área corrigida da fração
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
CM	Concentração de matéria-prima
DBO	Demanda biológica de oxigênio
E:S	Relação entre a quantidade de enzima e do substrato
EDS	Espectrofotometria Derivada Segunda
FAO	Food and Agriculture Organization
GSH	Glutathiona
GSSG	Glutathiona Oxidada
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
NF	Nanofiltração
PER	Coeficiente de Eficiência Protéica
PHEA	Poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica
REDOX	Ciclo de Oxi-redução
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato
SE-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular
SOX	Estresse Oxidativo
TL - HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de troca de ligante
UF	Ultrafiltração
WHO	World Health Organization
WPC	Concentrado protéico do soro de leite

RESUMO

Hidrolisados protéicos são produtos destinados, primeiramente, ao uso por indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional. No presente trabalho, o concentrado protéico do soro de leite (WPC), foi utilizado como matéria-prima. Esta aplicação baseia-se não apenas nos diversos estudos que ressaltam o valor nutritivo destas proteínas e a capacidade em estimular a síntese de glutathiona, como também na alta estabilidade, conservação das características físico-químicas de seus componentes e facilidade de manipulação laboratorial. O objetivo deste trabalho foi a hidrólise enzimática das proteínas do WPC, empregando-se, separadamente, a subtilisina e pancreatina sob diferentes condições hidrolíticas, a fim de se obter preparações com perfil peptídico nutricionalmente adequado, ou seja, elevado teor de di-tripeptídeos e aminoácidos livres e pequeno conteúdo de grandes peptídeos. Para isso, foram otimizadas as etapas do processo de hidrólise, visando, também, a redução de custos para adaptação destas à produção em escala industrial. A análise do perfil peptídico destes hidrolisados foi realizada pelo fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular, seguida pela quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pelo método da Área Corrigida da Fração. Desta forma, utilizando-se a subtilisina, o melhor perfil peptídico foi encontrado para um hidrolisado ao se empregar uma concentração de matéria-prima de 10 %, relação enzima:substrato de 4:100, após 5 h de reação, tendo obtido 13,34 % de di-tripeptídeos, 45,56 % de aminoácidos livres e, apenas, 12,28 % de grandes peptídeos. Ao se utilizar a pancreatina, nove hidrolisados apresentaram resultados semelhantes, do ponto de vista nutricional, ou seja, baixos teores de grandes peptídeos (12,80 %, em média), assim como altos teores de di-tripeptídeos (12,11 %, em média) e de aminoácidos livres (49,06 %, em média).

Palavras-chave: hidrolisados protéicos, subtilisina, pancreatina, concentrado protéico do soro de leite, di-tripeptídeos, perfil peptídico.

ABSTRACT

Protein hydrolysates are mainly used in patients with nutritional and physiological needs uncovered by traditional food. In this present work, whey protein concentrate (WPC) was used as raw matter considering its nutritional value, capacity to synthesize glutathione, stability, physical and chemical properties and laboratorial easy-handling. The aim of this work was the preparation of whey protein hydrolysates containing high di-tripeptides and free amino acid contents, as well as low amounts of large peptides. Commercial subtilisin and pancreatin were used separately, under different hydrolysis conditions and some process stages were optimized in order to reduce the scaling-up costs. The peptide profile of these hydrolysates was determined by fractionation on size-exclusion-HPLC, followed by quantification of peptides and free amino acids by the Rapid Correct Fraction Area method. When using subtilisin, the best peptide profile was obtained using raw matter concentration of 10 %, an enzyme:substrate ratio of 4:100, after 5 h of reaction, reaching 13,34 % of di-tripeptides, 45,56 % of free amino acids and just 12,28 % of large peptides. For pancreatin, the beneficial effect on the peptide profile was observed in nine cases, and it was mainly associated with low content of large peptides (12,80 %, in average) and high amount of di-tripeptides (12,11 %, in average) and free amino acids (49,06 %, in average).

Key words: Protein hydrolysates, subtilisin, pancreatin, whey protein concentrate, di-tripeptides, peptide profile.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho faz parte da Linha de Pesquisa denominada “Propriedades nutricionais e funcionais de proteínas alimentares”, criada em 1994 pela coordenadora do Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia – UFMG – e orientadora deste estudo. A meta final desta linha de pesquisa consiste na produção de suplementos dietéticos e alimentos para fins dietéticos especiais com diversas aplicações relevantes para as áreas de nutrição e saúde, assim como a obtenção de ingredientes ou agentes funcionais para alimentos e medicamentos.

O laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG apresenta em seus trabalhos o interesse no desenvolvimento de hidrolisados protéicos para finalidades diversas, tanto clínicas, como suplemento alimentar, quanto funcionais, como importante ingrediente para indústria alimentícia. Neste sentido, diferentes fontes protéicas, enzimas e condições hidrolíticas têm sido testadas a fim de se obter hidrolisados com um perfil peptídico apropriado para diferentes aplicações (MORATO *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2004; CARREIRA *et al.*, 2004; DE MARCO *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; BIZZOTTO *et al.*, 2006; DELVIVO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

O concentrado de proteínas do soro (WPC), produto originado da separação por membranas das proteínas do soro, é matéria-prima do presente trabalho e contém de 35 a 80 % de proteínas (BRANS *et al.*, 2004). Considerando-se o conteúdo do soro de leite *in natura* em todos os aspectos que tangem as características nutricionais, é importante para a utilização destas proteínas em suplementos alimentares que as mesmas estejam sob a forma de WPC. Tal fato está associado a alguns fatores como o maior teor de proteínas do WPC comparado ao soro de leite, a maior estabilidade, a conservação das características físico-químicas dos componentes além da facilidade de manipulação em laboratório (BRANS *et al.*, 2004; MICKE *et al.*, 2002).

A hidrólise consiste em um processo de clivagem das ligações peptídicas das proteínas transformando-as em peptídeos de diferentes tamanhos e em aminoácidos livres. Essa hidrólise protéica pode ser realizada por enzimas, ácidos ou bases. A hidrólise química é um processo de difícil controle, que origina produtos com reduzida qualidade nutricional, devido à formação de D-aminoácidos e de substâncias tóxicas, como a lisinoalanina (LAHL e BRAUN, 1994; CLEMENTE, 2000). Esse método também pode destruir o triptofano, a lisina e a treonina e causar racemização da maioria dos aminoácidos (ADLER-NISSEN *et al.*, 1985).

O processo de hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, como especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial para produção em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (MANNHEIM e CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995; CLEMENTE, 2000).

A hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL ., 1993; DUARTE *et al.*, 1998). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor nutritivo dos alimentos (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Além da melhoria das propriedades funcionais e sensoriais, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas por meio do tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (VIJAYALAKSHIMI *et al.*, 1986).

Durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di-tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres (FRENHANI & BURINI, 1999).

Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di-tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (RÉRAT *et al.*, 1993; FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA *et al.*, 2000; CLEMENTE *et al.*, 2000).

Nesse sentido, a introdução de hidrolisados protéicos ricos em oligopeptídeos, especialmente di-tripeptídeos, na dieta pode ser importante, principalmente, em determinadas situações como síndromes de má absorção intestinal, intolerância às proteínas do leite e em casos de deficiência enzimática, como por exemplo, fenilcetonúria (CHATAUD *et al.*, 1988; FREITAS *et al.*, 1993; GONZÁLES-TELLO *et al.*, 1994; BOZA *et al.*, 1995; CLEMENTE, 2000).

Ademais, as proteínas do soro contêm várias seqüências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo animal. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, antihipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, anticolesterolemica, moduladora dos fatores de crescimento celular e antioxidantes (PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001; GAUTHIER & POULIOT, 2003; SGARBIERI, 2004; PACHECO *et al.*, 2005; SINHA *et al.*, 2007; SAINT-SAUVEUR *et al.*, 2008). Ainda, importantes aplicações clínicas tem sido atribuídas às proteínas do soro de leite devido a sua capacidade de estímulo à síntese de glutathiona celular e proteção contra o estresse oxidativo (SOX) (BRINK *et al.*, 1996).

Para se obter hidrolisados com qualidade nutricional elevada e com propriedades desejáveis e agradáveis ao consumidor, é importante o controle das condições hidrolíticas, como pH, temperatura, tipo de enzima, tempo de hidrólise, tipo e concentração da matéria-prima, relação enzima:substrato e inativação enzimática ao final do processo (SVENNING *et al.*, 1993; CÂNDIDO, 1998).

A avaliação dos teores dos peptídeos nos hidrolisados protéicos envolve, inicialmente, o fracionamento das amostras. Neste sentido, várias técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, mas estas apresentam inúmeros inconvenientes, tais como interações entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (LEMIEUX *et al.*, 1991; SCHIMIDT & POLL, 1991; DAVIS & LEE, 1992; GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992; LI-JUN *et al.*, 2007).

SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método eficiente para fracionamento e quantificação de peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli-(2-hidroxietil-aspartamido)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, sendo este método empregado no presente trabalho.

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos das enzimas subtilisina e pancreatina, separadamente, sob diferentes condições hidrolíticas, a fim de se obter hidrolisados do WPC ricos em di-tripeptídeos e aminoácidos livres além de conter baixo teor de grandes peptídeos. Para isso, as etapas do processo foram otimizadas, visando, também, a adaptação à produção em escala industrial.

REVISÃO DE LITERATURA

1. SORO DE LEITE

Soro de leite (ou também como comumente denominado: Soro de Queijo) é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína, principal proteína do leite (SGARBIERI *et al.*, 1996; SISO *et al.*, 1996). É também definido como subproduto da fabricação de queijo sendo considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial usado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento (SISO *et al.*, 1996; WALZEN *et al.*, 2001). Este subproduto representa cerca de 85-90 % do volume e retém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite (SISO *et al.*, 1996).

O soro apresenta um alto conteúdo em matéria orgânica, associado, principalmente, à presença de lactose e proteínas, componentes estes responsáveis por seu alto potencial de putrefação e demanda biológica de oxigênio (entre 30.000 e 50.000 mg de oxigênio por litro de soro). Descartar o soro sem um tratamento eficiente não é apenas um crime previsto por lei, mas também rejeitar um alimento de alta qualidade constituído por uma rica fonte de proteínas com diversas propriedades nutricionais, biológicas e funcionais (ALMEIDA *et al.*, 2001; TORRES, 2005).

Entretanto, a visão do soro de leite como um poluente tem mudado radicalmente com as descobertas de propriedades funcionais e bioativas do soro e seus componentes sendo, agora, considerado um co-produto da produção de queijo (WALZEN *et al.*, 2001).

Os principais componentes do soro de leite são: lactose (4,5-5,0 %), proteínas solúveis (0,6-0,8 %), lipídios (0,4-0,5 %) e sais minerais (8,0-10 %) (SISO *et al.*, 1996). A composição do soro varia de acordo com o procedimento de separação da caseína obtendo-se dois tipos básicos de soro, o soro ácido (pH < 5,0) e o soro doce (pH 6,0-7,0). O soro doce é obtido no processo de coagulação enzimática (enzima quimosina) da caseína do leite, enquanto o soro ácido resulta da precipitação ácida no pH isoelétrico (pH = 4,6) desta mesma proteína (SGARBIERI *et al.*, 2004). O soro ácido geralmente contém mais cinzas e menos proteínas que o soro doce, sendo seu uso em alimentação mais limitado devido ao sabor ácido e alto teor salino (SISO *et al.*, 1996).

Em relação às suas propriedades funcionais, as proteínas do soro vêm sendo amplamente exploradas e têm recebido grande aceitação como ingrediente alimentar (SINHA *et al.*, 2007). Suas aplicações estão relacionadas a processos de emulsificação, gelatinização, capacidade de ligação com a água, solubilização, poder espumante e desenvolvimento de viscosidade (KORHONEN *et al.*, 1998).

O soro de leite pode ser utilizado para diferentes fins, como na fabricação de bebidas lácteas, na produção de ricota, como coadjuvante tecnológico e ingrediente da produção de alimentos industrializados como salsichas, biscoitos, bolos, doces, etc. (CHERYAN *et al.*, 1998); na formulação de hidrolisados protéicos com baixa concentração de gordura e lactose para alimentação de atletas (CORSI *et al.*, 2003); na utilização *in natura* para alimentação de animais (BERTOL *et al.*, 1996) e na formulação de hidrolisados protéicos isentos ou com baixa concentração de fenilalanina para pacientes fenilcetonúricos (KITAGAWA *et al.*, 1987; SHIMAMURA *et al.*, 1999).

Com relação a esta última utilização do soro, em estudos recentes feitos no mesmo laboratório aonde foi realizado o presente trabalho, grande parte da fenilalanina foi removida de hidrolisados enzimáticos preparados com pancreatina e papaína (SILVA *et al.*, 2007; DELVIVO *et al.*, 2006; DE MARCO *et al.*, 2005).

2. AS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

As proteínas do soro são globulares com um limitado número de ligações dissulfeto as quais conferem um determinado grau de rigidez estrutural e estabilidade. Comparadas com as caseínas, as proteínas do soro são mais termolábeis, menos sensíveis ao cálcio e podem formar estruturas oligoméricas (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989).

O soro contém aproximadamente 20 % das proteínas originais do leite. As duas principais proteínas são a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina, que perfazem de 70-80 % das proteínas totais do soro (SGARBIERI *et al.*, 1996).

Devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais, as proteínas do soro possuem um alto valor biológico quando comparado a outras proteínas. Seu teor em aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) contribui para um elevado valor de coeficiente de eficiência protéica (PER = 3,2), fator preponderante para o trabalho apresentado o qual é orientado à aplicação clínica desta fonte protéica (WALZEN *et al.*, 2001).

As proteínas do soro contêm uma alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) (WALZEN *et al.*, 2001; HA & ZEMEL *et al.*, 2003). Segundo HA & ZEMEL (2003), a abundância de leucina no soro é de particular interesse uma vez que este aminoácido têm sido identificado como iniciador da síntese protéica muscular. Ainda, em razão do seu relativo excesso em aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina e isoleucina), as proteínas do soro são suplementos alimentares efetivos quando comparados a proteínas vegetais, as quais são deficientes nestes aminoácidos (WALZEN *et al.*, 2001).

Praticamente todo aminoácido presente no soro doce excede as recomendações nutricionais de consumo da FAO/WHO (WALZEN *et al.*, 2001) tanto para crianças com idade de 2 a 5 anos quanto para adultos. Para adultos, as proteínas do soro oferecem mais que o dobro do mínimo preconizado. Com relação à composição aminoacídica do soro ácido, nada foi encontrado na literatura, porém segundo Portilho (2005) este soro possui proteína de menor qualidade devido à exposição à pHs muito baixos.

2.1. β -LACTOGLOBULINA

A β -lactoglobulina (β -Lg) é a principal proteína do soro de leite de ruminantes e porcos, não sendo encontrada em abundância no leite de muitas outras espécies. Da mesma forma que as caseínas, a β -lactoglobulina apresenta polimorfismo genético (variantes A, B, C) (SGARBIERI *et al.*, 1996).

Em pH entre 5,1 e 6,7, a proteína existe como um dímero estável devido à interação eletrostática entre ASP130 e GLU134 de um monômero com resíduos lisil de outro monômero (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; SGARBIERI *et al.*, 1996).

Embora isolada há 60 anos atrás, a função desta proteína, segundo WALZEN *et al.* (2001), ainda é desconhecida, mas ela se liga ao cálcio e zinco e a uma variedade de pequenas moléculas hidrofóbicas. Entretanto WIT (1998), em seu trabalho, atribuiu à β -lactoglobulina a propriedade de transportar a provitamina A. De acordo com o autor, a estrutura globular da β -Lg é extraordinariamente estável aos ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, tornando-a um resistente carreador de retinol (provitamina A) da vaca para o filhote. Porém, esta função biológica parece ser menos importante para bebês humanos, o que talvez explique por que a β -Lg não ocorre no leite humano (WIT *et al.*, 1998).

2.2. α -LACTALBUMINA

A α -lactalbumina (α -La) é uma proteína globular compacta e aparece como monômero no pH natural do leite (pH 6,6). Está presente no leite de todos os mamíferos, na qual a lactose é o principal açúcar apresentando, no leite bovino, uma proporção de α -La e β -Lg de 1:3 (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; WALZEN *et al.*, 2001).

A função biológica da α -La está relacionada com a síntese de lactose. A associação da α -La com o complexo lactose sintetase catalisa o último passo da biossíntese de lactose no tecido mamário (KINSELLA & WHITEHEAD., 1989; WALZEN *et al.*, 2001)

A α -La purificada é usada comercialmente em fórmulas infantis devido à similaridade estrutural e composicional em relação a principal proteína do leite materno. É também utilizada em alimentos protéicos para esportistas, pois constitui uma boa fonte de aminoácidos de cadeia ramificada, os quais estão envolvidos no fornecimento de energia e síntese protéica muscular (WALZEN *et al.*, 2001).

2.3. APLICAÇÕES CLÍNICAS DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

As proteínas do soro contêm várias seqüências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo animal. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, antihipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, anticolesterolemica, moduladora dos fatores de crescimento celular e antioxidantes (PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001; GAUTHIER & POULIOT, 2003; SGARBIERI, 2004; PACHECO *et al.*, 2005; SINHA *et al.*, 2007; SAINT-SAUVEUR *et al.*, 2008).

Alguns autores têm reportado a ação inibitória das proteínas do soro e seus peptídeos bioativos sobre a enzima conversora da angiotensina (ACE) e atividade hipotensiva em animais e humanos (VAN DER VEN *et al.*, 2002; VERMEIRSSSEN *et al.*, 2003). Em estudo realizado por COSTA *et al.* (2007) foi verificado que o uso de isolados de soro submetidos ao tratamento térmico, apresentaram estas atividades.

Alem disso, importantes aplicações têm sido atribuídas às proteínas do soro de leite em diversos aspectos clínicos. Fato este devido principalmente à sua capacidade de estímulo à síntese de glutathiona celular e, conseqüentemente, proteção contra o

estresse oxidativo (SOX) (BRINK *et al.*, 1996). Existem evidências de que o estresse oxidativo possa estar envolvido em mais de 50 eventos fisiopatológicos. Em diversas situações clínicas observam-se acentuadamente as ações deletérias do estresse oxidativo sob a função celular normal (BOUNOUS *et al.*, 1993; GIL *et al.*, 2003).

O papel primordial do ciclo de oxi-redução (REDOX) é a manutenção da integridade do sistema biológico frente ao estresse oxidativo (HADDAD & HARB., 2005). Neste mecanismo fisiológico a glutathiona (tripeptídeo formado por L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina), presente em concentrações milimolares em virtualmente todas as células animais, constitui a principal defesa intracelular contra o SOX. A presença do grupamento sulfidril reativo na molécula da glutathiona (GSH) é o responsável pelas propriedades relacionadas ao equilíbrio do estado REDOX intracelular (SHAN *et al.* 1990; SUTHANTIRAN *et al.*, 1990; HERZENBERG *et al.*, 1997; HADDAD & HARB., 2005).

No processo de inativação de um agente oxidante ocorre produção de glutathiona oxidada (GSSG) e depleção de glutathiona reduzida (GSH). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (FERREIRA & MATSUBARA., 1997).

Uma alteração na homeostase GSH/GSSG pode gerar doenças neurodegenerativas, como por exemplo, o Parkinson (YOUNDIM *et al.*, 1997). Em pessoas normais, o metabolismo endógeno da dopamina gera ROS, como por exemplo H₂O₂, os quais são removidos pela glutathiona para proteger o sistema nervoso. Observa-se que o nível de GSH diminui com a progressão da patologia, aumentando, conseqüentemente, a concentração de ROS no cérebro e agravando o quadro clínico da doença (SOFIC *et al.*, 1992; ADAMS & KLAIMAN., 2001).

Altos níveis de GSH contribuem para a função desintoxicante do fígado. Heranças metabólicas na síntese de GSH podem interromper significativamente a função hepática e levar a danos letais. As alterações nos níveis de GSH podem ser a causa de inúmeras patologias, como, por exemplo, a cirrose. Os alcoolistas apresentam menor produção de GSH pelo fígado, resultando em um aumento do número de ROS (TOWNSEND *et al.*, 2003).

A concentração de GSH varia significativamente tanto de tecido para tecido, quanto de organismo para organismo (TOWNSEND *et al.*, 2003). Inúmeros estudos

têm demonstrado que de acordo com o avanço da idade ocorre um aumento de estresse oxidativo, uma inativação de enzimas metabólicas, além de uma diminuição da relação glutatona oxidada/reduzida. Todos esses fatores influenciam no estresse oxidativo encontrado nos idosos. (FLINT *et al.*, 1993). Desta maneira, a dieta de idosos contendo proteínas do soro de leite hidrolisadas pode beneficiar o sistema imunológico do idoso e combater o estresse oxidativo, retardando o processo de envelhecimento (TOWNSEND *et al.*, 2003)

A glutatona está envolvida em diversos mecanismos da função imune, sendo uma delas a ativação de linfócitos. A diminuição de GSH causa disfunção do sistema imunológico, principal característica da infecção por HIV. Essa redução de GSH ocorre no plasma, no fluido epitelial e em células sangüíneas periféricas tanto em indivíduos assintomáticos, quanto naqueles com a doença propriamente dita (BUHL *et al.*, 1989). A deficiência de GSH causa, além da disfunção imune, a ativação do Fator Nuclear- κ B (*Nuclear Factor- κ B* - NF κ B) o qual está relacionado ao aumento da replicação viral e do estresse oxidativo (STAAL *et al.*, 1990). Essa deficiência causa ainda apoptose em células CD4⁺, agravando ainda mais o sistema imunológico do paciente HIV/AIDS (SUTHANTHIRAM *et al.*, 1990).

Defeitos de caráter autossômico recessivo na produção da enzima GSH sintetase (responsável pela síntese de glutatona) podem gerar problemas como retardo mental e disfunção neuropsiquiátrica em aproximadamente 50 % dos pacientes portadores dessa patologia. Existe também a glutatoniemia, caracterizada por um excesso de GSH no sangue. Essa síndrome pode causar os mesmos sintomas da deficiência de GSH, retardo mental e disfunção neuropsiquiátrica, porém, ainda não se sabe a gravidade desses sintomas. A fibrose cística é também uma desordem genética caracterizada por uma progressiva e deficiente produção sistêmica de GSH (TOWNSEND *et al.*, 2003).

As proteínas do soro podem exercer um papel importante na prevenção destas doenças associadas à glutatona, uma vez que são ricas em cisteína e peptídeos precursores deste composto. A cisteína é a principal fonte de grupamentos sulfidrila da glutatona sendo o aminoácido limitante em sua síntese. Alguns trabalhos têm demonstrado que a alimentação com proteínas do soro aumenta o nível plasmático de glutatona (MEISTER *et al.*, 1993; MICKE *et al.*, 2002). Dessa forma, preparações contendo proteína do soro de queijo, ricas em cisteína, vêm sendo propostas como uma dieta ideal para tal suplementação alimentar em diversas patologias (BOUNOUS *et al.*, 1993; MALLIS *et al.*, 2002).

Em estudos *in vitro*, Kent *et al.* (2002) verificaram, em células epiteliais da próstata humana, um aumento de aproximadamente 60% no nível de glutathiona intracelular após 48 h de aplicação de proteínas hidrolisadas de soro de queijo. No entanto, os autores observaram que o aumento de GSH ocorreu apenas quando a suplementação foi realizado por meio de proteína hidrolisada, sugerindo que o GSH apenas é sintetizado quando são fornecidos pequenos peptídeos.

Em outro estudo, Pacheco *et al.* (2005) utilizando camundongos, forneceram uma suplementação alimentar contendo 20 g de proteína hidrolisada de soro de queijo para cada 100 g de dieta, durante 15 dias. Observou-se, como resultado, o aumento da glutathiona sérica, sustentando a hipótese que a suplementação com esta proteína hidrolisada aumenta os níveis de GSH.

3. CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

Apesar de ser uma fonte de nutrientes de alto valor biológico, a utilização do soro de leite, *in natura*, é limitada devido às características perecíveis do material, a alta diluição de seus componentes e ao conteúdo de minerais. Desta forma, diversas tecnologias de processamento têm sido aplicadas de maneira a agregar valor a esta matéria-prima (BRANS *et al.*, 2004).

As principais proteínas do leite, caseínas e proteínas do soro, podem ser isoladas por manipulação de suas propriedades físicas e composicionais. Essas proteínas podem ser processadas de várias maneiras para criar uma gama de ingredientes com diversas características funcionais. Estes ingredientes incluem concentrado de proteínas do leite, isolado de proteínas do leite, caseínas, caseinatos, concentrado de proteínas do soro (WPC), isolado de proteínas do soro, hidrolisados e varias frações do leite (HUFFMAN & HARPER,1999).

Dentre as tecnologias utilizadas para agregar valor ao soro de leite, grande destaque tem sido dado às que envolvem a separação por membranas. A grande vantagem das tecnologias de separação, em comparação com processos físico-químicos, é a de ser um processo termicamente suave e puramente mecânico, obtendo-se proteínas na sua forma nativa, sem impacto negativo nas propriedades funcionais e nutricionais, garantindo, assim, sua aplicação como ingrediente na indústria alimentícia (USHIKUBO *et al.*, 2001; ROMAN & SGARBIERI, 2005).

Atualmente, o soro é concentrado por evaporação ou osmose reversa e desmineralizado por eletrodialise ou resinas de troca iônica. A nanofiltração (NF) é um

método alternativo para reduzir a quantidade de sais e concentrar as proteínas do soro em apenas uma etapa. As membranas de NF possuem alta permeabilidade para sais monovalentes (NaCl, KCl), e baixa permeabilidade para compostos orgânicos (lactose, proteínas, uréia). Este método reduz o consumo de energia obtendo um concentrado de proteínas parcialmente desmineralizado, que pode ser usado em produtos alimentícios e rações (BRANS *et al.*, 2004).

O WPC, produto originado da separação por membranas das proteínas do soro, e matéria-prima do presente trabalho, contém de 35 a 80 % de proteínas, enquanto o isolado protéico do soro, WPI, possui de 80 a 95 % de proteínas (BRANS *et al.*, 2004).

Várias aplicações importantes estão associadas ao WPC, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos cárneos, bebidas, de padaria e formulações infantis, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989).

Considerando-se o conteúdo do soro de leite em todos os aspectos que tangem as características nutricionais, é importante, para a utilização destas proteínas em suplementos alimentares, que as mesmas estejam sob a forma de WPC. Tal fato está associado a alguns fatores como o maior teor de proteínas do WPC comparado ao soro de leite, a maior estabilidade, a conservação das características físico-químicas dos componentes além da facilidade de manipulação laboratorial (MICKE *et al.*, 2002; BRANS *et al.*, 2004).

4. HIDROLISADOS PROTÉICOS

4.1. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

Hidrolisados protéicos são produtos destinados, primeiramente, ao uso por indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional (CLEMENTE *et al.*, 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000).

Historicamente, desde 1940 os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados para fins clínicos. Esta aplicação manifestou expressivo crescimento na década de setenta o qual continua ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CÂNDIDO *et al.*, 1998).

A dietoterapia é uma importante área a qual faz uso dos hidrolisados protéicos para complementar ou suplementar dietas de indivíduos incapazes de ingerir quantidades adequadas de alimentos de forma convencional, ou prover nutrição

especial para pacientes com necessidades fisiológicas e nutricionais particulares (CLEMENTE *et al.*, 2000).

Neste sentido, os hidrolisados protéicos têm sido utilizados, especialmente nos países desenvolvidos, na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como os recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, quadros gerais de má-absorção e fenilcetonúria (FREITAS *et al.*, 1993; BOZA *et al.*, 1995). Além disso, os preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, na nutrição de esportistas, como também, em dietas para controle de peso (FRØKJAIR *et al.*, 1994).

Ademais, proteínas e peptídeos de elevado peso molecular freqüentemente causam alergias. Desta forma, é crescente o uso de fórmulas preventivas ou terapêuticas contendo hidrolisados parciais de proteína considerando-se, principalmente, que o decréscimo no tamanho dos peptídeos tem relação direta com a diminuição da imunogenicidade (FREITAS *et al.*, 1993; GONZÁLEZ-TELLO *et al.*, 1994; BOZA *et al.*, 1995)

Vários autores descreveram o isolamento de peptídeos bioativos obtidos a partir da hidrólise de proteínas. Estes compostos podem apresentar efeitos benéficos para a saúde, como por exemplo, os peptídeos derivados da caseína que tem ação no sistema cardiovascular (ação antitrombótica e antihipertensiva), sistema nervoso (peptídeos opióides) e sistema imune (peptídeos imunomoduladores) (CLARE & SWAISGOOD, 2000; SILVA & MALCATA, 2005; SAINT-SAUVEUR *et al.*, 2008).

Ainda, as misturas de peptídeos são matérias-primas fundamentais para a qualidade de patês, pães, doces, produtos alimentícios fortificados, produtos alimentícios para crianças, nutrientes para dieta enteral, suplementos para atletas, entre outros (SHIMAMURA *et al.*, 1999).

A qualidade e o valor nutricional de um hidrolisado protéico dependem de três fatores essenciais (proteína de origem, modo de hidrólise e tamanho da cadeia peptídica), tal como a qualidade de uma proteína alimentar é função da natureza e da sua composição em aminoácidos, especialmente os essenciais (ANANTHARAMAN & FINOT *et al.*, 1993).

O valor nutricional dos hidrolisados protéicos depende da presença, em quantidade significativa, de determinados aminoácidos na forma de pequenos peptídeos, os quais, quando livres, apresentam problemas com relação à estabilidade e solubilidade. Assim, a tirosina e a cistina são pouco solúveis, a glutamina e a cisteína são instáveis em solução e facilmente destruídas durante as etapas de esterilização e

armazenamento. Entretanto, sob a forma de di- e tripeptídeos, estes aminoácidos apresentam boa solubilidade e estabilidade, o que mostra a importância do isolamento destes peptídeos de hidrolisados protéicos (FURST *et al.*, 1990; ANANTHARAMAM & FINOT, 1993). Por este motivo, a caracterização nutricional destas preparações deve envolver a quantificação destes aminoácidos nas diferentes frações peptídicas (SILVESTRE *et al.*, 1994a; MORATO *et al.*, 2000).

Além da melhoria das propriedades funcionais e sensoriais, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas por meio do tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (VIJAYALAKSHIMI *et al.*, 1986).

Durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di-tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres (FRENHANI & BURINI, 1999).

Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (RÉRAT *et al.*, 1993; FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA *et al.*, 2000; CLEMENTE *et al.*, 2000).

Vários trabalhos comparam a absorção entre os peptídeos originados de hidrólise enzimática de proteínas com uma mistura equivalente de aminoácidos livres. A velocidade de absorção intestinal foi consideravelmente maior para soluções contendo somente di-tripeptídeos, ou proteína parcialmente hidrolisada, do que aquelas constituídas apenas de aminoácidos livres (KEOHANE *et al.*, 1985; RÉRAT *et al.*, 1993; GONZÁLEZ-TELLO *et al.*, 1994; FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA *et al.*, 2000). O estudo dos mecanismos de absorção intestinal sugerem que a taxa de absorção de aminoácidos livres é menor do que aquela dos pequenos peptídeos porque na absorção de di-tripeptídeos a competição pelo mesmo sistema de transporte é parcial ou completamente eliminada (GRIMBLE & SILK, 1989; FRENHANI & BURINI, 1999; HERZEMBERGER & SANDHU., 2004).

Os di-tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di-tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di-

tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior e também relatam as vantagens dos di-tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção (FRENHANI & BURINI, 1999).

Misturas de aminoácidos livres também podem ser usadas para substituir alimentos protéicos em dietas especiais. Entretanto, estas preparações apresentam, pelo menos, três limitações à sua utilização, a saber: i) o sabor e o odor desagradáveis característicos de aminoácidos livres; ii) a alta osmolaridade que acarreta um aumento da pressão osmótica intestinal causando diarreia; iii) absorção reduzida, uma vez que os aminoácidos livres não são tão rápida e completamente absorvidos pelo organismo quanto os di-tripeptídeos presentes nos hidrolisados protéicos (SHIMAMURA *et al.*, 1999).

De forma complementar, a utilização de hidrolisados protéicos, além de ser vantajosa do ponto de vista nutricional, é consideravelmente menos onerosa que o emprego de misturas de aminoácidos sintéticos (COGAN *et al.* 1981, AUBES-DUFAU *et al.*, 1995).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise, o qual parece estar relacionado à liberação de aminoácidos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (MINAGAWA *et al.*, 1989; SAHA & HAYASHI, 2001).

Entretanto, alguns procedimentos podem ser utilizados para mascaramento do sabor amargo de hidrolisados protéicos, tais como adição de compostos para neutralizar o sabor, aplicação de cromatografia hidrofóbica, adsorção de peptídeos amargos, hidrólise com exopeptidases, adição de lactobacillus, formação de plasteína, tratamento com carvão ativado e extração com solventes orgânicos (SAHA & HAYASHI., 2001; MORAIS *et al.*, 2005).

A encapsulação em lipossomas e em lipoesferas foi utilizada no mesmo laboratório onde foi realizado o presente trabalho, tendo sido eficiente para mascarar o sabor amargo de hidrolisados enzimáticos de caseína, obtidos pela ação da papaína (BARBOSA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2005).

4.2. PROCESSO DE HIDRÓLISE

A hidrólise protéica é caracterizada pelo rompimento das ligações peptídicas das proteínas e pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. A hidrólise realizada por meio de ácidos ou álcalis é totalmente inespecífica, pode destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN *et al.*, 1985).

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFELL, 1993; DUARTE *et al.*, 1998). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor nutritivo dos alimentos (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Os processos químicos não são facilmente aceitos, principalmente devido a crescente preocupação do consumidor quanto à segurança alimentar. O tratamento enzimático, utilizando-se proteases específicas, apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE *et al.*, 1995). Além disto, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é freqüentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (REED *et al.*, 1975).

Por se tratar de uma reação enzimática a otimização do processo de hidrólise depende do controle de importantes variáveis, a saber: pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de matéria-prima, relação enzima:substrato, inativação enzimática ao final do processo (SILVESTRE *et al.*, 1994a,b; CÂNDIDO *et al.*, 1998).

A escolha da enzima proteolítica é também 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 (HAQUE & MOZAFFAR, 1992; SGARBIERI *et al.*, 1996).

A ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada por alguns autores para interrupção da reação hidrolítica. Nestes trabalhos, o meio reacional é

aquecido à temperaturas na faixa de 80 °C a 90 °C por aproximadamente 10 a 20 min (MINAGAWA *et al.* 1989; LOOSEN *et al.* 1991; NAKAMURA *et al.*, 1993, SILVESTRE *et al.*, 1994a, MORATO *et al.*, 2000).

Segundo KILARA (1998), o tempo requerido para atingir um determinado grau de hidrólise diminui exponencialmente com o aumento da temperatura da reação, até o momento em que a inativação enzimática pelo calor se torna significativa. Como as enzimas são termolábeis, o calor de desnaturação resulta em uma perda gradual de suas propriedades catalíticas, sendo crescente a taxa de inativação com o aumento da temperatura. Deste modo, se por um lado as temperaturas mais elevadas aumentam o rendimento das reações enzimáticas, por outro, podem provocar a inativação da enzima, dependendo do calor aplicado (REED *et al.*, 1975).

Desta forma, fica evidente que o controle dos parâmetros hidrolíticos nas modificações enzimáticas das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características sensoriais agradáveis ao consumidor (SILVESTRE *et al.*, 1994a; MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; CAPOBIANGO *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

4.3. PROTEASES

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação a ser clivada na cadeia peptídica (RAO *et al.*, 1998; CLEMENTE *et al.*, 2000).

Uma vez que são fisiologicamente necessárias para organismos vivos, as proteases são ubíquas, sendo encontradas numa ampla diversidade de fontes como plantas, animais e microrganismos (RAO *et al.*, 1998).

As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, região N ou C terminal, são classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. A presença de aminoácidos livres ou grupos carboxila tem um efeito negativo na atividade da enzima. Estas enzimas são divididas em quatro subgrupos de acordo com seu

mecanismo catalítico: serina proteases, aspartico proteases, cisteína proteases, e metaloproteases (RAO *et al.*, 1998).

Algumas proteases são produzidas por microorganismos, os quais são comuns entre os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Rhizopus* (DINIZ & MARTIN, 1999).

As subtilisinas originadas de *Bacillus* representam a segunda maior família de serina proteases (RAO *et al.*, 1998). Estas podem ser alcalinas (*Bacillus licheniformes*, *B. amylolyquefaciens*, *B. firmus*, *B. megaterium*, e *B. pumilis*) ou neutras (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*) (SGARBIERI *et al.*, 1996).

A pancreatina é um complexo enzimático constituído por enzimas secretadas pelo pâncreas que possuem atividades proteolíticas, amilolíticas e lipolíticas (PARK *et al.*, 2001). As proteases pancreáticas são divididas em endopeptidases (tripsina, quimotripsina e elastase) e exopeptidases (carboxipeptidases A e B) (HINSBERGER & SANDHU, 2004).

A tripsina catalisa apenas a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonilo (-CO-) é fornecido pela arginina ou lisina. A quimotripsina hidrolisa ligações peptídicas em que o referido grupo é fornecido pela fenilalanina, tirosina e triptofano. A elastase cliva ligações entre resíduos de aminoácidos alifáticos (SGARBIERI *et al.*, 1996; HINSBERGER & SANDHU, 2004).

A carboxipeptidase A cliva oligopeptídeos com resíduo carboxi-terminal aromático e não alcalino, enquanto a carboxipeptidase B atua especificamente em oligopeptídios com resíduo C-terminal lisina ou arginina (HINSBERGER & SANDHU., 2004).

A hidrólise seletiva de algumas ligações peptídicas é uma ferramenta importante para a obtenção de oligo e polipeptídeos (SGARBIERI *et al.*, 1996). Devido a sua especificidade, a pancreatina tem sido utilizada para produção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina (DELVIVO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2007; BIZZOTTO *et al.*, 2006).

Aproximadamente 60% do total das enzimas industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Nesta última, as proteases são utilizadas como auxiliares no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, laticínios, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteína hidrolisada e flavorizantes (FURLAN & OETTERER, 2002).

5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS

Vários métodos têm sido relatados na literatura visando o fracionamento de hidrolisados protéicos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), especialmente a de fase reversa (RP-HPLC), mostrou-se eficiente para separar peptídeos de um hidrolisado protéico, além de fornecer informações sobre a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade (LEMIEUX *et al.*, 1991). A cromatografia de troca iônica é outro método também utilizado para analisar os hidrolisados protéicos (DIZDAROGLU *et al.*, 1985).

A cromatografia de exclusão molecular (CEM) ou cromatografia em gel, especialmente a líquida de alta eficiência (HPLC) representa uma escolha interessante dentre as técnicas cromatográficas. Vários materiais têm sido elaborados como suporte para separar os peptídeos por tamanho. Muitos géis são estudados para saber qual é o melhor para determinado aminoácido ou peptídeo. Por exemplo, os géis Sephadex G-25 (AMIOT & BRISSON, 1980; ZHANG *et al.*, 1992), Sephadex G-10 (LANDRY *et al.*, 1988) e o Bio-gel P-2 (ILIEV & TCHORBANOV, 1992) são utilizados por vários autores para determinação do triptofano.

A cromatografia de troca ligante que envolve uma complexa formação de íons metálicos é outro método para separar peptídeos e aminoácidos de hidrolisados protéicos. Vários autores têm usado a cromatografia líquida de alta eficiência de troca ligante (TL-HPLC) para separar peptídeos de hidrolisados protéicos (SALMONA *et al.*, 1982).

A separação de proteínas pela técnica de HPLC também é uma técnica utilizada para separar peptídeos de hidrolisados protéicos (HARWALKAR *et al.*, 1993). LEMIEUX & AMIOT (1990) compararam a utilidade de cinco métodos cromatográficos para separar um hidrolisado protéico de caseína comercial. O melhor sistema para a distribuição do peso molecular foi o SE-HPLC. A combinação de SE-HPLC e RP-HPLC mostrou eficiência na separação de peptídeos fosforilados e desfosforilados no hidrolisado de caseína, além da identificação de mais de 200 destes compostos (LEMIEUX & AMIOT, 1990).

O fracionamento de oligopeptídeos apresenta problemas, ainda mais complexos, pois envolve a interação com o suporte cromatográfico. SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método eficiente para este fim, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-

aspartamido)-sílica (PHEA), que possibilitou a separação de peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 daltons.

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

A Espectrofotometria Derivada Segunda (EDS) foi empregada por SILVESTRE *et al.* (1993b) para analisar hidrolisados de caseína. Com este método, os autores estimaram o grau de hidrólise e a homogeneidade do hidrolisado (presença de hidrolisado protéico ou mistura de aminoácidos). Essa técnica tem sido utilizada com eficiência na avaliação do grau de encapsulação de hidrolisados enzimáticos de caseína (MORAIS *et al.*, 2004) e na determinação de aminoácidos aromáticos de hidrolisados enzimáticos de leite em pó (SOARES *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005), de soro de leite (DELVIVO *et al.*, 2004; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007) e de arroz (BIZZOTTO *et al.*, 2006).

LI-JUN *et al.* (2007) empregaram dois métodos cromatográficos (exclusão molecular em coluna Sephadex G25 e cromatografia líquida de alta eficiência com eletro spray espectrômetro de massa) para avaliar a distribuição de tamanho molecular de peptídeos obtidos de soro de leite pela ação de uma protease alcalina (alcalase). Neste trabalho a faixa de peso molecular evidenciada compreende os peptídeos de massa 600 a 1400 Da e de 300 a 1300 Da, para o primeiro e o segundo método, respectivamente.

SAINT-SAUVEUR *et al.* (2008), em estudos recentes, avaliaram as propriedades imunomoduladoras de peptídeos obtidos da hidrólise das proteínas isoladas do soro de leite com uso de tripsina e quimotripsina. Entretanto, o método analítico utilizado por estes autores para caracterizar o perfil peptídico (fracionamento por Foco Isoelétrico em Fase Líquida e quantificação por Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular) separa os peptídeos obtidos nas seguintes frações maiores que 10 kDa, entre 5 e 10 kDa, entre 2 e 5 kDa e menores que 2 kDa, não sendo eficiente para avaliação do conteúdo de di-tripeptídeos.

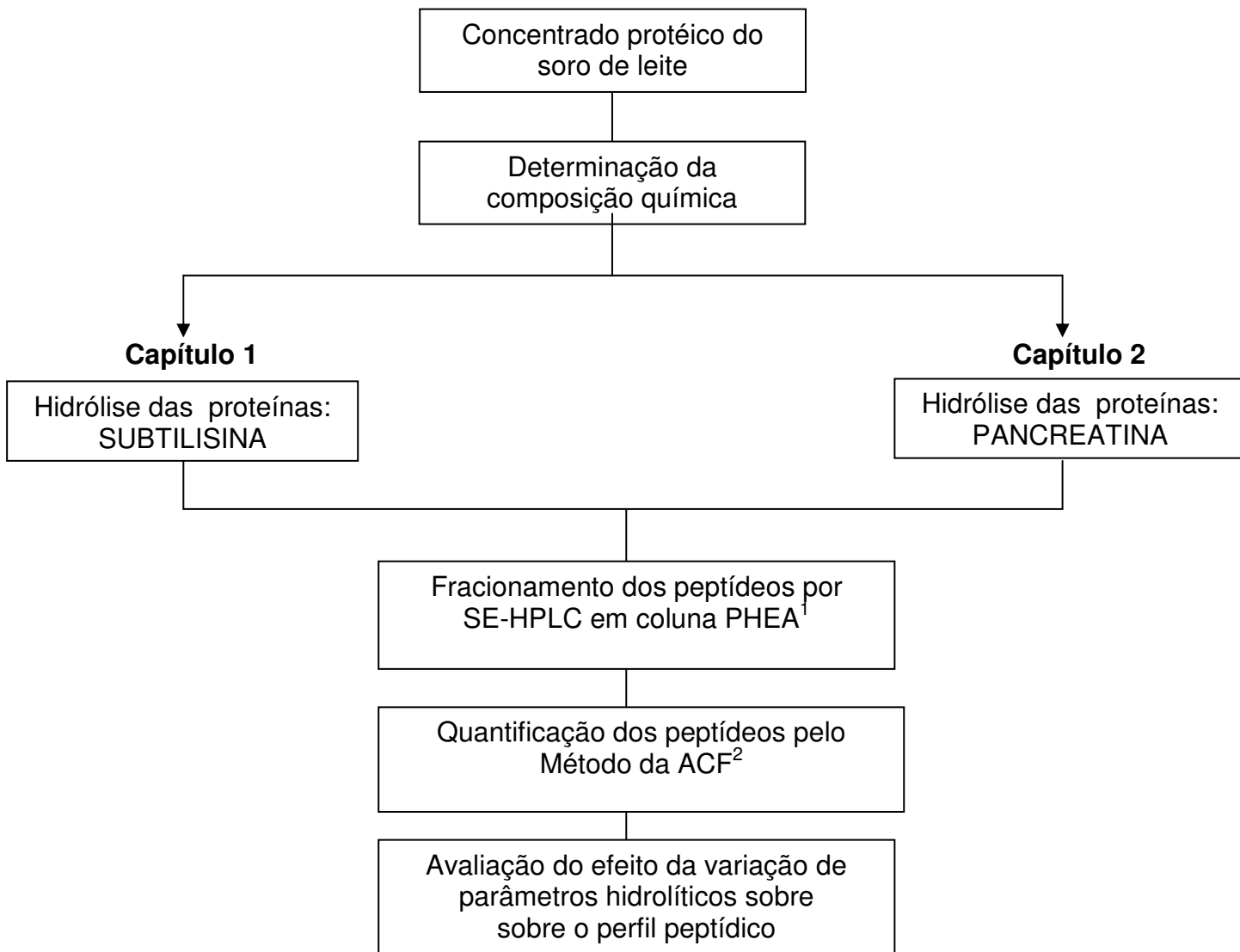
TRABALHO EXPERIMENTAL

APRESENTAÇÃO

Toda a parte experimental deste trabalho encontra-se apresentada na figura 1 abaixo, na forma de fluxograma. Os resultados foram divididos em dois capítulos e redigidos sob a forma de artigos científicos.

O primeiro capítulo refere-se à utilização de uma protease comercial (subtilisina) na obtenção de hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite ricos em di-tripeptídeos e aminoácidos livres, bem como com baixos teores de grandes peptídeos. Diversos parâmetros como concentração da matéria-prima, relação enzima:substrato e tempo de reação foram testados. Para isso, os dezoito hidrolisados obtidos foram fracionados, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da área corrigida da fração.

O segundo capítulo refere-se ao estudo de outra protease comercial (pancreatina) para obtenção de hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite com elevados teores de di-tripeptídeos e aminoácidos livres, bem como com baixo conteúdo de grandes peptídeos. As variáveis como concentração da matéria-prima, relação enzima:substrato e tempo de reação foram, igualmente, testadas, obtendo-se dezoito hidrolisados. Em seguida, estes hidrolisados foram fracionados e quantificados pelos mesmos procedimentos citados acima.



¹SE-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SILVESTRE *et al.*, 1994a).

²ACF: método rápido da área corrigida da fração (SILVESTRE *et al.*, 1994b).

Figura 1 - Principais etapas do trabalho experimental.

CAPITULO I

OBTENÇÃO DE ELEVADO TEOR DE DI-TRIPLEPTÍDEOS POR HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE COM SUBTILISINA

RESUMO

Visando a obtenção de um teor elevado de di-tripeptídeos, aminoácidos livres e redução no teor de grandes peptídeos, associados à diminuição dos custos para produção em larga escala, diferentes condições hidrolíticas foram testadas na obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite (WPC), por meio da aplicação de subtilisina comercial. Diversas condições hidrolíticas foram empregadas. Avaliaram-se o tempo de hidrólise (5, 10 e 15 h), a relação enzima:substrato (E:S) (1:100, 2:100 e 4:100) e a concentração da matéria-prima (CM = 10 % e 15 %). Caracterizou-se o perfil peptídico pelo fracionamento dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração. Para os parâmetros estudados, observaram-se efeitos variados da subtilisina na obtenção dos hidrolisados, sendo que o melhor perfil peptídico foi encontrado ao se empregar CM de 10 %, E:S de 4:100, após 5 h de reação, tendo obtido 13,34 % de di-tripeptídeos, 45,56 % de aminoácidos livres e, apenas, 12,28 % de grades peptídeos.

Palavras-chave: concentrado protéico do soro de leite, proteínas, hidrólise enzimática, subtilisina, di-tripeptídeos, perfil peptídico.

ABSTRACT

USE OF SUBTILISIN FOR HYDROLYSING WHEY PROTEIN CONCENTRATE AND OBTAINING HIGH DI-TRYPEPTIDE CONTENTS. With the aim of obtain high di-tripeptide and free amino acids contents, low amount of large peptides and low costs for the scaling-up process, different hydrolytic conditions were used for preparing enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate (WPC), using comercial subtilisin. Different hydrolytic conditions were tested, such as hydrolysis time (5, 10 and 15 h), enzyme:substrate ratio (E:S) (1:100, 2:100 and 4:100) and raw matter concentration (MC) (10 % and 15 %). The peptide profiles were characterized firstly using a fractionation method by a size-exclusion-HPLC followed by a rapid Correct Fraction Area method for quantifying the peptides. The action of subtilisin showed varied effects depending on the hydrolysis parameters used. The best peptide profile was obtained using a SC of 10 %, an E:S of 4:100, after 5 h reaction, reaching 13,34 % of di-tripeptides, 45,56 % of free amino acids and just 12,28 % of large peptides.

Key words: whey protein concentrate, proteins, enzymatic hydrolysis, subtilisin, di-tripeptides, peptide profile.

1. INTRODUÇÃO

Soro de leite é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína, principal proteína do leite. É também definido como subproduto da fabricação de queijo sendo considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial usado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento. Os principais componentes do soro de leite são: a lactose (4,5 - 5,0 %), proteínas solúveis (0,6 - 0,8 %, principalmente β -lactoglobulinas e a α -lactalbumina), lipídios (0,4 - 0,5 %) e sais minerais (8,0 - 10,0 %), variando de acordo com o procedimento de separação da caseína para obtenção do soro ácido (pH < 5,0) ou soro doce (pH 6,0 - 7,0) (SGARBIERI *et al.*, 1996; SISO *et al.*, 1996).

Apesar de ser uma importante fonte nutricional de proteínas, o uso do soro de leite, *in natura*, é limitado devido às características perecíveis do material, a alta diluição de seus componentes e o conteúdo de minerais. Desta forma, diversas tecnologias de processamento têm sido aplicadas de maneira a agregar valor a esta matéria-prima. Para tal, destacam-se processos baseados na manipulação das propriedades físico-químicas protéicas, os quais são capazes de isolar as principais proteínas do leite, caseínas e proteínas do soro (BRANS *et al.*, 2004).

O concentrado de proteínas do soro, WPC, produto originado da separação por membranas das proteínas do soro, e matéria-prima do presente trabalho, contém de 35 a 80 % de proteínas, enquanto o isolado protéico do soro, WPI, possui de 80 a 95 % de proteínas. Várias aplicações importantes estão associadas ao WPC, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos como carnes, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; BRANS *et al.*, 2004).

Um dos processos que promovem uma exponencial agregação de valor ao WPC é a hidrólise protéica, especialmente a hidrólise enzimática. Este tratamento propicia o fracionamento da proteína em unidades menores que a molécula original e tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL, 1993; DUARTE *et al.*, 1998). Observa-se, também, a partir de hidrolisados protéicos o isolamento de peptídeos bioativos com a capacidade de apresentar efeitos benéficos para a saúde, como, por exemplo, ação antitrombótica,

antihipertensiva, opióide e imunomoduladora (CLARE & SWAISGOOD, 2000; SILVA & MALCATA, 2005).

A hidrólise de proteínas pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. O tratamento enzimático, utilizando-se proteases específicas, apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise química, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, o emprego de condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995).

As subtilisinas, uma das proteases utilizadas neste trabalho, são originárias de várias espécies do gênero *Bacillus sp*, e representam a segunda maior família de serino-proteases, atuam numa faixa de pH alcalino ou neutro e apresentam ponto isoelétrico de aproximadamente 9,4 (OTTESEN & SVENDSEN, 1970; REED, 1975; SAGARBIERI, 1996; RAO *et al.*, 1998). A ação proteolítica das subtilisinas mostra preferência por ésteres de aminoácidos aromáticos e, em menor extensão, por ésteres da lisina e arginina. A ação da subtilisina parece ocorrer principalmente nas ligações peptídicas envolvendo os grupos amino e carboxila de resíduos neutros e ácidos (BEYNON & BOND, 1989; PEREA *et al.*, 1993).

Além da melhoria das propriedades funcionais e sensoriais, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas por meio do tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos sendo utilizadas, mais efetivamente, aqueles contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos (KEOHANE *et al.*, 1985; GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA *et al.*, 2000;).

A introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar uma melhor utilização das proteínas. Neste sentido, os hidrolisados protéicos vêm sendo usados na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção, fenilcetonúria, pessoas com alergia a proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade (FREITAS *et al.*, 1993; BOZA *et al.*, 1995). Além disto, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, pacientes HIV/AIDS, na nutrição de esportistas, como também, em dietas para controle de peso (FRØKJAIR *et al.*, 1994).

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética consiste na distribuição de peptídeos quanto ao tamanho da cadeia, pois sabe-se o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (VIJAYALAKSHIMI *et al.*, 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE *et al.*, 1985; GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000).

Neste sentido, SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método para fracionamento e quantificação de peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, sendo este método empregado neste trabalho.

O objetivo deste trabalho consistiu na obtenção de hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite ricos em di-tripeptídeos bem como apresentando elevado teor de aminoácidos livres e baixo teor de grandes peptídeos. A enzima proteolítica empregada foi a subtilisina e diferentes condições hidrolíticas foram empregadas. Para tal, otimizaram-se as etapas do processo, visando, também, a redução de custos para adaptação do processo a produção em escala industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

O concentrado protéico de soro de leite (WPC) na forma de pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A enzima subtilisina utilizada (Protemax N200) foi fornecida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil), é uma endopeptidase de origem bacteriana (*B. subtilis*), atividade 200 NU/g, estável em pH entre 4,7 e 7,5 com pH ótimo entre 7 e 7,5, temperatura ótima de 55 °C e temperatura de inativação acima de 80 °C por 20 min.

Um agitador magnético (Fisatom, modelo 752 A, São Paulo, SP, Brasil), com controle de temperatura e agitação, foi utilizado para homogeneizar a mistura. Um liofilizador (Freeze Dry System / FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO Kansas City, MO, EUA) foi utilizado para desidratação das amostras. O sistema de cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos era constituído por uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-silica], 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinação da composição química do concentrado protéico do soro de leite

A composição química do concentrado protéico do soro de leite (WPC) foi determinada segundo os métodos descritos na AOAC (1995). O método de secagem em estufa ventilada, a 105 °C até peso constante, foi utilizado para determinação da umidade (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP); as cinzas por incineração, em mufla a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl e a lactose por determinação de glicídios redutores em lactose. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi de 6,38 (NIELSEN, 1998).

2.2.2. Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite

Foram preparados 18 hidrolisados enzimáticos, utilizando-se a subtilisina como enzima proteolítica. As suspensões contendo 10 % e 15 % (p/v) do concentrado protéico do soro do leite tiveram o pH ajustado para 7,0 com Na₂CO₃ a 3 mol/L, e foram colocadas em banho de óleo a 55 °C, sob agitação contínua. A enzima foi, então, adicionada em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada. Após 5 h, 10 h e 15 h de hidrólise, a reação foi interrompida por meio do aumento da temperatura para 80 °C por 20 min. Os hidrolisados obtidos foram liofilizados. As condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela I.1.

Tabela I.1 - Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Hidrolisados	Concentração da Matéria-prima (%, p/v)	E:S	Tempo de hidrólise (h)
S1	10	1:100	5
S2	10	2:100	5
S3	10	4:100	5
S4	10	1:100	10
S5	10	2:100	10
S6	10	4:100	10
S7	10	1:100	15
S8	10	2:100	15
S9	10	4:100	15
S10	15	1:100	5
S11	15	2:100	5
S12	15	4:100	5
S13	15	1:100	10
S14	15	2:100	10
S15	15	4:100	10
S16	15	1:100	15
S17	15	2:100	15
S18	15	4:100	15

E:S = relação enzima:substrato.

2.2.3. Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

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

fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min, o volume injetado foi de 20 µL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45 µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e desgaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di-tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE *et al.* (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite. Resumidamente neste método, foram preparados cinco hidrolisados padrão (dois com tripsina e três com pancreatina) os quais foram fracionados por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA. As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de Frações, modelo CF-1, Spectrum/Chrom, Houston, TX, EUA) sendo o solvente removido de cada fração em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MO, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas desenvolvidas por SILVESTRE *et al.* (1994b), após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva padrão, plotando-se ACF em função do teor de aminoácidos (SILVESTRE *et al.*, 1994b; MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; DE MARCO *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; DELVIVO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007;).

2.2.4. Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

Observa-se na Tabela I.2 que os teores obtidos para proteínas, cinzas totais e lactose estão próximos aos encontrados por outros autores. Além disso, o teor de umidade esta de acordo com a ficha técnica do produto que informa apenas sobre este valor (> 5 g%), porém é bem superior aos obtidos pelos outros autores.

Tabela I.2- Composição química do concentrado protéico do soro de leite

Componentes	¹ Valores obtidos (g %)	WPC 1 (g %)	WPC 2 (g %)	WPC 3 (g %)
Proteínas	35,8	---	34,5	38,6
Umidade	8,38	> 5	3,5	2,4
Lipídeos	0,05	---	3,5	2,8
Cinzas totais	5,30	---	6,4	6,5
Lactose	50,18	---	52,1	49,8

¹Valores encontrados após análise do concentrado protéico do soro de leite utilizado no experimento (KERRYLAC 750, Kerry do Brasil Ltda, MG, Brasil). WPC 1 - Valores disponibilizados na ficha técnica do produto KERRYLAC 750 da Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil); WPC 2 - Valores encontrados por SAMMEL & CLAUS, 2003 analisando o WPC Foremost 365 (Foremost Farms, Baraboo, WI, USA). WPC 3 – Valores encontrados por MORTENSON *et al.* (2007).

Por outro lado, a quantidade de lípidos aqui encontrada é muito menor do que a reportada na literatura. Estas diferenças devem estar relacionadas, principalmente, às variações da matéria-prima utilizada bem como aos processos industriais de obtenção do WPC.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

3.2.1. Perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4), conforme descrito, anteriormente, em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo (SILVESTRE *et al.*, 1994b, MORATO *et al.*, 2000, CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2006; BIASUTTI *et al.*, 2007). A fração F1 corresponde aos peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos, a fração F2 aos peptídeos médios contendo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos, a fração F3 contém os di-tripeptídeos e a fração F4 os aminoácidos livres. A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado S1, a 230 nm, está apresentado na Figura I.1.

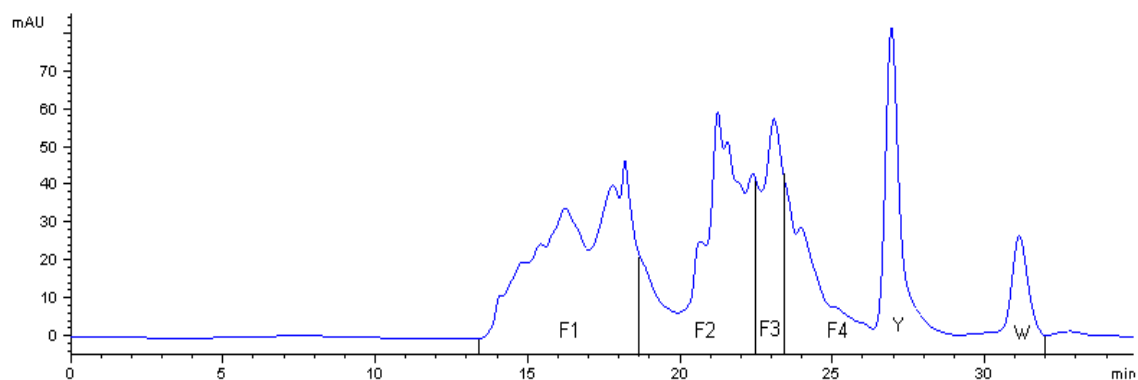


Figura I.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado S1 a 230 nm.

F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado S1: matéria-prima à 10 %; tempo de hidrólise = 5 h; relação E:S = 1:100.

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos com massas moleculares pequenas, ou seja, inferiores a 1000 Da. Estes resultados confirmam mais uma vez, os obtidos no mesmo laboratório do presente estudo, para o fracionamento e a quantificação de hidrolisados de proteínas utilizando o soro de leite (DE MARCO *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006; BIASUTTI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007) e outras fontes protéicas como

caseína (MORATO *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2004; CARREIRA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2005), leite (LOPES *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006) e arroz (BIZZOTTO *et al.*, 2006).

Na literatura, são encontradas diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) (SCHIMIDT & POLL, 1991; SCHIMIDT & MARKWIJK, 1993; GALLAGHER *et al.*, 1994), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (DEESLIE & CHERYAN 1991), HPLC capilar (DAVIS & LEE, 1992), HPLC de troca de iônica (AE-HPLC) (DIZDAROGLU, 1985) e HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) (LEMIEUX *et al.*, 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992).

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes. Assim, LEMIEUX *et al.* (1991), empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, e DAVIS & LEE (1992), empregando a HPLC capilar, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes.

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

Dois métodos cromatográficos (exclusão molecular em coluna Sephadex G25 e cromatografia líquida de alta velocidade com eletro spray acoplado ao espectrômetro de massa) foram empregados por LI-JUN *et al.* (2007) para avaliar a distribuição de tamanho molecular de peptídeos obtidos de soro de leite pela ação de uma protease alcalina (alcalase). Entretanto, estes métodos não foram capazes de fracionar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente os pequenos peptídeos. Segundo os autores, apenas a faixa de peso molecular foi evidenciada, indo de 600 a 1400 Da e de 300 a 1300 Da, para o primeiro e o segundo método, respectivamente.

SAINT-SAUVEUR *et al.* (2008) avaliaram as propriedades imunomoduladoras de peptídeos obtidos da hidrólise das proteínas isoladas do soro de leite com uso de

tripsina e quimotripsina. Entretanto, o método analítico utilizado por estes autores para caracterizar o perfil peptídico (fracionamento por Foco Isoelétrico em Fase Líquida e quantificação por Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular) separa os peptídeos obtidos nas seguintes frações; maiores que 10 kDa, entre 5 e 10 kDa, entre 2 e 5 kDa e menores que 2 kDa, não sendo eficiente para avaliação do conteúdo de di-tripeptídeos.

3.2.2. Teor de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados

Observa-se na Tabela I.3 que, para alguns hidrolisados, a distribuição de peptídeos foi semelhante, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os teores de peptídeos e de aminoácidos livres. Este é o caso observado quando se compara S2 com S4, S2 com S5; S7 com S8; S10, S11 e S14 entre si e S12, S15 e S18, entre si.

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

Desta maneira, conclui-se que o melhor perfil peptídico foi obtido para o hidrolisado S3, pois apresentou maior quantidade de di-tripeptídeos (13,34 %), um dos maiores teores de aminoácidos livres (45,56 %) e o menor de grandes peptídeos (12,28 %), quando comparado ao hidrolisado de WPC comercial o qual apresenta teores de grandes peptídeos de 39,01 %, di-tripeptídeos 5,90 % e aminoácidos livres 13,95 %.

Os resultados do presente trabalho foram comparados com os obtidos no mesmo laboratório, assim como com os de outros autores, para os quais a hidrólise das proteínas do leite ou do soro de leite foi realizada empregando-se uma subtilisina.

Em trabalho realizado, anteriormente, no mesmo laboratório, empregando-se a mesma enzima do presente estudo para hidrolisar o soro de leite em pó, o melhor perfil peptídico obtido foi inferior ao do S3, principalmente com relação aos teores de aminoácidos livres (35,29 %) e de grandes peptídeos (22,91 %). Além disso, a quantidade de di-tripeptídeos foi um pouco inferior (10,89 %) (BIASUTTI *et al* 2007).

Tabela I.3 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite obtidos pela ação da subtilisina

Hidrolisados	F1 (> 7)	F2 (4-6)	F3 (2-3)	F4 (AA Livres)
Comercial	39,01 ^{i/1}	41,16 ^{a/1}	5,90 ^{cdef/4}	13,95 ^{j/3}
S1	51,91 ^{b/1}	19,49 ^{hi/3}	6,51 ^{bcde/4}	22,08 ^{fgh/2}
S2	49,29 ^{cd/1}	21,18 ^{fgh/3}	6,18 ^{bcdef/4}	23,34 ^{ef/2}
S3	12,28 ^{i/3}	28,8 ^{b/2}	13,34 ^{a/3}	45,56 ^{a/1}
S4	47,43 ^{de/1}	23,10 ^{def/2}	5,19 ^{ef/3}	24,26 ^{de/2}
S5	49,63 ^{c/1}	22,67 ^{def/2}	4,14 ^{f/3}	23,54 ^{ef/2}
S6	29,70 ^{J/2}	16,73 ^{j/3}	8,15 ^{b/4}	45,40 ^{a/1}
S7	51,18 ^{bc/1}	18,78 ^{i/3}	5,06 ^{ef/4}	24,96 ^{cde/2}
S8	51,66 ^{bc/1}	18,00 ^{ij/3}	5,51 ^{def/4}	24,81 ^{cde/2}
S9	59,93 ^{a/1}	19,79 ^{ghi/2}	6,02 ^{bcdef/4}	14,24 ^{j/3}
S10	50,13 ^{bc/1}	21,99 ^{def/2}	7,89 ^{bc/4}	19,97 ^{i/3}
S11	48,28 ^{cde/1}	22,65 ^{def/2}	7,80 ^{bc/3}	21,25 ^{ghi/2}
S12	43,36 ^{gh/1}	23,92 ^{cde/2}	6,43 ^{bcde/3}	26,27 ^{cd/2}
S13	47,1 ^{ef/1}	14,33 ^{k/3}	5,80 ^{cdef/4}	29,75 ^{b/2}
S14	50,29 ^{bc/1}	21,77 ^{efg/2}	7,71 ^{bcd/3}	20,21 ^{hi/2}
S15	43,82 ^{gh/1}	23,34 ^{def/3}	6,82 ^{bcde/4}	26,00 ^{cd/2}
S16	44,50 ^{fg/1}	25,79 ^{c/2}	6,62 ^{bcde/4}	23,07 ^{efg/3}
S17	38,01 ^{i/1}	24,15 ^{cd/3}	6,6 ^{bcde/4}	31,22 ^{b/2}
S18	42,01 ^{h/1}	23,57 ^{de/3}	7,56 ^{bcd/4}	26,84 ^{c/2}

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

A ação da subtilisina (Carlsberg, P5380, Sigma) sobre o perfil peptídico de hidrolisados de outras proteínas lácteas foi, igualmente, estudada neste mesmo laboratório, utilizando-se a caseína como substrato protéico (MORATO *et al.*, 2000). Neste caso, o melhor perfil peptídico obtido foi superior ao do S3 em termos de di-tripeptídeos (23 %). Por outro lado, apresentou desvantagem em relação ao S3 quanto aos teores de aminoácidos livres (16 %) e de grandes peptídeos (29 %). Ressalta-se, ainda, que neste trabalho com a caseína, foi utilizada uma concentração de matéria-prima (0,125 %) cerca de 270 vezes menor que a empregada no presente estudo, o que elevaria em demasia os custos de adaptação para larga escala, relacionados à secagem do produto.

Outros autores (LOOSEN *et al.*, 1991) utilizaram a subtilisina Carlsberg, (P5380, Sigma) para hidrolisar a caseína e obtiveram de 75 a 85 % de di-tripeptídeos. Entretanto, este valor elevado foi encontrado após o emprego da ultrafiltração. Ainda, o método empregado por estes autores para avaliação do perfil peptídico (cromatografia de troca de ligante de alta performance sobre sílica recoberta com cobre) é inferior ao utilizado no presente trabalho, uma vez que dosa diretamente apenas os aminoácidos livres e os dipeptídeos não básicos, sendo os tripeptídeos determinados indiretamente.

3.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS

Considerando que não foram encontrados na literatura dados de outros autores abordando o efeito dos parâmetros na hidrólise do soro de leite, o trabalho de BIASUTTI *et al.* (2007), realizado no mesmo laboratório do presente estudo e utilizando a mesma subtilisina (Protemax N200) para hidrólise das proteínas do soro de leite em pó, foi a principal referência adotada para comparação de resultados com o presente trabalho.

Ainda, resultados da literatura abordando o efeito dos parâmetros hidrolíticos empregados na ação da subtilisina sobre a caseína foram, do mesmo modo, utilizados para comparação com os dados aqui obtidos, apesar de nestes estudos o efeito da concentração da matéria-prima não ter sido avaliada.

Para a análise de todos os parâmetros utilizados neste trabalho, levou-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação do mesmo a produção em larga escala. Assim, o aumento da concentração inicial da matéria-prima está associada à redução do volume de produto a ser desidratado e, conseqüentemente, tempo e investimento despendido no processo de secagem; a redução da relação E:S

está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária à hidrólise; a diminuição do tempo de reação está relacionada à redução do risco de contaminação bacteriana e menor probabilidade de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

3.3.1. Efeito da concentração da matéria-prima

Para analisar o efeito da concentração inicial do WPC sobre o perfil peptídico dos hidrolisados, devem ser comparadas as seguintes amostras: S1 com S10, S2 com S11, S3 com S12, S4 com S13, S5 com S14, S6 com S15, S7 com S16, S8 com S17 e S9 com S18, uma vez que os parâmetros tempo de hidrólise, relação E:S, pH e temperatura são mantidos constantes.

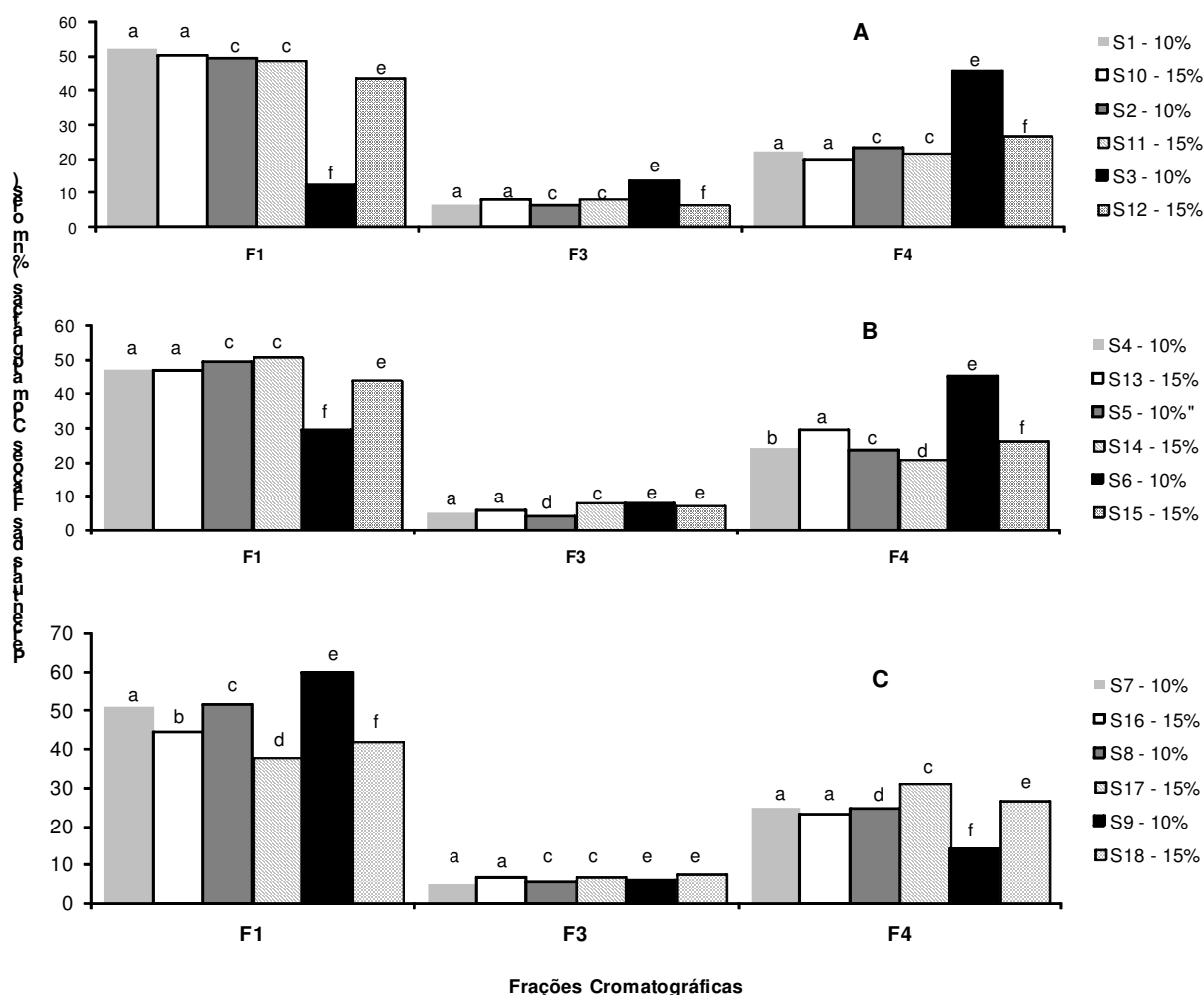


Figura I.2: Efeito da concentração da matéria-prima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. Concentrações utilizadas: 10% (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9) e 15% (S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

Em cada uma das partes A, B e C da Figura I.2, estão apresentados três destes grupos. Observa-se na figura I.2 que a vantagem de utilização de uma maior concentração de matéria-prima ocorreu em vários casos e relaciona-se com a obtenção de um maior teor de di-tripeptídeos (S5 - 10 % com S14 - 15 %) e de aminoácidos livres (S4 - 10 % com S13 - 15 %; S8 - 10 % com S17 - 15 %; S9 - 10 % com S18 - 15 %), além de menor teor de grandes peptídeos (S7 - 10 % com S16 - 15 %; S8 - 10 % com S17 - 15 %; S9 - 10 % com S18 - 15 %).

Em trabalho realizado anteriormente no mesmo laboratório utilizando-se a mesma subtilisina para hidrolisar o soro de leite em pó, também foi observado este mesmo efeito vantajoso da utilização de uma maior concentração de matéria-prima (10 % para 15 %), porém em um número menor de casos, especialmente no que se refere à obtenção de um maior teor de di-tripeptídeos (apenas 2 casos), maior teor de aminoácidos livres (dois casos) e menor teor de grandes peptídeos (dois casos).

3.3.2. Efeito da relação E:S

A influência da relação E:S no processo de hidrólise das proteínas do WPC pela subtilisina pode ser avaliada na Figura I.3. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (S1, S2 e S3); grupo 2 (S4, S5 e S6); grupo 3 (S7, S8 e S9); grupo 4 (S10, S11 e S12) grupo 5 (S13, S14 e S15) e grupo 6 (S16, S17 e S18). Em cada uma das partes A, B e C da Figura I.3, estão apresentados dois destes grupos.

Observa-se na figura I.3 que a utilização de uma menor relação E:S foi vantajosa para vários casos, uma vez que obteve-se menor teor de grandes peptídeos (S9 - 4:100 com S8 - 2:100; S9 - 4:100 com S7 - 1:100; S14 - 2:100 com S13 - 1:100 e S18 - 4:100 com S17 - 2:100) e maior teor de aminoácidos livres (S9 - 4:100 com S8 - 2:100; S9 - 4:100 com S7 - 1:100; S15 - 4:100 com S13 - 1:100; S14 - 2:100 com S13 - 1:100 e S18 - 4:100 com S17 - 2:100). Por outro lado, a utilização de uma menor relação E:S não afetou o teor de di-tripeptídeos na maioria dos casos ou observou-se um menor teor desta fração em quatro casos (S3 - 4:100 com S2 - 2:100; S3 - 4:100 com S1 - 1:100; S6 - 4:100 com S5 - 2:100 e S6 - 4:100 com S4 - 1:100).

A utilização de uma menor relação E:S nos trabalhos realizados por BIASUTTI *et al.* (2007), no mesmo laboratório do presente estudo, na hidrólise das proteínas do soro de leite em pó também demonstrou efeito benéfico, entretanto, em apenas um caso

relacionado à obtenção de um maior teor de di-tripeptídeos, um caso com maior teor de aminoácidos livres e em dois casos com menor teor de grandes peptídeos.

Ademais, MORATO *et al.* (2000), em estudo realizado anteriormente no mesmo laboratório, observaram que a utilização de uma menor relação E:S (4:100 para 2:100), na ação da subtilisina sobre a caseína, promoveu a obtenção de um maior teor de aminoácidos livres (4 % para 16 %), mas por outro lado, obteve-se maior teor de grandes peptídeos (14 % para 30 %).

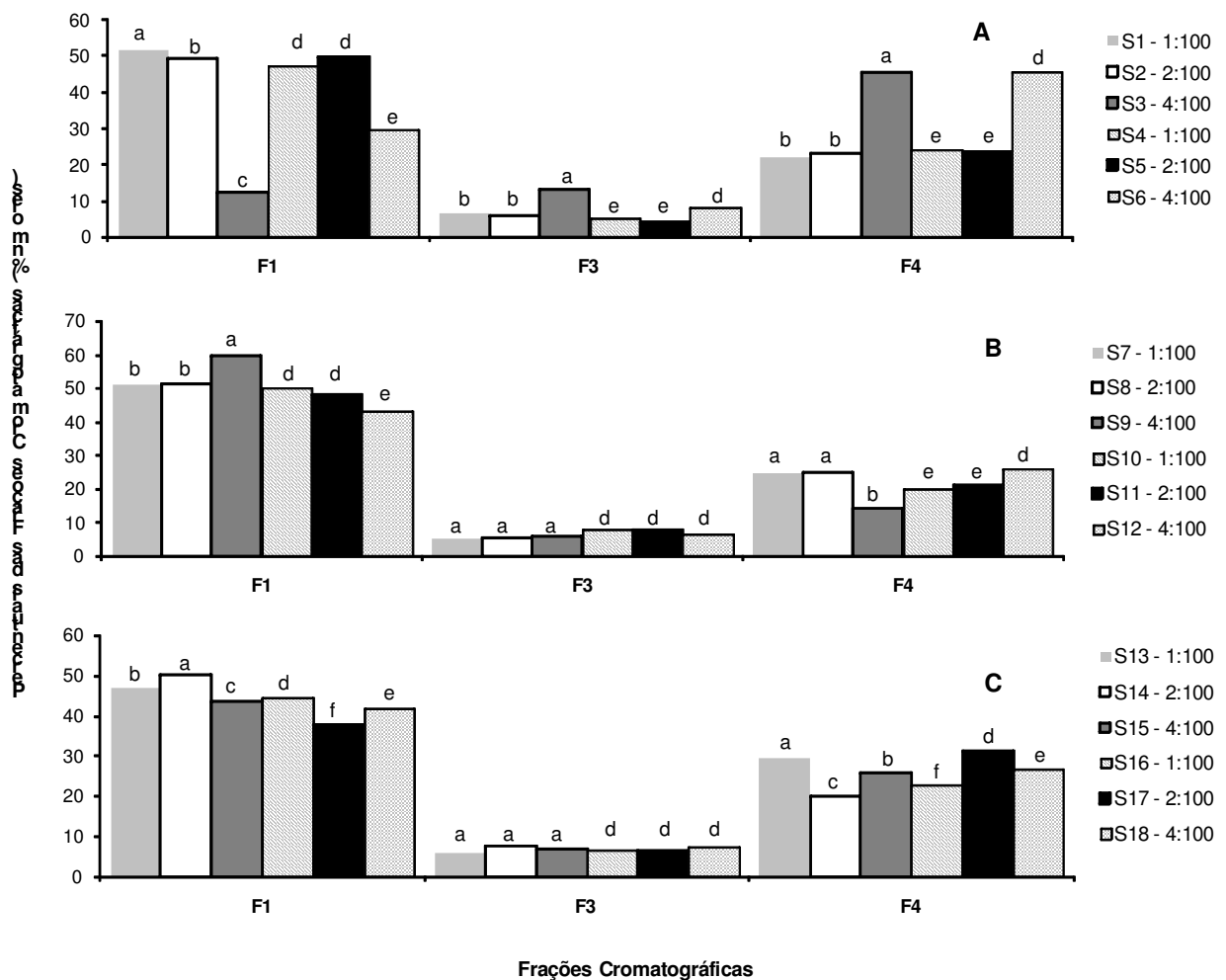


Figura I.3: Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. Relações E:S utilizadas: 1:100 (S1, S4, S7, S10, S13, S16), 2:100 (S2, S5, S8, S11, S14, S17) e 4:100 (S3, S6, S9, S12, S15, S18) F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

3.3.3. Efeito do tempo de hidrólise

A figura I.4 demonstra a influência do tempo de hidrólise da enzima proteolítica (subtilisina) sobre o concentrado protéico do soro de leite.

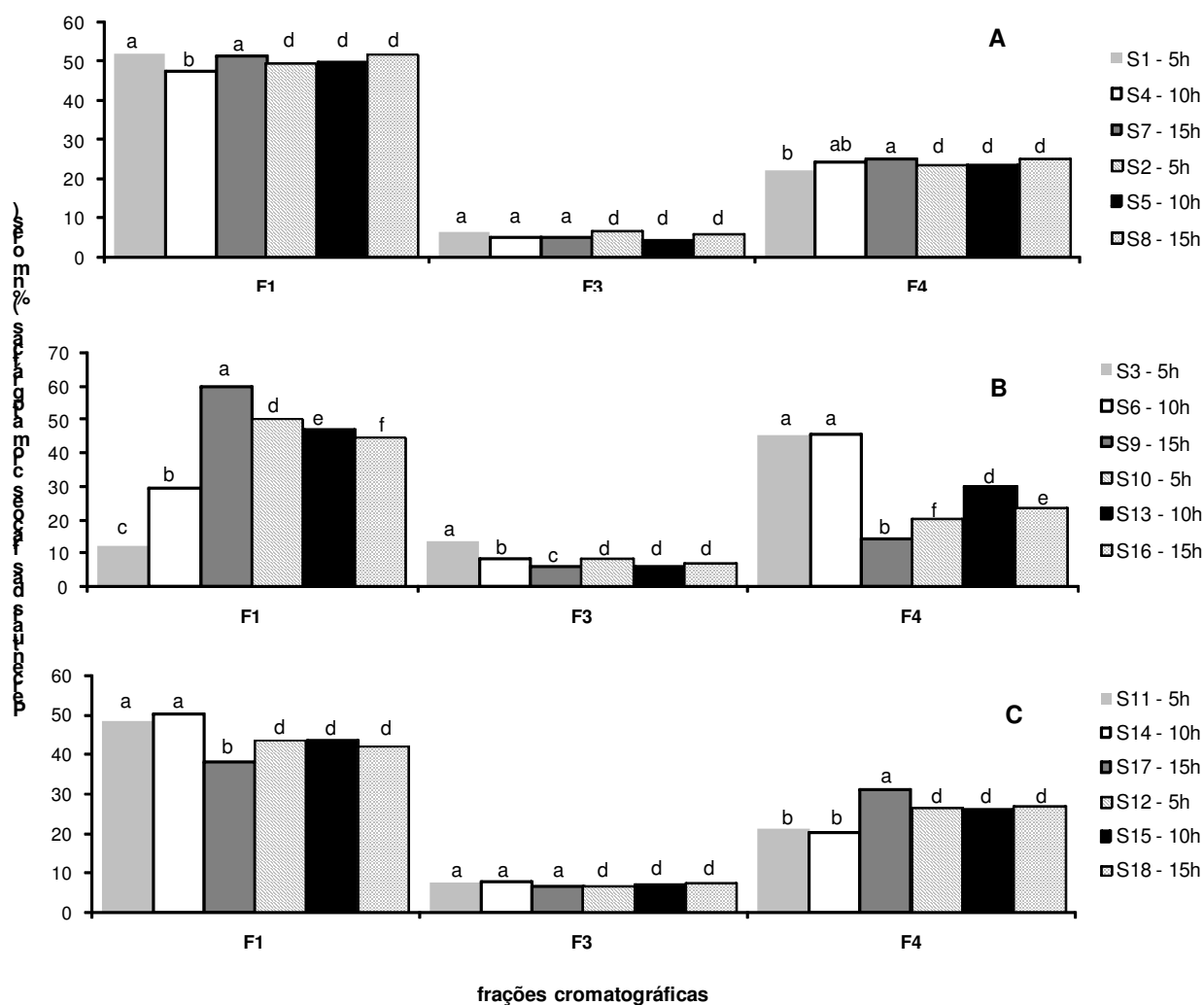


Figura I.4: Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. Tempos utilizados: 5h (S1, S2, S3, S10, S11, S12), 10h (S4, S5, S6, S13, S14, S15) e 15h (S7, S8, S9, S16, S17, S18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

No intuito de manter os demais parâmetros constantes e de maneira análoga ao processo comparativo realizado para estudar o efeito da relação E:S, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (S1, S4 e S7); grupo 2 (S2, S5 e S8); grupo 3 (S3, S6 e S9); grupo 4 (S10, S13 e S16) grupo 5 (S11, S14 e S17) e grupo 6 (S12, S15 e S18). E cada uma das partes A, B e C da Figuras I.4, estão apresentados dois destes grupos.

Verifica-se na figura I.4 que a utilização de um menor tempo de hidrólise foi vantajosa uma vez que, para vários casos obteve-se um menor teor de grandes peptídeos (S7 – 15 h com S4 - 10 h; S9 - 15 h com S6 - 10 h; S9 - 15 h com S3 - 5 h e S6 - 10 h com S3 – 5 h), um maior de di-tripeptídeos (S6 - 10 h com S3 - 5 h e S9 - 15 h com S3 - 5 h) e, em três casos, um maior teor de aminoácidos livres (S9 - 15 h com S6 - 10 h; S9 - 15 h com S3 - 5h e S16 - 15 h com S13 - 10 h).

No trabalho realizado por BIASUTTI *et al.* (2007) neste mesmo laboratório, foi observado que o efeito benéfico devido à utilização de um menor tempo de hidrólise para ação da subtilisina sobre as proteínas do soro de leite em pó ocorreu sempre em quatro casos, tanto para os relacionados à obtenção de um maior teor de di-tripeptídeos (10 h com 5 h e 15 h com 5 h; 15 h com 10 h e 15 h com 5 h), quanto para aqueles em que se obteve maior teor de aminoácidos livres (15 h com 5 h e 10 h com 5 h; 15 h com 10 h e 15 h com 5 h) e menor de grandes peptídeos (15 h com 5 h e 10 h com 5 h; 10 h com 5 h; 15 h com 5 h e 10 h com 5 h; 15 h com 10 h e 15 h com 5 h).

4. CONCLUSÃO

A utilização da subtilisina nas reações de hidrólise das proteínas do concentrado protéico do soro de leite mostrou-se eficiente, uma vez que permitiu a obtenção de hidrolisados protéicos ricos em di-tripeptídeos e aminoácidos livres. Considerando-se como preferenciais os resultados favoráveis à aplicação do processo desenvolvido à produção em larga escala, o efeito da alteração dos parâmetros hidrolíticos foi benéfico em vários hidrolisados analisados. O melhor perfil peptídico encontrado foi obtido pelo emprego de uma de concentração inicial de matéria-prima de 10 %, E:S de 4:100 e 5 h de hidrólise, caracterizado pelo elevado teor de di-tripeptídeos (13,34 %) e de aminoácidos livres (45,56 %), assim como pela pequena porcentagem de grandes peptídeos (12,28 %), quando comparado ao hidrolisado comercial.

CAPITULO II

OBTENÇÃO DE ELEVADO TEOR DE DI-TRIPLEPTÍDEOS POR HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE COM PANCREATINA

RESUMO

O efeito da utilização da pancreatina na hidrólise das proteínas do concentrado protéico do soro de leite foi avaliado por meio da caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados obtidos. Tendo como objetivos a elevação do teor de di-tripeptídeos e a redução de custos para produção em larga escala, diferentes condições hidrolíticas foram empregadas. Avaliaram-se o tempo de hidrólise (5, 10 e 15 h), a relação enzima:substrato (E:S) (1:100, 2:100 e 4:100) e a concentração da matéria-prima (10 e 15 %). Caracterizou-se o perfil peptídico pelo fracionamento dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração. Para os parâmetros estudados, observaram-se efeitos variados da pancreatina sobre o perfil peptídico dos hidrolisados sendo que, sob o ponto de vista nutricional, nove hidrolisados apresentaram resultados semelhantes, ou seja, baixos teores de grandes peptídeos (12,80 %, em média), assim como altos teores de di-tripeptídeos (12,11 %, em média) e de aminoácidos livres (49,06 %, em média).

Palavras-chave: hidrolisados protéicos, pancreatina, concentrado protéico do soro de leite, di-tripeptídeos, perfil peptídico.

ABSTRACT

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WHEY PROTEINS CONCENTRATE: USE OF PANCREATIN FOR OBTAINING HIGH DI-TRYPEPTIDE CONTENTS.

The effect of pancreatin on hydrolysis of whey protein concentrate was evaluated by the characterization of peptide profile. With the aim of obtaining high di-tripeptide content and reduction costs for scaling-up process, different hydrolytic conditions were tested. The effect of parameters such as hydrolysis time (5, 10 and 15 h), enzyme:substrate ratio (E:S) (1:100, 2:100 and 4:100) and raw matter concentration (MC) (10 % and 15 %) were tested. The peptide profiles were characterized firstly using a fractionation method by a size-exclusion-HPLC followed by a rapid Correct Fraction Area method for quantifying the peptides. The action of pancreatin produced different peptide profiles depending on the hydrolysis parameters used and the beneficial effect was observed in nine cases, and it was mainly associated with low large peptide content (12,80 %, in average) and high amount of di-tripeptides (12,11 %, in average) and free amino acids (49,06 %, in average).

Key words: Protein hydrolysates, pancreatin, whey protein concentrate, di-tripeptides, peptide profile.

1. INTRODUÇÃO

Desde 1940, os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Entretanto, na década de setenta esta utilização manifestou expressivo crescimento, que continuou ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CÂNDIDO, 1998). Os hidrolisados protéicos são produtos destinados, primeiramente, para uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional (CLEMENTE, 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000).

O processo hidrolítico contribui para a melhoria das propriedades físicas, químicas, funcionais, organolépticas e nutricionais das proteínas, atuando, particularmente, nas características de absorção protéica. Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente de di-tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando, assim, um maior valor nutritivo (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA *et al.*, 2000).

A qualidade e as características finais do hidrolisado protéico dependem de vários fatores, que devem ser controlados para se alcançar os resultados desejados, entre eles encontram-se a natureza e associação de enzimas, pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de matéria-prima, relação enzima:substrato e inativação enzimática ao final do processo (ADLER-NISSEN, 1981; CHOBERT *et al.*, 1988a,b; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b; CÂNDIDO, 1998). Ainda, o valor nutricional do produto dependerá, de 3 fatores essenciais: da proteína de origem, do modo de hidrólise e do tamanho dos peptídeos formados na hidrólise (ANANTHARAMAN & FINOT, 1993).

Para o presente trabalho, a enzima hidrolítica de escolha foi a pancreatina, um complexo enzimático constituído por enzimas secretadas pelo pâncreas as quais possuem atividades proteolíticas, amilolíticas e lipolíticas (PARK, 2001). Estas proteases pancreáticas são divididas em endopeptidases (tripsina, quimotripsina e elastase) e exopeptidases (carboxipeptidases A e B) (HINSBERGER & SANDHU, 2004).

O concentrado de proteínas do soro, WPC, produto originado da separação em membranas das proteínas do soro de leite, é a matéria-prima do presente trabalho e contém de 35 a 80 % de proteínas, enquanto o isolado protéico do soro, WPI, possui de 80 a 95 % de proteínas. Várias aplicações importantes estão associadas ao WPC, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos como cárneos, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; BRANS *et al.*, 2004).

As proteínas do soro do leite, principais componentes do WPC, têm sido apontadas como nutrientes portadoras de atividade funcional, capazes de modular algumas respostas fisiológicas do organismo animal (PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001; GAUTHIER & POULIOT, 2003; SGARBIERI, 2004; PACHECO *et al.*, 2006). Entretanto, a despeito das várias possibilidades de utilização do soro, as quais têm sido descobertas nos últimos 50 anos, aproximadamente metade da produção mundial de soro é descartada em efluentes sem qualquer tratamento. Desta forma, devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), associada, principalmente, à presença de lactose e proteínas, constitui-se num forte agente de poluição ambiental (SISO, 1996; CHERYAN, 1998).

A avaliação da qualidade dos hidrolisados protéicos envolve a determinação dos teores de peptídeos obtidos durante o processo hidrolítico. Desta forma, várias técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, mas estas apresentam inúmeros inconvenientes, tais como interações entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (LEMIEUX *et al.*, 1991; SCHIMIDT & POLL, 1991; DAVIS & LEE, 1992; GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992).

Neste sentido, SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método eficiente para fracionamento e quantificação dos peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, sendo este método empregado no presente estudo.

Este trabalho teve como objetivo otimizar as condições hidrolíticas para ação da pancreatina, a fim de obter hidrolisados de WPC com elevado teor de di-tripeptídeos e aminoácidos livres, além de baixos teores de grandes peptídeos, reduzindo, ainda, os custos para adaptação à produção em escala industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

O concentrado protéico do soro de leite em pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A enzima pancreatina (Corolase PP), fornecida pela AB Enzymes® (Barueri, SP, Brasil), é uma enzima mista, de origem animal (pâncreas suíno), atividade 2000.000 LVE/g, estável em pH neutro ou ligeiramente alcalino, pH ótimo entre 7 e 9 com temperatura ótima entre 35-50 °C.

Um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A) com temperatura controlada e agitação constante foi utilizado para homogeneizar a mistura. Um liofilizador (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, MO, EUA) foi usado para desidratar as amostras. O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos era constituído por uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica], 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP 1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, USA).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinação da composição química do concentrado protéico do soro de leite

A composição química do concentrado protéico do soro de leite (WPC) 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, por incineração, em mufla a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl e a lactose por determinação de glicídios redutores em lactose. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38 (NIELSEN, 1998).

2.2.2. Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite

Foram preparados 18 hidrolisados enzimáticos utilizando-se a pancreatina. As soluções a 10 % e 15 % (p/v) de concentrado protéico do soro de leite tiveram seu pH ajustado para 7,0 com Na_2CO_3 a 3 mol/L e foram colocadas em banho de óleo a 50 °C, sob agitação contínua.

Tabela II.1 – Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo de hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Hidrolisados	Concentração da Matéria-prima (p/v)	E:S	Tempo de hidrólise (h)
P1	10	1:100	5
P2	10	2:100	5
P3	10	4:100	5
P4	10	1:100	10
P5	10	2:100	10
P6	10	4:100	10
P7	10	1:100	15
P8	10	2:100	15
P9	10	4:100	15
P10	15	1:100	5
P11	15	2:100	5
P12	15	4:100	5
P13	15	1:100	10
P14	15	2:100	10
P15	15	4:100	10
P16	15	1:100	15
P17	15	2:100	15
P18	15	4:100	15

E:S = relação enzima substrato

A enzima foi, então, adicionada em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada. Após 5, 10 e 15 h de hidrólise, a reação foi interrompida por meio do aumento da temperatura para 85 °C por 20 min. Os

hidrolisados obtidos foram liofilizados. Algumas condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela II.1.

2.2.3. Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Esta caracterização foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação.

O fracionamento dos peptídeos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE *et al.* (1994a). As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1 g % (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/ min, durante 35 min, sendo que o volume injetado foi de 20 µL. A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45 µm, e degaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1 de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2 de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3 de 19,5 a 20,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE *et al.* (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite. Neste método, resumidamente, foram preparados cinco hidrolisados padrão (dois com tripsina e três com pancreatina) que foram fracionados por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA. As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de Frações, modelo CF-1, Spectrum/Chrom, Houston, TX, EUA) sendo que o solvente foi removido, de cada fração, em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MI, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas desenvolvidas por SILVESTRE *et al.* (1994b), após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva padrão, plotando-se ACF em função do teor de aminoácidos (SILVESTRE *et al.*, 1994b; MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006; DE MARCO *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

2.2.4. Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

Observa-se na Tabela II.2 que os teores obtidos para proteínas, cinzas totais e lactose estão próximos aos encontrados por outros autores.

Tabela II.2- Composição química do concentrado protéico do soro de leite

Componentes	¹ Valores obtidos (g %)	WPC 1 (g %)	WPC 2 (g %)	WPC 3 (g %)
Proteínas	35,8	---	34,5	38,6
Umidade	8,38	> 5	3,5	2,4
Lipídeos	0,05	---	3,5	2,8
Cinzas totais	5,30	---	6,4	6,5
Lactose	50,18	---	52,1	49,8

¹Valores encontrados após análise do concentrado protéico do soro de leite utilizado no experimento (KERRYLAC 750, Kerry do Brasil Ltda, MG, Brasil). WPC 1 - Valores disponibilizados na ficha técnica do produto KERRYLAC 750 da Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil); WPC 2 - Valores encontrados por SAMMEL & CLAUS, 2003 analisando o WPC Foremost 365 (Foremost Farms, Baraboo, WI, USA). WPC 3 – Valores encontrados por MORTENSON *et al.* (2007).

Além disso, o teor de umidade está de acordo com a ficha técnica do produto que informa apenas sobre este valor (> 5 g%), porém é bem superior aos obtidos pelos outros autores. Por outro lado, a quantidade de lípidos aqui encontrada é muito menor do que a reportada na literatura. Estas diferenças devem estar relacionadas, principalmente, às variações da matéria-prima utilizada bem como aos processos industriais de obtenção do WPC.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

3.2.1. Perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo, conforme descrito anteriormente, os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4) (SILVESTRE *et al.*, 1994a, MORATO *et al.*, 2000, CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006; DE MARCO *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007). A fração F1 corresponde aos peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos, a fração F2 aos peptídeos médios contendo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos, a fração F3 contém os di- e tripeptídeos e a fração F4 os aminoácidos livres. A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado P1, a 230 nm, está apresentado na Figura II.1.

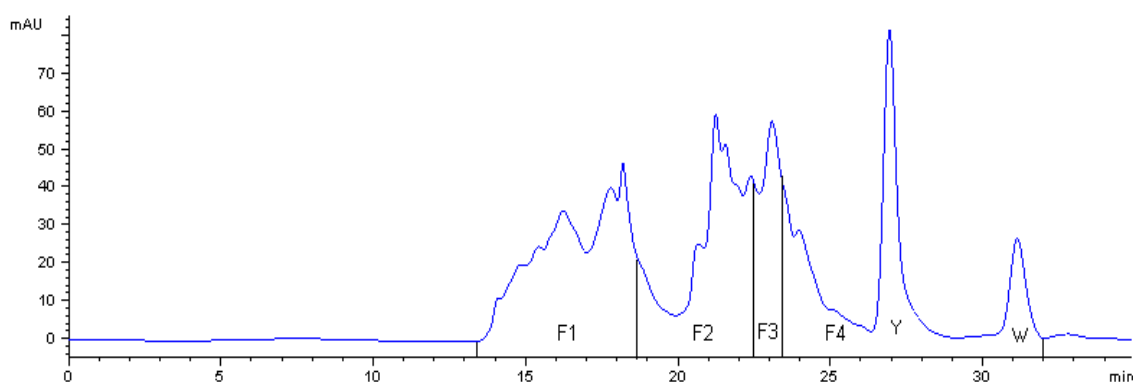


Figura II.1: Perfil cromatográfico do hidrolisado P1 a 230 nm.

F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado P1= matéria-prima a 10%; tempo de hidrólise = 5h; relação E:S = 1%.

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente para caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos com massas moleculares pequenas, ou seja, inferiores a 1000 Da. Estas observações confirmam, mais uma vez, os resultados obtidos no mesmo laboratório do presente estudo, para o fracionamento e a quantificação de hidrolisados de proteínas utilizando o soro de leite (DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007; DELVIVO *et al.*, 2006; BIASUTTI *et al.*, 2007) e outras fontes protéicas como caseína (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2004), leite (LOPES *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006) e arroz (BIZZOTTO *et al.*, 2006).

A avaliação das publicações disponíveis na literatura científica mostra diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) (SCHIMIDT & POLL, 1991; SCHIMIDT & MARKWIJK, 1993; GALLAGHER *et al.*, 1994), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (DEESLIE & CHERYAN 1991), HPLC capilar (DAVIS & LEE, 1992), HPLC de troca de iônica (AE-HPLC) (DIZDAROGLU, 1985) e HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) (LEMIEUX *et al.*, 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992).

Contudo, ao contrário da técnica aqui utilizada, a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes. Assim, LEMIEUX *et al.* (1991), empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, e DAVIS & LEE (1992), empregando a HPLC capilar, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes.

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

Dois métodos cromatográficos (exclusão molecular em coluna Sephadex G25 e cromatografia líquida de alta velocidade com eletro spray acoplado ao espectrômetro de massa) foram empregados por LI-JUN *et al.*, (2007) para avaliar a distribuição de

tamanho molecular de peptídeos obtidos de soro de leite pela ação de uma protease alcalina (alcalase). Entretanto, estes métodos não foram capazes de fracionar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente os pequenos peptídeos. Segundo os autores, apenas a faixa de peso molecular foi evidenciada, indo de 600 a 1400 Da e de 300 a 1300 Da, para o primeiro e o segundo método, respectivamente.

SAINT-SAUVEUR *et al.*, (2008) avaliaram as propriedades imunomoduladoras de peptídeos obtidos da hidrólise das proteínas isoladas do soro de leite com uso de tripsina e quimotripsina. Entretanto, o método analítico utilizado por estes autores para caracterizar o perfil peptídico (fracionamento por Foco Isoelétrico em Fase Líquida e quantificação por Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular) separa os peptídeos obtidos nas seguintes frações; maiores que 10 kDa, entre 5 e 10 kDa, entre 2 e 5 kDa e menores que 2 kDa, não sendo eficiente para avaliação do conteúdo de di-tripeptídeos.

3.2.2. Teores de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados

Na Tabela II.3, observa-se que não houve diferença no perfil peptídico de alguns hidrolisados uma vez que os valores obtidos para todas as frações foram estatisticamente iguais. Este é o resultado obtido quando se compara P2 com P11; P4 com P6 e com P12; P17 com P18.

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

Tabela II.3 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da pancreatina

Hidrolisados	F1 (> 7)	F2 (4-6)	F3 (2-3)	F4 (AA Livres)
Comercial	39,01 ^{f/1}	41,16 ^{a/1}	5,90 ^{def/4}	13,95 ^{k/3}
P1	18,02 ^{i/3}	29,06 ^{b/2}	8,16 ^{c/4}	44,75 ^{ef/1}
P2	14,55 ^{jkL/3}	29,38 ^{b/2}	12,13 ^{ab/4}	43,92 ^{f/1}
P3	45,37 ^{e/1}	21,79 ^{e/3}	6,34 ^{cde/4}	26,48 ^{h/2}
P4	13,13 ^{kLm/3}	28,23 ^{b/2}	12,12 ^{ab/3}	46,5 ^{cde/1}
P5	12,64 ^{Lmn/3}	16,96 ^{f/2}	11,36 ^{b/3}	59,02 ^{a/1}
P6	11,29 ^{mn/4}	29,46 ^{b/2}	13,71 ^{a/3}	45,52 ^{def/1}
P7	71,41 ^{a/1}	19,03 ^{f/2}	3,35 ^{g/4}	6,19 ^{L/3}
P8	59,77 ^{c/1}	17,46 ^{f/2}	4,45 ^{efg/4}	18,3 ^{J/2}
P9	51,93 ^{d/1}	18,02 ^{f/3}	4,45 ^{efg/4}	25,58 ^{hi/2}
P10	68,67 ^{b/1}	17,13 ^{f/2}	3,88 ^{fg/4}	10,3 ^{k/3}
P11	16,34 ^{ij/3}	27,96 ^{b/2}	11,61 ^{ab/4}	44,07 ^{f/1}
P12	12,34 ^{mn/3}	27,37 ^{bc/2}	13,00 ^{ab/3}	47,26 ^{cd/1}
P13	45,98 ^{e/1}	24,29 ^{d/2}	5,61 ^{def/4}	24,1 ^{i/2}
P14	20,92 ^{h/3}	27,29 ^{bc/2}	7,12 ^{cd/4}	44,64 ^{ef/1}
P15	15,01 ^{jk/3}	25,64 ^{cd/2}	11,04 ^{b/4}	48,29 ^{c/1}
P16	27,08 ^{g/2}	29,01 ^{b/2}	6,79 ^{cd/4}	37,1 ^{g/1}
P17	10,71 ^{no/3}	24,66 ^{d/2}	11,99 ^{ab/3}	52,62 ^{b/1}
P18	9,22 ^{o/4}	24,38 ^{d/2}	12,05 ^{ab/3}	54,33 ^{b/1}

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

Assim, conclui-se que, do ponto de vista nutricional, nove hidrolisados apresentaram os melhores perfis peptídicos (P2, P4, P5, P6, P11, P12, P15 P17 e P18), com baixos teores de grandes peptídeos (12,80 %, em média), assim como altos teores de di-tripeptídeos (12,11 %, em média) e de aminoácidos livres (49,06 % em média), quando comparados ao hidrolisado de WPC comercial o qual apresenta teores de grandes peptídeos de 39,01 %, di-tripeptídeos 5,90 % e aminoácidos livres 13,95 %.

Uma vez que não foram encontrados na literatura dados de outros autores utilizando a pancreatina para a hidrólise das proteínas do leite ou soro de leite, os resultados do presente trabalho foram comparados somente com os obtidos no mesmo laboratório.

Assim, BIASUTTI *et al.* (2007), utilizando a mesma pancreatina para hidrolisar as proteínas do soro de leite em pó, apesar de terem encontrado um teor de di-tripeptídeos semelhante (12,42 %), o conteúdo de aminoácidos livres foi muito inferior (22,02 %) e o de grandes peptídeos muito maior (28,93 %) que o obtido.

DELVIVO *et al.* (2006), após a ação de outra pancreatina (Sigma, P-1500), passaram os hidrolisados do soro de leite através de uma coluna de carvão ativado e por uma membrana de ultrafiltração (UF) (corte 10000 Da) caracterizando, posteriormente, o perfil peptídico do produto. Os resultados obtidos foram mais vantajosos que os do presente trabalho apenas com relação aos teores de di-tripeptídeos (21,00 %). Entretanto, foram inferiores por apresentar maiores teores de grandes peptídeos (16,00 %) e menores de aminoácidos livres (23,00 %). A maior concentração de di-tripeptídeos pode ser explicada pela utilização da ultrafiltração, a qual concentra o produto na frações de menor peso molecular. Observa-se, ainda, que outro inconveniente deste estudo refere-se à concentração de matéria-prima utilizada, a qual foi cerca de 10 vezes menor (1,06 %) do que a empregada no presente trabalho, o que elevaria em demasia os custos do processo em larga escala.

SILVA *et al.* (2007) avaliaram o efeito da imobilização da pancreatina em carvão ativado sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. O melhor resultado se mostrou inferior aos do presente trabalho com relação ao elevado teor de grandes peptídeos (58,00 %) e baixo teor de aminoácidos livres (2,00 %). Tal como no estudo citado acima, a única vantagem em relação ao presente trabalho, refere-se ao teor de di-tripeptídeos (15,00 %), um pouco superior ao aqui encontrado.

3.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS

Os resultados aqui obtidos serão comparados apenas com os obtidos no mesmo laboratório para a ação da pancreatina sobre o perfil peptídico das proteínas do concentrado protéico do soro de leite, já que não foram encontrados na literatura dados de outros autores.

Para a análise de todos os parâmetros utilizados neste trabalho, levou-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação do mesmo a produção em larga escala. Assim, o aumento da concentração inicial da matéria-prima está associado à redução do volume de produto a ser desidratado e, conseqüentemente, tempo e investimento despendido no processo de secagem; a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária à hidrólise; a diminuição do tempo de reação está relacionada à redução do risco de contaminação bacteriana e menor probabilidade de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

3.3.1. Efeito da concentração da matéria-prima

Para analisar o efeito da concentração inicial do WPC sobre o perfil peptídico dos hidrolisados, devem ser comparadas as seguintes amostras: P1 com P10, P2 com P11, P3 com P12, P4 com P13, P5 com P14, P6 com P15, P7 com P16, P8 com P17 e P9 com P18, uma vez que os parâmetros tempo de hidrólise, relação E:S, pH e temperatura são mantidos constantes. Em cada uma das partes A, B e C da Figura II.2, estão apresentados três destes grupos.

A observação da figura II.2 mostra que a vantagem de utilização de uma maior concentração de WPC ocorreu em vários casos e relaciona-se com a obtenção de teores mais elevados de di-tripeptídeos (P3 - 10 % com P12 - 15 %; P7 - 10 % com P16 - 15 %, P8 - 10 % com P17 - 15 %, P9 - 10 % com P18 - 15 %), e de aminoácidos livres (P3 - 10 % com P12 - 15 %, P6 - 10 % com P15 - 15 %, P7 - 10 % com P16 - 15 %, P8 - 10 % com P17 - 15 %, P9 - 10 % com P18 - 15 %), além de menores teores de grandes peptídeos (P3 - 10 % com P12 - 15 %; P7 - 10 % com P16 - 15 %, P8 - 10 % com P17 - 15 %, P9 - 10 % com P18 - 15 %).

Em trabalho realizado anteriormente no mesmo laboratório, BIASUTTI *et al.* (2007) utilizando a mesma pancreatina para hidrolisar as proteínas do soro de leite em pó, também observaram este mesmo efeito vantajoso da utilização de uma maior concentração do soro de leite em pó, especialmente no que se refere ao maior teor de aminoácidos livres (três casos) e menor de grandes peptídeos (três casos), obtidos para uma concentração de 15 % em relação à de 10 %. Entretanto, obteve-se um maior teor de di-tripeptídeos em apenas um caso, ao se utilizar estes dois valores de concentração de matéria-prima.

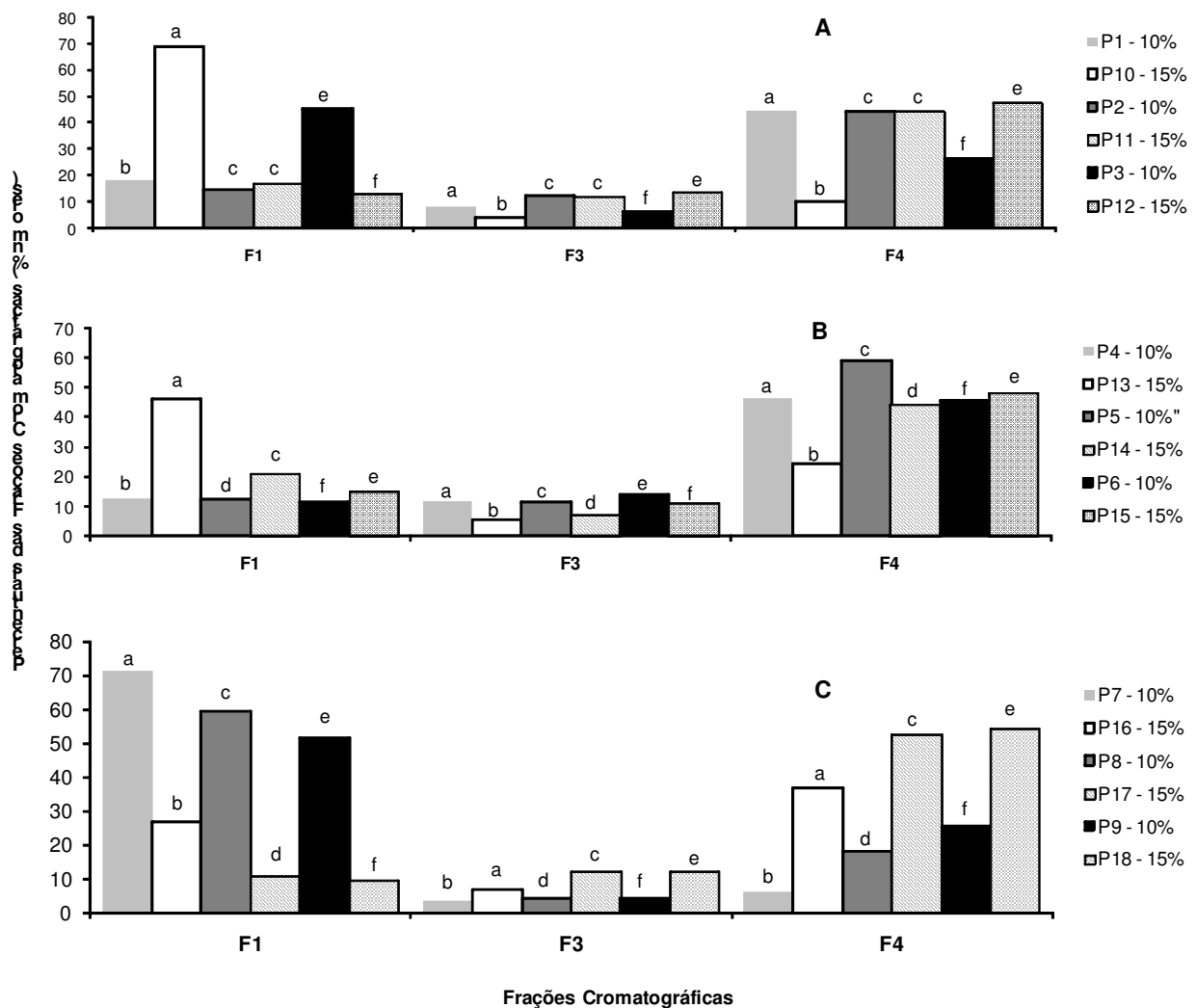


Figura II.2: Efeito da concentração de matéria-prima sobre o perfil peptídico de hidrolisados do WPC. Concentrações utilizadas: 10% (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9) e 15% (P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

3.3.2. Efeito da relação E:S

A influência da relação E:S no processo de hidrólise das proteínas do WPC pela pancreatina pode ser avaliada na Figura II.3. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (P1, P2 e P3); grupo 2 (P4, P5 e P6); grupo 3 (P7, P8 e P9); grupo 4 (P10, P11 e P12) grupo 5 (P13, P14 e P15) e grupo 6 (P16, P17 e P18). Em cada uma das partes A, B e C da Figura II.3, estão apresentados dois destes grupos.

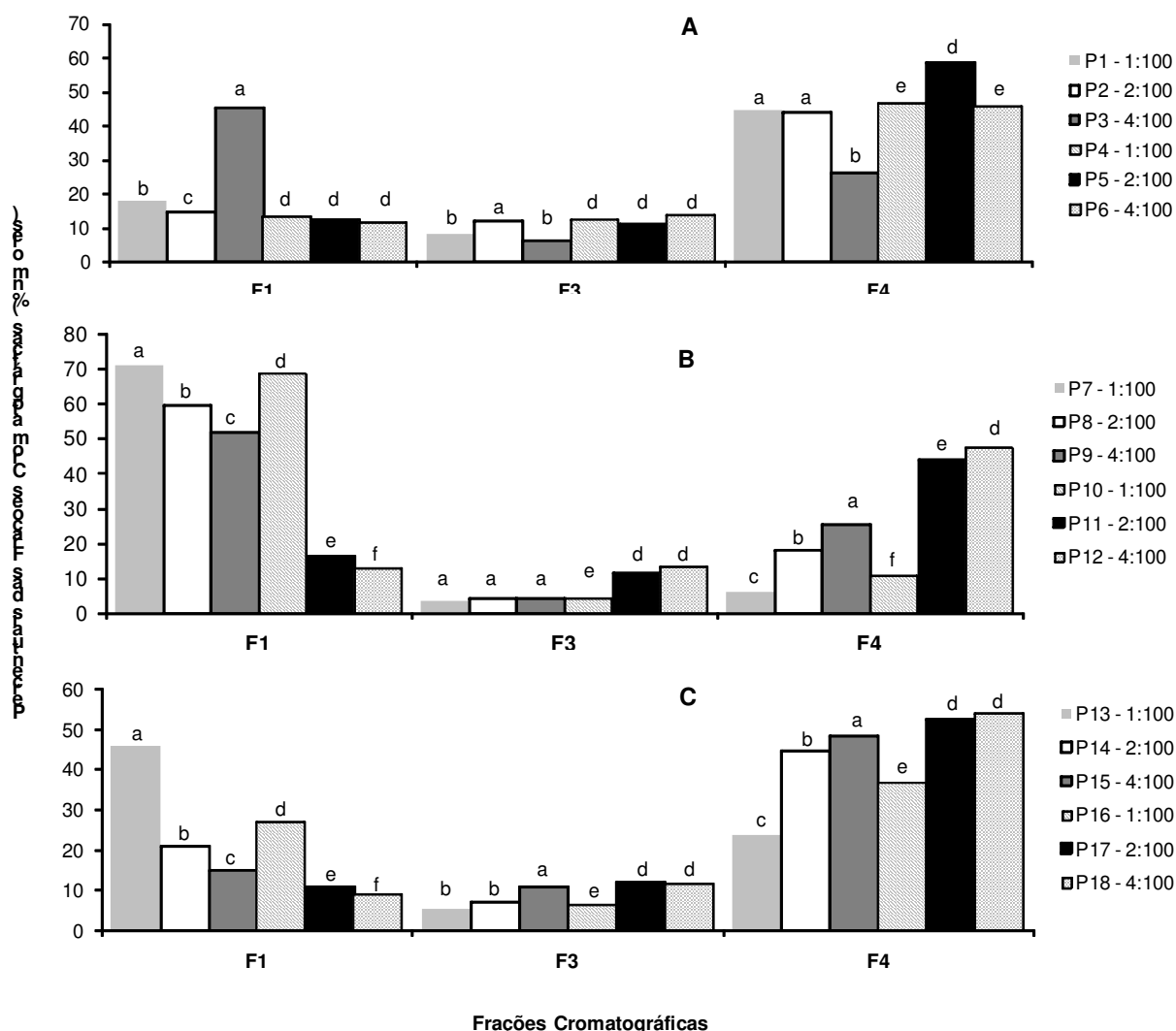


Figura II.3: Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados do WPC. Relações E:S utilizadas: 1:100 (P1, P4, P7, P10, P13, P16), 2:100 (P2, P5, P8, P11, P14, P17) e 4:100 (P3, P6, P9, P12, P15, P18) F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

A análise da figura II.3 revela que a utilização de uma menor relação E:S foi vantajosa para alguns casos, uma vez que verifica-se a obtenção de um menor teor de grandes peptídeos (P3 - 4:100 com P2 - 2:100 e P3 - 4:100 com P1 - 1:100), além de maior teor de aminoácidos livres (P3 - 4:100 com P2 - 2:100; P3 - 4:100 com P1 - 1:100; P6 - 4:100 com P5 - 2:100) e de di-tripeptídeos (P3 - 4:100 com P2 - 2:100).

O trabalho realizado por BIASUTTI *et al.* (2007), no mesmo laboratório do presente estudo, avaliando-se o emprego de três valores para a relação E:S (4:100, 2:100 e 1:100) na hidrólise das proteínas do soro de leite em pó, também demonstraram efeito benéfico, uma vez que obteve-se maior teor de aminoácidos livres em seis casos e menor de grandes peptídeos, também em seis casos. Entretanto, observou-se um maior teor de di-tripeptídeos em apenas um caso ao se utilizar estes três valores de relação E:S.

Outros dois estudos empregando-se uma outra pancreatina (Sigma, P-1500) para hidrólise das proteínas do soro de leite foram realizados no mesmo laboratório do presente trabalho. Contudo, o efeito da utilização de uma menor E:S sobre o perfil peptídico foi avaliado após a passagem dos hidrolisados em coluna de carvão ativado para remoção de fenilalanina. Desta forma, SILVA *et al.* (2007) empregando a pancreatina imobilizada em carvão ativado, observaram que a utilização de uma relação E:S 100 vezes menor (de 1:100 comparado com 0,01:100) foi relativamente benéfica para o perfil peptídico, uma vez que observou-se um teor maior de di-tripeptídeos (de 7,0 % para 15,0 %) mas, por outro lado, obteve-se um menor conteúdo de aminoácidos livres (de 53,0 % para 2,0 %). DELVIVO *et al.* (2006), utilizaram a pancreatina para hidrolisar as proteínas do soro de leite em solução, mas não verificaram qualquer efeito sobre o perfil peptídico relacionado à utilização de uma menor relação E:S (de 0,1:100 para 0,01:100).

3.3.3. Efeito do tempo de hidrólise

A influência do tempo de ação da pancreatina sobre o perfil peptídico do hidrolisado de WPC pode ser avaliada na Figura II.4. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes e, de maneira análoga ao processo comparativo realizado para estudar o efeito da relação E:S, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (P1, P4 e P7); grupo 2 (P2, P5 e P8); grupo 3 (P3, P6 e P9); grupo 4 (P10, P13 e P16); grupo 5 (P11, P14 e P17);

e grupo 6 (P12, P15 e P18). Em cada uma das partes A, B e C da Figuras II.4, estão apresentados dois destes grupos.

A análise da figura II.4 mostra que a utilização de um menor do tempo de hidrólise foi vantajosa, uma vez que para vários casos obteve-se menor teor de grandes peptídeos (P7 – 15 h com P4 - 10 h e P7 – 15 h com P1 - 5 h; P8 – 15 h com P5 - 10 h; P8 – 15 h com P2 - 5 h; P9 – 15 h com P6 - 10 h; P9 – 15 h com P3 – 5 h; P14 – 10 h com P11 – 5 h; P15 – 10 h com P12 – 5 h), maior de di-tripeptídeos (P7 – 15 h com P4 - 10 h; P7 – 15 h com P1 - 5 h; P8 – 15 h com P5 - 10 h; P8 – 15 h com P2 - 5 h; P9 – 15 h com P6 - 10 h; P14 – 10 h com P11 – 5 h) e de aminoácidos livres (P7 – 15 h com P4 - 10 h; P7 – 15 h com P1 - 5 h; P8 – 15 h com P5 - 10 h; P8 – 15 h com P2 - 5 h; P9 – 15 h com P6 - 10 h).

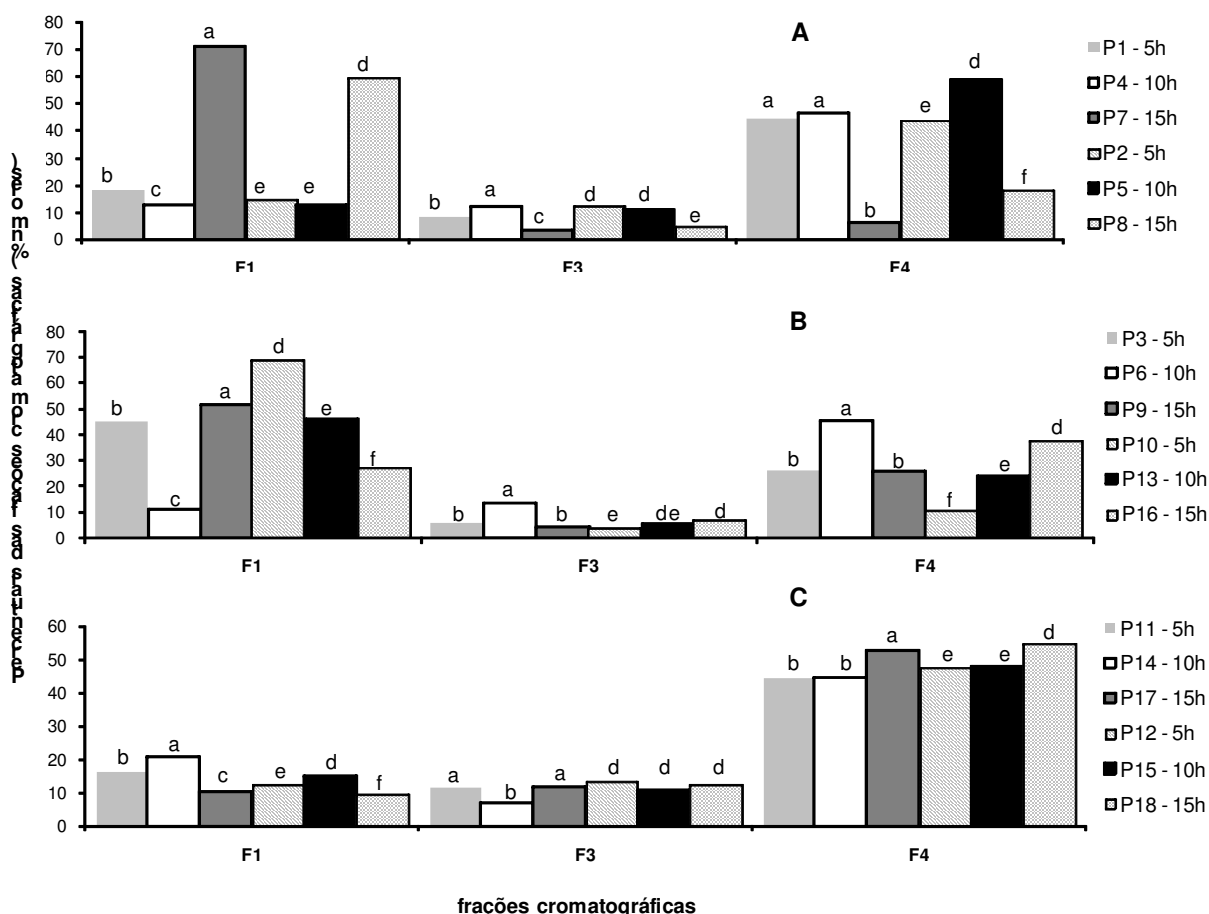


Figura II.4: Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico do WPC. Tempos utilizados: 5h (P1, P2, P3, P10, P11, P12), 10h (P4, P5, P6, P13, P14, P15) e 15h (P7, P8, P9, P16, P17, P18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

BIASUTTI *et al.* (2007), neste mesmo laboratório, também observaram efeito benéfico devido à utilização de um menor tempo de hidrólise (15, 10 e 5 h) para ação da pancreatina sobre as proteínas do soro de leite em pó. Assim, obteve-se maior teor de di-tripeptídeos em quatro casos e de aminoácidos livres em seis casos, assim como menor conteúdo de grande peptídeos em cinco testes.

4. CONCLUSÃO

A utilização da pancreatina na hidrólise das proteínas do WPC mostrou-se bastante eficiente, uma vez que permitiu a obtenção de hidrolisados protéicos ricos em di-tripeptídeos e aminoácidos livres, sob condições favoráveis à produção em larga escala. Analisando sob o ponto de vista nutricional, nove hidrolisados apresentaram os melhores perfis peptídicos com baixos teores de grandes peptídeos (12,80 %, em média) e altos de di-tripeptídeos (12,11 %, em média) e de aminoácidos livres (49,06 %, em média), quando comparados ao hidrolisado de WPC comercial o qual apresenta teores de grandes peptídeos de 39,01 %, di-tripeptídeos 5,90 % e aminoácidos livres 13,95 %.

CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS

As condições hidrolíticas testadas neste estudo, tanto para a subtilisina quanto para a pancreatina, foram eficientes na obtenção de hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite ricos em di-tripeptídeos e aminoácidos livres e com baixo teor de grandes peptídeos.

Dentre os parâmetros testados, o efeito benéfico do aumento da concentração da matéria-prima e das reduções da relação E:S e do tempo de reação, levando a um maior teor de di-tripeptídeos e aminoácidos livres e menor teor de grandes peptídeos, foi observado em vários casos. Além disso, a seleção do melhor hidrolisado levou em consideração a redução de custos do processo para adaptação à produção em escala industrial. Neste sentido, é importante ressaltar que o aumento da concentração da matéria-prima está associado à redução da quantidade de água e, conseqüentemente, do tempo gasto no processo de secagem; a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise; a redução do

tempo de hidrólise está relacionada à diminuição de contaminação bacteriana, à redução de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

Desta forma, quando comparados ao hidrolisado de WPC comercial o qual apresenta teores de grandes peptídeos de 39,01 %, di-tripeptídeos 5,90 % e aminoácidos livres 13,95 %, o melhor perfil peptídico obtido pela ação da subtilisina foi encontrado para um hidrolisado ao se empregar uma concentração de matéria-prima de 10 %, relação enzima:substrato de 4:100, após 5 h de reação, tendo obtido 13,34 % de di-tripeptídeos, 45,56 % de aminoácidos livres e, apenas, 12,28 % de grades peptídeos. Para a pancreatina, nove hidrolisados apresentaram resultados semelhantes do ponto de vista nutricional ou seja, baixos teores de grandes peptídeos (12,80 %, em média), assim como altos teores de di-tripeptídeos (12,11 %, em média) e de aminoácidos livres (49,06 %, em média).

Os melhores resultados dos hidrolisados obtidos pela ação da subtilisina e da pancreatina foram comparados. Observa-se que os teores de di-tripeptídeos originados da ação das duas enzimas (13,34 % para subtilisina e 12,11 %, em média, para a pancreatina) são estatisticamente iguais e os teores de aminoácidos livres (45,56 % para subtilisina e 49,06 %, em média, para a pancreatina) e de grandes peptídeos (12,28 % para subtilisina e 12,80 %, em média, para a pancreatina), estão muito próximos apesar de serem estatisticamente diferentes.

Dando continuidade a este estudo, seria interessante realizar a análise de aminoácidos, a fim de complementar a caracterização dos hidrolisados, possibilitando assim uma visão mais precisa do valor nutricional destas preparações. Além disso, propõe-se a realização de testes piloto a fim de ajustar as condições para produção em larga escala.

Considerando-se os resultados aqui obtidos, sugere-se o estudo da utilização de outras enzimas de diversas origens (animal, vegetal ou microorganismos) na busca de hidrolisados protéicos com elevados teores de di-tripeptídeos. Da mesma forma, outras fontes protéicas poderiam ser utilizadas como matéria-prima. Nesse caso, torna-se importante avaliar economicamente a escolha do substrato. Em todos estes casos, diferentes parâmetros hidrolíticos devem ser igualmente testados.

Os hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite poderiam ser utilizados como fonte protéica na elaboração de suplementos alimentares para os diversos casos de nutrição clínica, apresentando como vantagem, além do enriquecimento do teor protéico, uma melhor absorção das proteínas.

Propõem-se, também, o estudo das propriedades bioativas destes hidrolisados em modelos animais, assim como foi feito com os hidrolisados de arroz desenvolvidos no mesmo laboratório do presente trabalho, os quais foram testados e mostraram ser eficientes na redução da translocação bacteriana em ratos.

Finalmente, propõe-se o estudo das propriedades funcionais destes hidrolisados (capacidade emulsionante, solubilidade, formação de espuma, geleificação etc), visando seu emprego em diversos produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: IDF (Inter. Dairy Fed.) Sem. Prot. Fat glob modif., p. 97 - 105, 1993.
- ADAMS Jr., J.D.; KLAIDMAN, L.K. Parkinson's disease – redox mechanisms. *Curr. Med. Chem.*, v. 8, p. 809-814, 2001.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29 - 33, 1981.
- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, n.2, p.187-192, 2001.
- AMIOT, J.; BRISSON, G.J. Continuous automatic nitrogen determination for gel chromatography of protein enzymatic hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v.193, p.496 - 499, 1980.
- ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P.A. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. *Food Rev. Int.*, v. 9, p. 629 – 655, 1993.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2v.
- AUBES-DUFAU, I.; SERIS, J.L.; COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, n. 8, p.1982-1988, 1995.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres, *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BERTOL, T.M.; DOS SANTOS FILHO, J.I.; BONETT L. Soro de leite integral na alimentação dos suínos. Periódico Técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA-CNPSA, n.17, 1996.
- BEYNON, R.J.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, New York: Oxford University Press, 1989. 278p.

- BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; COELHO, J.V.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2008, (in press).
- 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. *Ciênc. Agrotecnol.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.
- BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey protein as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clin. Invest. Med.*; v. 16, p. 204-209, 1993.
- BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- BRANS, G.; SCHROËN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Memb. Sci.*, v. 243, p. 263-272, 2004.
- BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. *Life Extension Report*. Chicago: Life Exten Found., n.1, p.21-28, 1996.
- BUHL, R.; JAFFE, H.A.; HOLROYD, K.J.; WELLS, F.B.; MASTRANGELI, A.; SALTINI C.; CANTIN, A.M.; CRYSTAL, R.G. Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals. *Lancet*, v. 2, p. 1294-1298, 1989.
- 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. 207f. (Tese de Doutorado).
- CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; MACHADO, M.A.A.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da corolase pp e uso do carvão ativado na obtenção de hidrolisados protéicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 21, p. 259-266, 2006.

- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.
- 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.C. ; CUQ, J.L.; LORIENTE, D. *Proteínas alimentarias-bioquímica-propiedades funcionales-valor nutricional-modificaciones químicas*. Acribia, Zaragoza, 1989, 345p.
- CHERYAN, M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Illinois: Technomic Publishing Co, 1998, 527p.
- CHOBERT, J-M.; SITOHY, M.Z.; WHITAKER, J.R. Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 1, p. 220-224, 1988a.
- CHOBERT, J-M.; BERTRAND-HARD, C.; NICOLAS, M-G. Solubility and emulsifying properties o caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 5, p. 883 – 892, 1988b.
- CLARE, D.A.; SWAISGOOD, H.E. Bioactive milk peptides: A prospectus *J. Dairy Sci.*, v. 83, p.1187-1195, 2000.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 11, n. 7, p. 254 - 262, 2000.
- COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.*, v. 32, n. 5, p. 459-466, 1981.
- CORSI, M.K.; DA SILVA, C.R.N.; GIORDANO, R.C. Análise e simulação de processo de recuperação de soro de queijo: produção controlada de hidrolisados protéicos. Disponível em: <www.propg.ufscar.br/publica/viicic/tecnologia/te027.html>. Acesso em: 09 out. 2003.
- COSTA, E.L. *Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 2004. (Tese, Doutorado em Ciência dos Alimentos).

- DAVIS, M.T.; LEE, T.D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: A practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci*, v.1, p.935-944, 1992.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DEESLIE, W.D.; CHERYAN, M. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n. 2, p. 26 - 31, 1991.
- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Hidrolisado protéico de pescado In: OGAWA, M. & MAIA, E.L. *Manual de Pesca*. São Paulo: Varela, 1999.
- DIZDAROGLU, M. Weak anion-exchange high-performance liquid chromatography of peptides. *J. Chromatog.*, v. 334, p. 49-69, 1985.
- DUARTE, A.J.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados trípticos: 2. efeito da adição de NaCl. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 18, n.3, p.302-308, 1998.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FLINT, D.H.; TUMINELLO, J.F.; EMPTAGE, M.H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 22369-22376, 1993.
- FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; SANTOS, J.E.; OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1432 - 1438, 1993.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.

- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, v. 48, n.10, p. 86-88, 1994.
- FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. *Rev. Ciên. Tecnol.*, v. 10, n 19, p. 79-89, 2002.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, n. 3, p. 343-359, 1990.
- GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A.D.; EVANS E.P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v.29, p. 279-285, 1994.
- GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.78-87, 2003.
- GIL, L.; MARTINEZ, G.; GONZALEZ, I.; TARINAS, A.; ALVAREZ, A.; GIULIANI, A.; MOLINA, R.; TAPANES, R.; PEREZ, J.; LEON, O.S. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol. Res.*, v. 47, p. 217-224, 2003.
- GOLOVCHENKO, N.; KATAEVA, I.A.; AKIMENKO, V.K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, v. 591, n. 4, p.121-128, 1992.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-69, 1986.
- HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *J. Nut. Biochem.*, v.14, p. 251-258, 2003.
- HADDAD, J.J.; HARB, H.L. L-γ-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s). *Molec. Immun.*, v. 42, p. 987-1014, 2005.

- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v. 5, n. 6, p. 559-71, 1992.
- HARWALKAR, V.R.; CHOLETTE, R.C.; McKELLAR, R.C.; EMMONS, D.B. Relation between proteolysis and adstringent off-flavor in milk. *J. Dairy Sci.*, v. 76, p. 2521-2527, 1993.
- HERZEMBERGER, L.A.; DE ROSA, S.C.; DUBS, J.G.; ROEDERER, M.; ANDERSON, M.T.; ELA, S.W.; DERESINSKI, S.C. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc. Nat. Acad. Sc.*; v. 94, p. 1967-1972, 1997.
- HINSBERGER, A.; SANDHU, B.K. Digestion and absorption *Cur. Paed.*, v. 14, p. 605-611, 2004.
- HUFFMAN, L.M.; HARPER, W.J. Maximizing the value of milk through separation technologies. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.2238-2244, 1999.
- ILIEV, I.; TCHORBANOV, B. Determination of tryptophan in protein hydrolysates and fermentation media using gel chromatography. *Biotechnol. Appl Biochem.*, v.16, p.29-33, 1992.
- KENT, K.D.; HARPER, W.J.; BOMSER, J.A. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human protate epithelial cells. *Toxic. in vitro*, v. 17, p. 27-33, 2003.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, p .907 - 913, 1985.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients, *Proc. Biochem.* p.149-157, 1985.
- KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr Res.*, v.33, p.343-347, 1989.
- 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.
- KORHONEN, H.; MARNILA, P.; Gill, H.S. Milk immunoglobulins and complement factors. *Brit. J. Nut.*, v. 84, p. 75-80, 2000.
- LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, v. 48, p. 67-68, 1994.

- LANDRY, J.; DELHAYE, S.; VIROGBEN, G. Tryptophan content of feedstuffs as determined from three procedures using chromatography of barytic hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, p. 51 - 52, 1988.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D. AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.* v. 32, p.499-504, 1991.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioproduct Process*, 2007, (in press).
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P.R.; JULIEEN, A.R.; PEJOAN, C.H.; VERNEUIL, B. Procède pour préparer 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. *Brit. Food J.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- MALLIS, R.J.; HAMANN, M.J.; ZHAO, W.; ZHANG, T.; HENDRICH, S.; THOMAS, J.A. Irreversible thiol oxidation in carbonic anhydrase III: protection by S-glutathiolation and detection in aging rats. *Bio Chem.* v. 383, p. 649/662. 2002
- 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.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. *Rev Biochem*; v. 52, p. 711/760, 1993.
- MICKE, P.; BEEH, M.; SCHALAAK, F.; BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *European Journal of Clinical Inverstigation*; v. 41: p. 12-18, 2002.
- MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase *T. J. Food Sci.*, v.54, p.1225-1229, 1989.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pub.* v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.

- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- MORTENSON, M.A.; VICKERS, Z.M.; REINECCIUS, G.A. Flavor of whey protein concentrates and isolates. *International Dairy Journal*, 2007, (in press).
- NAKAMURA, A.; NAKANISHI, H.; SHIOMI, H. Characterization of the release and metabolism of delta sleep-inducing peptide (DSIP) in the rat brain. *Neurop.*, v. 24, n.3, p. 131-138, 1993.
- NIELSEN, S.S. *Food Analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- OTTESEN, M.; SVENDSEN, I. The subtilisins. In: PERLMANN, G.E.; LORAND, L. *Proteolytic enzymes - Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1970, p.199-215.
- PACHECO, M.T.B.; DIAS N.F.G; BALDINI, V.L.; TANIKAWA, C., SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos do soro de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n.2, p.333-338, 2005.
- PARK, Y.K. Produção de enzimas industriais de origem animal. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.) *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blugher, 2001, v. 3, p. 363 – 371.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.
- PEREA, A.; UGALDE U.; RODRIGUEZT, I.; SERRAT, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microb. Technol.*, v.15, p. 418-423, 1993.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.*, v.11, p.347-356, 2001.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.

- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, p. 597-635, 1998.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 1975, 573 p.
- RERAT, A.A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. *Rev. Nutr.*, v.18, no.1, p. 75-83, 2005.
- SAHA B.C.; HAYASHI K. Research review paper, Debittering of protein hydrolysates *Biotech. Adv.*, v. 19 p. 355-370, 2001.
- SAINT-SAUVEURA, D.; GAUTHIERA, BOUTINB, S.F.Y.; MONTONIA, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Intern. D. J.*, v. 18, p. 260–270, 2008.
- SALMONA, M., MUSSINI, E., POCCHIARI, F. BEGGOLIN, G. Determination of dipeptides in protein hydrolysates for total parenteral nutrition. *J. Chromatogr.*, v.246, p. 334-339, 1982.
- SAMMEL, L.M.; CLAUS, J.R. Whey protein concentrates effects on pink color development in a cooked ground turkey breast model system. *Meat Science* v. 65, p. 1293–1299, 2003.
- SCHMIDT, D.G.; MARKWIJK, B.W.V. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 47, p.15-22, 1993.
- SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.
- SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.*, v. 17, n.4, p. 397-409, 2004.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent projection against oxidative injury. *Pharmacol. Therap.*, v. 47, p. 61-71, 1990

- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, S.V.; MALCATA, X. Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* v.15, p.1-15, 2005.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Techn.*, v. 2, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994b.
- SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.* v.101, p.1501-1508, 2007.
- SISO M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.
- SOFIC, ELK.; JELLINGER, K.; RIEDERER, P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.*, n.142, p. 128-30, 1992.
- STAAL, F.J.; ELA, SW.; ROEDERER, M.; ANDERSON, MT.; HERZENBERG, LA. Glutathione deficiency and human immunodeficiency virus infection. *Lancet*; 339: p. 909/12, 1992.

- SUTHANTIRAN, M.; ANDERSON, M.F.; SHARMA, V.K.; MEISTER, A. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 87, p. 3343-3347, 1990.
- SVENNING, C.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: *International Dairy Federation Sem. Protein Fat glob. Mod.*, p. 96 – 106, 1993.
- TORRES, D.P.M. *Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. Comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos*. Braga: Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. 2005. 118p. (Dissertação, Mestrado em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos).
- TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. *Biom. and Pharm.*; v. 57, p. 144-55, 2003.
- USHIKUBO, F.Y.; FERREIRA, C.V.; VIOTTO L.A. Otimização do processo de obtenção de concentrado de caseína através de microfiltração. In: *Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP*, 9, 2001, Campinas. *Resumos...Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, UNICAMP, 2001* <<http://www.prp.unicamp.br/pibic/cdrom/pdfN/270.pdf>
- VAN DER VEN, C.; GRUPEN, H.; BONT, D.B.A.; VORAGEN, A.G.J. Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *Inter. Dairy J.*, v.12, p.813-820, 2002.
- VERMEIRSEN, V.; VAN CAMP, J.; DEVOS, L.; VERSTRAETE, W. Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: From batch experiment to semicontinuous model. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.5680-5687, 2003.
- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.
- VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; ROBBEN, A.J.P.M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 42, p. 353 - 375, 2002.

WIT J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 597-608, 1998.

YOUNDIM, MB. Understanding Parkinson's disease. *Sci. Am*; v. 276, p. 52-59, 1997

ZHANG, Y.; DORJPALAM, B; HO, C.T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p. 2467 - 2471, 1992.

OUTRAS PUBLICAÇÕES

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS ESPECIALIZADOS

BIASUTTI, E.A.R.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; LOPES, D.C.F.; SILVESTRE, M.P.C. Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína. *Ars Pharmaceutica*, v. 47, p. 425-435, 2006.

BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; COELHO, J.V.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2008, (No prelo).

DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.

DELVIVO, F.M.; BIASUTTI, E.A.R.; VIEIRA, C.R.; CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O., SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *International Journal of Food Science and Technology* (2005).

LOPES, D.C.F.; BIZOTTO, C.S.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; LOPES JR, C.O.; SILVESTRE, M.P.C. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates prepared with rice. *Journal of Food Technology* v.6, n.2, p. 57-65, 2008.

- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; SILVESTRE, M.P.C. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *Journal of Food Technology* (Faisalabad), 2008, (in press).
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. . Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *American Journal of Food Technology*, v. 2, p. 327-341, 2007
- SILVA, V.D.M. ; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of the immobilization of pancreatin and papain on activated carbon and alumina, using whey as protein substrate. *World Applied Sciences Journal*, v. 2, p. 175-183, 2007.
- SILVESTRE, M.P.C.; CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *International Journal of Food Engineering*, v. 3, p. 1-19, 2007.
- VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates. *Ars Pharm.*, v. 47, p. 281-292, 2006.
- VIEIRA, C.R., BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates. *Food Science and Technology* (Spain), v.47, n.3, p.281-292, 2006.

RESUMOS DE ARTIGOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS E SIMPÓSIOS

AFONSO, W.O.; LOPES JR., C.O.; SOUZA, M.W.S.; GERALDI, L.M.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de hidrolisados de proteínas do soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos para utilização em nutrição clínica. In: 7º Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007, Campinas. Anais Simpósio latino americano de ciência e tecnologia de alimentos - ciência e tecnologia de alimentos em benefício a sociedade: ligando a agricultura à saúde, 2007

BIASUTTI, E.A.R.; CAMPOS, R.B.D.; LARA, S.R.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba. Anais do XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

BIZZOTTO, C.S.; AFONSO, W.O.; AZEVEDO, K.V.; SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina: uso da pancreatina e do carvão ativado. In: 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: Abrindo Caminhos para o Desenvolvimento Científico e Industrial, Campinas, Sessão Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005. [Resumos] Campinas: UNICAMP, 2005. 1 CD-ROM.

BIZZOTTO, C.S.; AFONSO, W.O.; MACHADO, M.A.A.; SILVESTRE, M.P.C. Perfil peptídico de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. In: 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: Abrindo Caminhos para o Desenvolvimento Científico e Industrial, Campinas, Sessão Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005. [Resumos] Campinas: UNICAMP, 2005. 1 CD-ROM.

LOPES JR., C. O. ; SOUZA, M. W. S. ; AMORIM, A. C. P. ; SILVA, V. D. M. ; AFONSO, W. O. ; COELHO, J.V. ; SILVESTRE, M. P. C. . Efeito do pH e da enzima na extração das proteínas do feijão comum. In: 7º Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007, Campinas. Anais Simpósio latino americano de ciência e tecnologia de alimentos - ciência e tecnologia de alimentos em benefício a sociedade: ligando a agricultura à saúde.

SOUZA, M.W.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES JR., C.O.; SILVESTRE, M.P.C. Remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos de leite. In: 7º Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007, Campinas. Anais Simpósio latino americano de ciência e tecnologia de alimentos - ciência e tecnologia de alimentos em benefício a sociedade: ligando a agricultura à saúde.