

MAITÊ COSTA DA SILVA

**HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO
CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE:
REMOÇÃO DE FENILALANINA, GRAU DE
HIDRÓLISE E PERFIL PEPTÍDICO**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**

MAITÊ COSTA DA SILVA

**HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO
CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE:
REMOÇÃO DE FENILALANINA, GRAU DE
HIDRÓLISE E PERFIL PEPTÍDICO**

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

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

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**



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

MAITÊ COSTA SILVA

**“HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO
SORO DO LEITE: REMOÇÃO DE FENILALANINA, GRAU DE HIDRÓLISE
E PERFIL PEPTÍDICO”**

APROVADA EM 16 DE FEVEREIRO DE 2009

COMISSÃO EXAMINADORA

Amintas Fabiano de Souza Figueiredo
Prof. Dr. AMINTAS FABIANO DE SOUZA FIGUEIREDO

Evelyn de S. Oliveira
Prof.ª. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA

David L. Nelson
Prof. Dr. DAVID LEE NELSON

Mariaalice Pinto Coelho Silvestre
Prof.ª. Dra. MARIAALICE PINTO COELHO SILVESTRE
Orientadora

Ao meu eterno e grande amor Breno

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho:

À Deus, amigo fiel, quem guia meus passos e me dá força para seguir em frente sempre.

Ao meu marido Breno Barbosa Cerqueira Alves, agradeço por me mostrar a cada dia, de maneira sutil e com toda a sua sabedoria, que somos o que queremos ser. Considero-me privilegiada por ter alguém tão especial ao meu lado. Te amo eternamente!

Aos meus pais, Renato César da Silva e Maria Sílvia Costa pelo incentivo, carinho e amor incondicional. Como é bom poder compartilhar com vocês as minhas vitórias e pedir colo em minhas angústias: amo vocês!

Aos meus irmãos, Matheus Costa da Silva e Marcus Costa da Silva, por tornar os meus dias mais alegres e por fazer parte da minha vida de maneira tão especial. Amo vocês!

A toda a minha família que está sempre vibrando por mim, enviando energia positiva em todos os momentos. Obrigada!

À professora Doutora Marialice Pinto Coelho Silvestre por exercer o seu trabalho de forma gloriosa, por sua criteriosa orientação e por sua contribuição para o meu crescimento.

Aos membros da banca examinadora, professor Doutor Amintas Fabiano de Souza Figueiredo (FAFAR/UFMG), à professora Doutora Evelyn de Souza Oliveira (FAFAR/UFMG) e ao professor Doutor David Lee Nelson (FAFAR/UFMG), pela valiosa contribuição na finalização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelo incentivo e contribuição na minha formação.

Ao professor Doutor José Virgílio Coelho (FAFAR/UFMG), por me transmitir seus conhecimentos de forma tão gentil e por me incentivar na busca pelo saber.

À professora Doutora Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto (UFVJM), por quem tenho grande admiração e respeito. Obrigada por contribuir de forma admirável em minha formação, obrigada pelo carinho e pelos seus ensinamentos.

Às queridas amigas Raquel Linhares Carreira e Michely Capobiango, vocês são muito especiais para mim! Amigas, irmãs, companheiras, conselheiras, enfim, parte integrante da minha vida, sempre. Obrigada pelos deliciosos momentos desfrutados com vocês!

Á querida amiga Viviane Dias Medeiros pelo aconchego de suas palavras, pelos ensinamentos, por me ouvir sempre com tanto carinho. Você é muito especial, obrigada por tudo!

Às estagiárias do Laboratório de Bromatologia/Pesquisa por suas valiosas contribuições para a conclusão deste trabalho. Obrigada!

A todas as colegas de mestrado, pela amizade pelos divertidos momentos, conversas, conselhos e trocas de experiências. Obrigada meninas!

Aos funcionários da FAFAR/UFMG por trabalharem de forma harmoniosa, permitindo contribuindo de alguma forma para o desenvolvimento de minhas atividades acadêmicas.

Ao Marcão, por deixar o meu dia mais alegre, por sua simpatia e sua satisfação em ajudar.

Obrigada Marcão!

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

*“Viva como se fosse morrer amanhã
Aprenda como se fosse viver para sempre”.*

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVO GERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1.1 HIPERFENILALANINEMIAS.....	22
1.1.1 Classificação.....	25
1.1.2 Fenilcetonúria clássica.....	26
1.1.3 Diagnóstico.....	27
1.1.4 Tratamento.....	30
2 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS PARA FENILCETONÚRICOS....	30
2.1 Substitutos protéicos.....	31
2.2 Mistura de aminoácidos.....	32
2.3 Hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina.....	33
3 SORO DO LEITE.....	34
3.1 Proteínas do soro do leite.....	35
3.1.1 α-Lactoglobulina.....	36
3.1.2 β - Lactoalbumina.....	37
3.2 Concentrado protéico do soro do leite (WPC).....	40
4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS.....	40
4.1 Importância.....	41
4.2 Processo de hidrólise.....	42
4.3 Fatores interferentes.....	44

4.4 Proteases.....	46
4.5 Algumas proteases comerciais.....	46
4.5.1 Protezyn L.....	46
4.5.2 Corolase LAP.....	47
4.5.3 Protemax N200.....	47
4.5.4 Corolase L10.....	47
4.5.5 Protemax N411.....	48
4.5.6 Corolase PP.....	48
4.5.7 Corolase TS.....	49
4.5.8 Flavourzyme.....	49
5 REMOÇÃO DA FENILALANINA.....	49
5.1 Métodos de remoção.....	50
5.2 Avaliação da eficiência da remoção.....	51
6 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	52
6.1 Grau de Hidrólise.....	53
6.2 Perfil Peptídico.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
TRABALHO EXPERIMENTAL.....	67
CAPÍTULO I- OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE (WPC) COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA.....	67
RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	69
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1 MATERIAL.....	71
2.2 MÉTODOS.....	71
2.2.1 Determinação da composição química da matéria-prima.....	71
2.2.2 Preparo dos hidrolisados protéicos.....	72
2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos.....	73
2.2.4 Efeito de alguns parâmetros sobre o preparo dos hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina.....	73

2.2.5 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina.....	75
2.2.6 Análise estatística.....	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DO	76
LEITE.....	
3.2 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA.....	77
3.3 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE	79
FENILALANINA.....	
3.3.1 Efeito do tipo de enzima.....	80
3.3.2 Efeito da relação enzima: substrato.....	81
3.3.3 Efeito da concentração da matéria-prima.....	82
3.3.4 Efeito do tempo de reação.....	83
4 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CAPÍTULO II-GRAU DE HIDRÓLISE E PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS	87
ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE.....	
RESUMO.....	87
ABSTRACT.....	88
1 INTRODUÇÃO.....	89
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	91
2.1 MATERIAL.....	91
2.2 MÉTODOS.....	92
2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos.....	92
2.2.2 Determinação do Grau de Hidrólise (GH).....	92
2.2.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de WPC.....	93
2.2.4 Análise Estatística.....	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
3.1 GRAU DE HIDRÓLISE.....	95
3.2 PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE WPC.....	96
3.2.1 Teor de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados de WPC	97
3.3 EFEITO DOS PARÂMETROS HIDROLÍTICOS SOBRE O GRAU DE HIDRÓLISE	99
E PERFIL PEPTÍDICO.....	

3.3.1 Efeito de diferentes enzimas.....	99
3.3.2 Efeito da relação E: S e concentração da matéria-prima.....	101
3.4 CORRELAÇÃO ENTRE PERFIL PEPTÍDICO E GRAU DE HIDRÓLISE.....	104
4 CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS.....	110

LISTA DE TABELAS

1	Classificação das hiperfenilalaninemias, de acordo com a atividade enzimática e os níveis séricos de fenilalanina	24
2	Prescrição dietética de Phe, de acordo com os níveis séricos obtidos pela triagem neonatal	29
3	Composição centesimal dos produtos do soro do leite	38
I.1	Características das proteases utilizadas para o preparo dos hidrolisados protéicos	72
I.2	Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos do concentrado protéico do soro do leite (WPC)	74
I.3	Composição química do concentrado protéico do soro do leite	77
I.4	Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos do concentrado protéico do soro do leite	78
II.1	Características das proteases utilizadas para o preparo dos hidrolisados protéicos	94
II.2	Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de concentrado protéico do soro do leite (WPC)	95
II.3	Grau de hidrólise dos hidrolisados protéicos de WPC	96
II.4	Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite	100
II.5	Correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos do WPC	105

LISTA DE FIGURAS

1	Vias metabólicas da fenilalanina e tirosina	23
2	Principais etapas do trabalho experimental do Capítulo 1.....	65
3	Principais etapas do trabalho experimental do Capítulo 2.....	66
II.1	Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	- Enzima conversora de angiotensina
ACF	- Área corrigida da fração
BH₄	- Tetrahidrobiopterina
EDS	- Espectrofotometria Derivada Segunda
E:S	- Relação enzima e substrato
GH	- Grau de hidrólise
HPA	- Hiperfenilalaninemias
HPLC	- Cromatografia Líquida de alta eficiência de exclusão molecular
PAH	- Fenilalanina hidroxilase
SE-PHEA	- Cromatografia Líquida de alta eficiência
PKU	- Fenilcetonúria
WHEY	- Soro de leite
WPC	- Whey Protein Concentrate

RESUMO

Um dos objetivos deste trabalho consistiu em estudar as condições enzimáticas de hidrólise protéica e a remoção de fenilalanina (Phe), utilizando-se o concentrado protéico do soro do leite (WPC) como matéria-prima, com o intuito de obter um alimento ou ingrediente alimentar para ser utilizado na dieta de fenilcetonúricos. Além disso, caracterizou-se os hidrolisados do WPC, em relação ao grau de hidrólise (GH) e o perfil peptídico, avaliando-se o efeito do tipo de enzima, da relação enzima:substrato e da concentração da matéria-prima. Foi, igualmente, verificada a existência de correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico. Inicialmente, foram estudadas diferentes condições de hidrólise enzimática das proteínas do WPC e o carvão ativado (CA) foi empregado como meio adsorvente na remoção de Phe. O Efeito de alguns parâmetros, tais como tipo de enzima, relação E: S, concentração da matéria prima e tempo de hidrólise foi avaliado. Após passagem dos hidrolisados por coluna de CA, a Phe foi quantificada por espectrofotometria derivada segunda (EDS). O emprego da pancreatina na relação E:S de 1:100, concentração da matéria-prima de 10% e tempo de hidrólise de 5 horas, mostrou ser a condição mais eficiente, obtendo-se 81,3% de remoção de Phe, correspondentes a um teor final de 394,1 mg/100 g de hidrolisado. Posteriormente, foi avaliado o grau de hidrólise dos doze hidrolisados do WPC, que apresentaram maior percentual de remoção de Phe, por meio da relação entre os teores de nitrogênio α -aminado e total. Da mesma forma, esses doze hidrolisados foram analisados quanto ao perfil peptídico, empregando-se o fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular, seguido do método rápido da Área Corrigida da Fração que foi aplicado na quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres. O hidrolisado de WPC obtido pela ação da pancreatina e da protease do *A. oryzae*, ambas na relação E:S de 1:100 e concentração da matéria-prima de 10%, levaram à obtenção dos maiores valores de grau de hidrólise (30% e 27%, respectivamente). Em relação ao perfil peptídico, a utilização da protease do *A. oryzae* e da pancreatina, na relação E:S de 1:100 e concentração da matéria-prima de 10% e 7%, respectivamente, levou à obtenção do hidrolisado com maior conteúdo de di-tripeptídeos (16,14% e 9,12%, respectivamente) e menor teor de grandes peptídeos (média de 20%). Além disso, foi observada a existência

de correlação de fraca intensidade de associação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico, tendo sido positiva para as frações F2, F3 e F4 e negativa para a F1.

Palavras-chave: WPC; hidrolisados enzimáticos; fenilalanina; grau de hidrólise; perfil peptídico.

ABSTRACT

ENZYMATIC HYDROLYSATES OF WHEY PROTEIN CONCENTRATE: PHENYLALANINE REMOVAL, DEGREE OF HYDROLYSIS AND PEPTIDE PROFILE.

One of the purposes of this work was to study the enzymatic conditions for hydrolyzing proteins and the phenylalanine (Phe) removal, using whey protein concentrate (WPC) as substrate, aiming the preparation a food or a food ingredient to be used in phenilketonuric's diet. Moreover, WPC hydrolysates were characterized in relation to degree of hydrolysis (DH) and peptide profile, and the effect of the enzyme type, E:S ratio and substrate concentration was analyzed. In addition, the existence of a correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile was verified. Initially, different enzymatic hydrolysis conditions of WPC proteins were studied, and the activated carbon (AC) was used as adsorbent for Phe removal. The effect of some parameters such as enzyme type, E:S ratio, substrate concentration and time of hydrolysis was evaluated. After passing the hydrolysates through an AC column, Phe was quantified by second derivative spectrophotometry (SDS). The use of pancreatin in a E:S of 1:100, substrate concentration of 10% and reaction time of 5 hours showed to be the most efficient condition, leading to a Phe removal of 81,3%, which corresponds with a final Phe content of 394,1 mg/100g. Then, the degree of hydrolysis of the twelve WPC hydrolysates that showed the highest phenylalanine removal percentage was evaluated by the ratio between α -amino and total nitrogen. Also, these twelve WPC hydrolysates were analysed in respect to their peptide profile, using the high performance size-exclusion liquid chromatography for the fractionation followed by the Rapid Correct Fraction Area method for quantifying the peptides and free aminoacids. The WPC hydrolysate obtained by the action of pancreatin and *A. oryzae* protease, both at E:S ratio of 1:100 and substrate concentration of 10%, led to the highest values of degree of hydrolysis (30% and 27% respectively). In respect to peptide profile, the use of the protease from *A. oryzae* and pancreatin, at E:S ratio of 1:100 and substrate concentration of 10% and 7%, respectively, gave rise to the hydrolysate with the highest di-tripeptide contents (16,14% and 9,12%, respectively) and the lowest level of large peptides (20%, in average). Also, a correlation of low intensity association between the degree of hydrolysis and peptide profile was observed, with positive values for F2, F3 and F4 fractions and negative for F1.

Key words: WPC, enzymatic hydrolysates, phenylalanine, degree of hydrolysis, peptide profile.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho faz parte da linha de pesquisa “Propriedades funcionais e nutricionais de proteínas alimentares” que visa à produção de suplementos nutricionais e alimentos para fins dietéticos especiais, importantes para as áreas de nutrição e saúde, como também a obtenção de ingredientes ou agentes funcionais para alimentos e medicamentos.

A fenilcetonúria (PKU) constitui uma desordem genética causada pela mutação no gene que codifica a enzima fenilalanina-hidroxilase. Essa enzima é responsável pela conversão da fenilalanina em tirosina, dessa forma, sua deficiência impossibilita a hidroxilação da fenilalanina (Phe) conduzindo a um acúmulo sanguíneo desse aminoácido (MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006).

O tratamento da fenilcetonúria é quase que estritamente dietético e se baseia numa dieta restrita em proteínas, utilizando fórmulas especiais isentas ou com baixos teores de fenilalanina que podem ser suplementadas por tirosina e outros aminoácidos, além de vitaminas e minerais (ACOSTA, 1998; MIRA & MARQUEZ, 2000).

O Brasil importa misturas de aminoácidos livres, isentas de Phe, as quais são distribuídas para os centros de saúde do país. Essas misturas apesar da facilidade de prescrição e distribuição apresentam odor e paladar desagradáveis, além de serem monótonas e hiperosmóticas podendo causar diarreia (MIRA & MARQUEZ, 2000, GUADIX et al., 2000).

Uma alternativa viável para a substituição das misturas de aminoácidos seria o desenvolvimento de formulações à base de hidrolisados protéicos isentos ou com reduzido teor de fenilalanina. Tais hidrolisados apresentam melhor tolerância, sabor e odor mais agradáveis e menor osmolaridade. Além disso, são prontamente utilizáveis devido à presença de di- e tripeptídeos que são melhores absorvidos do que os aminoácidos livres (GONZÁLES-TELLO et al., 1994).

O processo de hidrólise constitui uma importante etapa para a obtenção de produtos isentos de fenilalanina, pois promove a exposição deste aminoácido facilitando a sua remoção através de um meio adsorvente (SINHA et al., 2007).

Diferentes métodos têm sido utilizados para a remoção da Phe, como emprego do carvão ativado, resinas de troca iônica e exclusão molecular. Os melhores resultados têm sido obtidos com o uso do carvão ativado (MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993). Em estudos realizados no laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, o carvão ativado foi utilizado com eficiência para a remoção de fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (93,6 a 99 %) (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2007), de soro de leite em pó (75 a 99 %) (BIASUTTI, et al., 2006; SILVA et al., 2007; DELVIVO et al., 2006) e de arroz (85 a 100 %) (LOPES et al., 2008), utilizando diferentes enzimas e condições hidrolíticas.

A proteína mais comumente utilizada para a obtenção dos hidrolisados é a caseína. Entretanto, essa proteína é normalmente importada o que eleva os custos de produção (FREITAS, et al., 1993; LAMAS, et al., 2001). Dessa forma, surge a necessidade de investimentos em fontes alternativas para a obtenção dos hidrolisados protéicos, como por exemplo, o soro do leite, um subproduto da indústria de laticínios.

As proteínas do soro apresentam alto valor biológico em virtude do elevado conteúdo de aminoácidos essenciais (BOUNOUS & GOLD, 1991). O concentrado protéico do soro do leite (WPC) é um produto originado da separação em membranas das proteínas do soro do leite, podendo apresentar de 35 a 80% de proteínas. Diversas aplicações importantes estão associadas ao WPC, sendo um ingrediente alimentar 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 (BRANS et al., 2004).

A caracterização dos peptídeos formados após a hidrólise protéica constitui um passo relevante, uma vez que o comprimento da cadeia desses peptídeos influencia diretamente sua taxa de absorção (FRENHANI & BURINI, 1999). Dessa forma, deve-se levar em consideração o controle do processo de hidrólise, e o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos. O grau de hidrólise tem sido um dos mecanismos de controle da hidrólise, representando o percentual de grupos amino livres clivados da proteína. Já o perfil peptídico tem sido eficientemente caracterizado por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) (SILVESTRE et al., 1994a), o que determina o tamanho dos peptídeos formados e, conseqüentemente, a capacidade de absorção do hidrolisado.

Diante do exposto, a obtenção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina, a partir do concentrado protéico do soro do leite, disponibilizaria um ingrediente ou alimento para a dieta de fenilcetonúricos, de alto valor nutricional e baixo custo.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi a obtenção de hidrolisados protéicos a partir do concentrado protéico do soro do leite (WPC), com baixo teor de fenilalanina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram: 1-conhecer a composição centesimal do concentrado protéico do soro do leite (WPC); 2- obter hidrolisados enzimáticos do WPC; 3- remover a Phe destes hidrolisados; 4- determinar o grau de hidrólise destes hidrolisados; 5-caracterizar o perfil peptídico destes hidrolisados; 6-verificar a existência de correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico.

REVISÃO DE LITERATURA

2 HIPERFENILALANINEMIAS

2.1. Classificação

As hiperfenilalaninemias (HPA) constituem uma desordem primária do sistema de hidroxilação da Phe (fenilalanina), de caráter autossômico recessivo, podendo ser causada pela deficiência da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH) (EC1 14.16.1) ou das enzimas que sintetizam ou reduzem a coenzima tetrahydrobiopterina (BH₄) (MIRA & MARQUEZ, 2000).

A PAH catalisa a primeira etapa da catabolização da Phe, isto é, sua conversão à tirosina (Tyr), apresentando como substratos a Phe, o oxigênio, e a biopterina (BH₄) como co-fator, conforme demonstrado na Figura 1. A enzima é classificada como uma oxidoreductase, atuando na introdução de um átomo de O₂ na Phe para formar o grupo hidroxila da tirosina. O BH₄, importante cofator para a hidroxilação da Phe, Tyr e triptofano (Trp), age transferindo elétrons do NADH para o oxigênio durante a hidroxilação, sendo oxidado a diidrobiopterina e, subsequentemente, reduzido pela diidrobiopterina redutase. (MARCO & WAITZBERG, 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000). O cofator é ainda essencial nas reações de hidroxilação de Phe em Tyr, da tirosina em L-Dopa e do (Trp) em 5-hidroxitriptofano e, posteriormente, em serotonina. Sua deficiência produz distúrbios no metabolismo desses aminoácidos diminuindo a formação de catecolaminas, melanina e serotonina.

De acordo com o erro metabólico envolvido, as hiperfenilalaninemias, podem ser divididas em três grandes grupos. O primeiro relaciona-se com a deficiência da atividade da enzima PAH, sendo esse grupo subdividido em três subgrupos em função do nível de atividade da PAH presente. O segundo e terceiro grupo, estão relacionados com a deficiência na atividade das enzimas que catalisam a regeneração e a biossíntese do co-

fator, respectivamente, sendo denominada PKU atípica ou HPA não fenilcetonúria (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

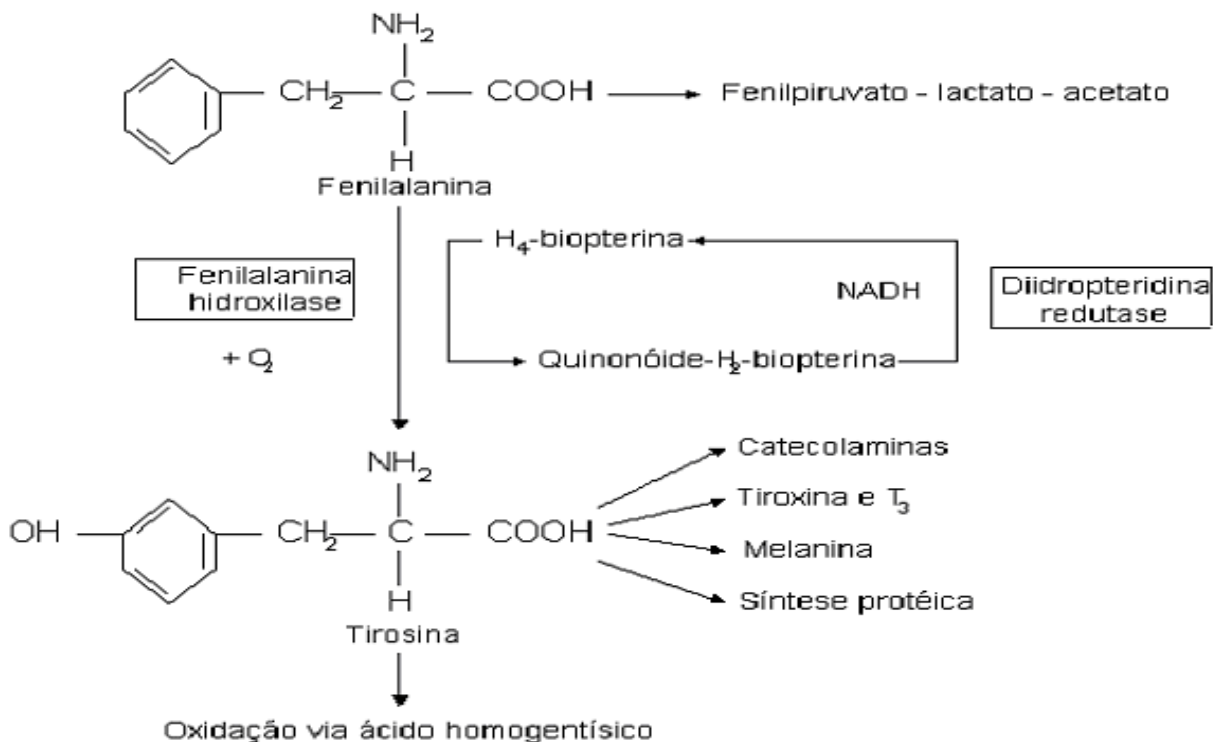


Figura 1 – Vias metabólicas da fenilalanina e tirosina (WYNGAARDEN & SMITH JR, 1984).

As hiperfenilalaninemias são classificadas de acordo com a atividade enzimática e os níveis séricos de fenilalanina, constatados por dosagens sanguíneas frequentes (Tabela 1).

A PKU clássica, de maior incidência entre as variantes, apresenta mudanças nos níveis de tirosina, excreção de diversos metabólitos da Phe na urina e reduzida ou nenhuma atividade PAH. Indivíduos com PKU clássica que não restringem a Phe da dieta podem desenvolver um grave, progressivo e irreversível atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Tabela 1. Classificação das hiperfenilalaninemias, de acordo com a atividade enzimática e os níveis séricos de fenilalanina.

Tipo	Atividade Enzimática	Phe sérica ($\mu\text{mol/L}$)	Tolerância máxima Phe (mg/dia)
PKU Clássica	<1%	>1200	250 – 350
PKU Leve	1-3%	600 - 1200	< 1000
HPP*	> 3%	240 - 600	> 1000

HPP = Hiperfenilalaninemia permanente.

PKU = fenilcetonúria

Adaptado de MARTINS et al. (1993)

A forma leve é caracterizada por deficiência na atividade da enzima fenilalanina-hidroxilase, porém os níveis séricos de fenilalanina apresentam-se entre 600 -1200 $\mu\text{mol/L}$, inferiores aos encontrados na fenilcetonúria clássica. Entretanto, o indivíduo deve ser submetido à dieta, porém com restrições mais moderadas do que na fenilcetonúria clássica (TRAHMS, 1998).

A HPA permanente ou benigna não apresenta alterações clínicas aparentes e, em geral, não exige tratamento dietético. As concentrações séricas de fenilalanina neste distúrbio não excedem a 600 $\mu\text{mol/L}$ (TRAHMS, 1998).

Distúrbios no metabolismo do BH₄, cofator essencial no metabolismo da fenilalanina, também provocam o aumento da concentração sanguínea de fenilalanina. Este tipo raro de hiperfenilalaninemia era antigamente rotulado de fenilcetonúria maligna, uma vez que dietas pobres em fenilalanina não impedem a deterioração neurológica. O tratamento para esta deficiência inclui, além da dieta restrita em fenilalanina, a utilização de medicamentos específicos, tais como o L-DOPA, 5-OH-triptofano e BH₄ (SCRIVER, 1997; MARTINS et al., 1993).

Existem ainda casos de HPA materna, na qual a alta concentração de Phe na mãe produz uma síndrome clínica no feto. Uma hipótese para a patogênese dessa síndrome seria a inibição no transporte competitivo de outros aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) através da placenta provocados pelos elevados níveis de fenilalanina sanguíneos, acarretando baixa disponibilidade de tirosina para o desenvolvimento fetal (MIRA & MARQUEZ, 2000). Há significativo aumento na incidência de retardo do crescimento (40%) e microcefalia (73%), (CUNNIFF et al., 2001).

Deve-se citar ainda a HPA transitória ou neonatal que é aparentemente benigna, não exigindo tratamento. A ocorrência desse tipo de HPA está freqüentemente relacionada com prematuridade, fornecimento precoce de formulações dietéticas com elevada concentração de proteínas, diluição inadequada ou hiperfervura do leite (STARLING et al., 1999)

2.1.2 Fenilcetonúria clássica

A fenilcetonúria ou PKU, como é mundialmente conhecida, é uma doença genética, causada pela mutação no gene que codifica a fenilalanina-hidroxilase, responsável pela hidroxilação da Phe e conseqüente transformação em tirosina (Tyr). Assim, a não hidroxilação da Phe tem como resultado o acúmulo de Phe no sangue e outros tecidos (MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006).

O fenillactato, fenilacetato e fenilpiruvato, na presença da enzima fenilalanina hidroxilase, não são encontrados em quantidades significativas na urina de pessoas normais, apresentando-se elevados na PKU. O acúmulo desses metabólitos anormais e de Phe no plasma têm graves conseqüências no sistema nervoso central, como falhas no andar ou falar, hiperatividade, tremor, microcefalia, falha no crescimento e retardo mental, sendo essa última a manifestação clínica mais severa (MIRA & MARQUEZ, 2000).

A incidência da fenilcetonúria varia consideravelmente em todo o mundo, com altas taxas na Irlanda (aproximadamente 1:4500) e menores taxas na Finlândia, Japão e Tailândia (taxas aproximadas: 1:100.000 1:108.000 e 1:212.000, respectivamente). Na América do Norte a incidência é de 1:10.000, sendo estimado que mais que 350 crianças nesse continente são diagnosticadas com fenilcetonúria a cada ano e requerem tratamento ao longo da vida (WAISBREN, et al., 2007).

No Brasil a prevalência de fenilcetonúria, segundo o Ministério da Saúde era estimada em 1:12.000 a 15.000 nascidos vivos, sendo que em Minas Gerais ocorre a cada 20.000 nascimentos (MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; AGUIAR, 2002).

Os pacientes fenilcetonúricos apresentam deficiência na pigmentação (cabelo e pele claros) devido à inibição completa da hidroxilação da tirosina pela tirosinase (primeira etapa na formação do pigmento melanina). Eczemas, complicações neurológicas e

algumas vezes atividade autística, bem como transtornos de conduta, também podem se fazer presentes (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Os metabólitos fenilactato, fenilacetato e fenilpiruvato são encontrados em quantidades elevadas na urina de pacientes fenilcetonúricos, não sendo normalmente encontrados na urina de indivíduos normais. Como consequência, o acúmulo desses metabólitos e de Phe no plasma, acarreta problemas no sistema nervoso central, como falhas no andar e falar, hiperatividade, tremor, microencefalia, falhas no crescimento e retardo mental (GREVE et al., 1994; MIRA & MARQUEZ, 2000).

2.1.3 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico da fenilcetonúria é realizado através da dosagem dos níveis de fenilalanina sangüínea, devido à sua alta confiabilidade. Os métodos mais utilizados para a dosagem da fenilalanina no sangue têm sido: o teste de Guthrie-BIA (semiquantitativo) e o de McCaman e Robins modificado (quantitativo). No teste de Guthrie-BIA, um pequeno disco de papel contendo excesso de Phe provoca a inibição do crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* em um meio de cultura. Já para o método quantitativo como o de McCaman e Robins, utiliza-se fluorimetria ou espectrometria de massa. Entretanto, deve-se estar atento para a possibilidade da ocorrência de falsos negativos para o teste de Guthrie-BIA e falsos positivos para o teste de McCaman. A metodologia enzimática tem sido utilizada por muitos especialistas em programas de triagem neonatal, em virtude do menor custo e maior precisão (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Os níveis de fenilalanina sangüínea em crianças fenilcetonúricas são normais após o nascimento, entretanto, aumentam rapidamente nos primeiros dias de vida. A análise de fenilalanina em sangue capilar de crianças recém-nascidas coletadas 24 h após o nascimento é efetiva e sensível. A análise da enzima PAH não é requerida, por ser um método invasivo (requer biópsia do fígado), mas desordens na biopterina (BH4) devem ser excluídas pela medida da biopterina sangüínea ou urinária e análise da diidrobiopterina redutase (DHPR) no sangue (HENDRIKSZ & WALTER, 2004).

Após confirmação da PKU a criança deve ser prontamente submetida a dieta com baixo teor de fenilalanina, a fim de se reduzir os níveis plasmáticos para uma

concentração próxima a de crianças saudáveis (60-180 $\mu\text{mol/L}$) (STEGINK et al., 1991; AGUIAR, 2002).

O diagnóstico diferencial entre a fenilcetonúria clássica e as demais hiperfenilalaninemias, pode ser obtido no sexto mês de vida administrando-se à criança alimentos com alto teor de fenilalanina e posterior dosagem sanguínea. Este procedimento é conhecido como Teste de Sobrecarga (O'FLYNN et al., 1980).

O Programa Nacional de Triagem Neonatal foi criado em 2001, tendo como objetivo o diagnóstico de doenças genéticas e acompanhamento dos indivíduos afetados. No estado de Minas Gerais foi criado o NUPAD (Núcleo em Pesquisa de Apoio Diagnóstico) que coordena a triagem, executa o tratamento e acompanhamentos clínicos, nutricionais e psicológicos de todos os indivíduos afetados, além de fornecer gratuitamente os substitutos protéicos aos pacientes fenilcetonúricos (AGUIAR, 2002).

2.1.4 Tratamento

A principal meta do tratamento da fenilcetonúria é manter a concentração sanguínea de fenilalanina em níveis limites seguros (120-360 $\mu\text{mol/L}$; e mulheres grávidas 120-240 $\mu\text{mol/L}$) sendo conseguido através da introdução de dieta com baixo nível de fenilalanina. A concentração elevada de fenilalanina no sangue é neurotóxica, pois compete com outros aminoácidos aromáticos para o transporte através da barreira hemato-encefálica resultando em uma deficiência de metabólitos necessários ao desenvolvimento do sistema nervoso central. Um dos objetivos da dieta é, portanto, evitar um aumento crônico da concentração sanguínea de fenilalanina e, conseqüentemente no tecido cerebral, o que pode conduzir a danos do sistema neuronal e comportamental (GIOVANINI et al., 2007).

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

A ingestão dietética para os fenilcetonúricos envolve a regulação cuidadosa dos níveis de L-fenilalanina com ingestão menor que 500mg/dia, quantidade esta suficiente para prevenir sua acumulação em excesso na circulação sanguínea e satisfazer as necessidades nutricionais (SARKISSIAN & GÁMEZ, 2005).

A dieta deve ser iniciada o mais precocemente possível, preferencialmente até os 21 dias de vida, visando manter os níveis séricos nos valores de referência, de acordo com a idade, promovendo assim, o crescimento pôndero-estatural, o desenvolvimento neuropsicomotor e mental adequados. Atualmente, preconiza-se que o tratamento deva ser realizado por toda a vida (ACOSTA & YANNICELLI, 1997). Crianças com diagnóstico tardio podem iniciar o tratamento em qualquer idade. A prática clínica comprova as vantagens da instituição da dieta nestes casos, quando o retardo mental já é evidente e irreversível. As crianças e adolescentes tornam-se mais sociáveis, há melhora da concentração e aprendizado nas escolas especiais, além de melhorar a hiperatividade.

Segundo ACOSTA (1998), a adequação dietética é avaliada pelos parâmetros de controle dos níveis séricos de fenilalanina, ganho de peso e altura satisfatórios e registros alimentares de 72 horas de acordo com a prescrição. A dieta visa controlar a ingestão de Phe existente em quase todas as proteínas e deve promover a adequação do aporte calórico e demais nutrientes, assim como o controle dos níveis séricos de fenilalanina. A definição da dieta em função da oferta de Phe é estimada, a partir da primeira consulta, pelos níveis séricos de fenilalanina de acordo com a Tabela 2.

Uma dieta com baixo nível de fenilalanina pode prevenir problemas cognitivos, entretanto, é uma opção difícil para adolescentes e adultos. Embora existam muitas tentativas para o melhoramento dos produtos isentos ou com baixa quantidade de fenilalanina, esses ainda continuam com propriedades sensoriais insatisfatórias (SARKISSIAN & GÁMEZ, 2005).

ACOSTA (1998) recomenda uma ingestão protéica 50% maior para crianças fenilcetonúricas em uso de fórmulas especiais constituídas de misturas de aminoácidos, considerando as alterações na absorção de aminoácidos isolados. Esta recomendação é atingida utilizando os alimentos permitidos com baixos teores de Phe e suplementos especiais isentos de Phe.

Tabela 2. Prescrição dietética de Phe, de acordo com os níveis séricos obtidos pela triagem neonatal.

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

Adaptado de ACOSTA & YANNICELLI (1997)

Em alguns estudos tem sido sugerido o uso da enzima fenilalanina amônio-liase (PAL) como forma de tratamento para fenilcetonúricos. Essa enzima promove a catálise da desaminação não-oxidativa da fenilalanina a ácido trans-cinâmico t-CA e amônia (MacDonald & CUNHA, 2007). A administração da enzima PAL sob a forma de injeções subcutâneas em ratos promoveu redução dos níveis séricos de fenilalanina em maior proporção do que a ingestão oral. Tal fato pode ser explicado pela inativação da enzima por proteólises digestivas quando administrada na forma oral. Entretanto, a forma subcutânea, pode promover a ocorrência de resposta imune, com produção de anticorpos contra a PAL e reação alérgica. Verifica-se, portanto, a necessidade de maiores estudos quanto a utilização da PAL para o tratamento de fenilcetonúricos (SARKISSIAN & GÁMEZ, 2005).

A administração oral de tetrahydrobiopterina diminuiu o nível sanguíneo de fenilalanina em pacientes com HPA atípica ou não-fenilcetonúrica e variantes de hiperfenilalaninemias leves (ocasionalmente algumas com fenilcetonúria clássica), os quais apresentam mutações nos genes da fenilalanina hidroxilase. Pacientes com mutações em diferentes genes na enzima PAH, apresentaram respostas diferentes ao tratamento com BH_4 sugerindo que a composição das subunidades da PAH pode ser importante para a resposta ao BH_4 (AGUADO et al., 2007).

3 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS PARA FENILCETONÚRICOS

3.1 Substitutos protéicos

O tratamento da fenilcetonúria clássica requer severa restrição de proteína natural e o consumo de substitutos protéicos. Os substitutos apresentam todos os aminoácidos com exceção da fenilalanina e permitem o suprimento acima de 75% da recomendação protéica em pacientes com fenilcetonúria clássica. Algumas preparações ainda contêm as quantidades suficientes para atender os requerimentos diários em vitaminas, minerais e elementos traços (MACDONALD & D'CUNHA, 2007).

Os substitutos protéicos tradicionais são oferecidos na forma de bebidas, entretanto, quando dissolvidos em água, geralmente apresentam sabor amargo, cheiro desagradável, hiperosmolaridade da solução, devendo ser administrados em grandes volumes (MACDONALD et al., 1997). Estudo com crianças de idade entre 1-5 anos que apresentavam problemas com alimentação, revelou que 48% das mães alegaram que seus filhos tinham dificuldades em continuar o tratamento com substitutos protéicos, sendo que, a maioria o ingeria na forma líquida, como bebida (MACDONALD et al., 1997).

Existem poucos substitutos protéicos desenvolvidos para jovens e adultos. Esses, entretanto, raramente atingem o controle do nível de fenilalanina sangüínea recomendado, o que pode estar relacionado com a baixa aceitação ao substituto protéico (MACDONALD, et al., 2004).

Os substitutos protéicos tradicionais com carboidratos adicionais vêm sendo substituídos por aqueles com um maior conteúdo de aminoácidos, reduzido teor de carboidratos e adição extra de vitaminas e minerais. Esses novos substitutos protéicos apresentam volume reduzido e contém todas as vitaminas essenciais, minerais e elementos traços (MACDONALD et al., 2004).

Uma das preocupações em relação aos substitutos protéicos tem sido a suplementação de tirosina. O trabalho de SPRONSEN et al., (2001) demonstrou uma incapacidade de dietas enriquecidas com tirosina em manter os níveis da mesma,

havendo uma diminuição da concentração da tirosina com a queda da concentração da fenilalanina.

De acordo com estudos de MACDONALD et al. (2004), os substitutos protéicos são componentes essenciais para o tratamento dietético de fenilcetonúricos, entretanto como eles têm pouca aceitação pelos pacientes é necessário mais pesquisas para melhorar a composição e qualidade desses produtos.

3.2 Mistura de aminoácidos

As misturas de L-aminoácidos foram adotadas desde a década de 80, sendo constituídas por uma mistura de aminoácidos livres, isentas de fenilalanina que fornecem o suprimento de nitrogênio, podendo ser acrescidas de carboidratos, gorduras, minerais, vitaminas e elementos-traços para suprir as necessidades nutricionais de diversas faixas etárias (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Essas misturas, apesar da facilidade na prescrição e distribuição aos pacientes, possuem odor e paladar desagradáveis, além de serem monótonas, dispendiosas e hiperosmóticas. Sua administração que deveria ocorrer em pequenas porções durante o decorrer do dia, freqüentemente é feita de uma só vez, levando a um prejuízo na sua utilização biológica e aumento da metabolização dos aminoácidos por via oxidativa (MIRA & MARQUEZ, 2000, GUADIX et al., 2000).

Existem diversas formulações disponíveis no mercado, sendo que no Brasil estão disponíveis mediante a sua importação e apresentam elevado custo. Dentre essas formulações se encontram o Lofenalac (com alto teor calórico), PKU-1, PKU-2 e PKU-3 (isentos da adição de gordura e teor reduzido de carboidratos, formulados para faixas etárias específicas), outros como XP Analog, XP Maxamaid e XP Maxamum, que contêm 5 mg de Phe ou menos, sendo que o XP Maxamaid e XP Maxamum não contêm lipídios (MIRA & MARQUEZ, 2000; GUADIX et al., 2000; MACDONALD et al., 2003).

3.3 Hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina

Os hidrolisados protéicos são fontes de nitrogênio utilizadas primeiramente para o uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional (MIRA & MARQUEZ, 2000). Os hidrolisados protéicos enzimáticos constituem-se de peptídeos de cadeia curta com composição característica de aminoácidos e massa molecular definida, sendo altamente desejáveis no desenvolvimento de formulações específicas. Eles apresentam importantes vantagens em relação às misturas de aminoácidos, em que o componente protéico consiste exclusivamente de aminoácidos livres, os quais são de mais difícil absorção quando comparados aos oligopeptídeos (especialmente di- e tripeptídios). Os peptídeos apresentam ainda menor hiperosmolaridade do que a mistura de aminoácidos sendo melhores absorvidos e evitando problemas osmóticos (CLEMENTE, 2000).

A produção de hidrolisados protéicos isentos de fenilalanina iniciou-se no Japão nos anos 70, na tentativa de se obter concentrados protéicos inodoros, sem cor e sem sabor a partir de proteínas de soja e de peixe, através da proteólise enzimática (MIRA & MARQUEZ, 2000).

O preparo dos hidrolisados protéicos com reduzido teor de fenilalanina é baseado na hidrólise enzimática com a conseqüente exposição deste aminoácido, seguida da sua remoção por um meio adsorvente (SHIMAMURA et al., 1999).

Dentre as diversas fontes protéicas que podem ser utilizadas no preparo dos hidrolisados, a caseína é a escolhida na maioria dos casos (SHIMAMURA et al., 1999; NEVES et al., 2004). Entretanto, no Brasil essa proteína é normalmente importada, o que eleva os custos de produção (LAMAS et al., 2001).

As formulações especiais para fenilcetonúricos são elaboradas utilizando-se os hidrolisados protéicos com baixo teor de Phe como fonte de proteína (maior proporção de di- e tripeptídeos), acrescidos de gordura, carboidratos, minerais e/ou elementos-traço. Normalmente os aminoácidos lisina e cistina são adicionados após esta etapa para repor eventuais perdas durante a secagem (TESMER et al., 1998).

4 SORO DO LEITE

O soro do leite é um subproduto da produção de queijos, sendo o líquido remanescente após a precipitação da caseína (SGARBIERI, 1996).

Os principais constituintes do soro do leite são a 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).

CHERYAN (1998), em seu estudo, considerou o soro do leite o mais importante rejeito da indústria de laticínios, sendo desperdiçado aproximadamente 47% das 115 milhões de toneladas de soro produzidas mundialmente.

A produção do soro do leite vem crescendo desde a década de 90, tanto a nível nacional quanto mundial, aumento este relacionado à maior produção de queijo, sendo produzidos 9 a 11 Kg de soro para cada Kg de queijo (MCINTOSH et al. 1998).

O descarte do soro além de causar problemas de ordem ambiental, quando encarado como efluente líquido, em virtude de sua alta demanda de oxigênio, é também um desperdício protéico e de outros nutrientes, uma vez que retém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite (TORRES, 2005). Entretanto, a descoberta de propriedade bioativas e funcionais do soro do leite e seus componentes chama a atenção para a agregação de valor ao produto (WALZEN et al., 2002).

De acordo com SGARBIERI (2004), podem ser obtidos dois tipos diferentes de soro: o soro ácido (pH < 5,0) e o soro doce (pH 6,0-7,0). O soro doce é obtido pelo processo de coagulação enzimática, enquanto o soro ácido resulta da precipitação ácida no pH isoeletrico das caseínas (pH=4,6). O soro ácido geralmente apresenta o maior teor de minerais e menor conteúdo de proteínas que os soros doces, sendo sua utilização na alimentação mais restrita devido ao sabor ácido e elevado teor salino (SISO, 1996). Já o soro doce, apresenta maior quantidade de peptídeos e aminoácidos (SGARBIERI, 1996).

A tradicional tendência do soro de leite de ser visto como um resíduo sem qualquer valor comercial está sendo abandonada, dadas as suas excelentes propriedades nutricionais e funcionais (HINRICHS, 2001).

Diversas utilidades são atribuídas ao soro de leite como a fabricação de bebidas lácteas, produção de ricota e de ingredientes na produção de alimentos industrializados como salsichas, biscoitos, bolos, doces, etc. (CHERYAN et al., 1998).

O soro de leite pode ainda ser utilizado 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).

Desde a primeira metade do século XX têm sido desenvolvidas tecnologias capazes de concentrar ou separar, em larga escala, os componentes mais importantes do soro de leite, do ponto de vista nutricional e tecnológico: as proteínas (HUFFMAN & HARPER, 1999). Os processos desenvolvidos utilizam membranas semipermeáveis e a pressão como força diretriz, sendo que a separação dos componentes do soro baseia-se, essencialmente, no tamanho molecular dos compostos (LEWIS, 1996).

4.1 Proteínas do soro do leite

A fração protéica do soro representa em torno de 18-20% do total de proteínas do leite. As duas principais proteínas do soro α -lactoalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg) perfazem 70-80% das proteínas totais do soro (JOVANOVIC et al., 2005). As sub-frações ou peptídeos secundários, assim denominados por se apresentarem em pequenas concentrações no soro do leite, são compostas por glicomacropéptido, imunoglobulinas, albumina, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (HARAGUCHI et al., 2006).

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

Em virtude do seu conteúdo em aminoácidos essenciais, as proteínas do soro apresentam alto valor biológico quando comparado a outras proteínas da dieta. O seu elevado teor de aminoácidos sulfurados proporciona um alto coeficiente de eficiência protéica (CEP-3,2) quando comparado à caseína (2,6) (BOUNOUS & GOLD, 1991).

O relativo excesso de alguns aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina, isoleucina), apresentado pelas proteínas do soro, possibilita sua utilização como um

efetivo suplemento para proteínas vegetais, as quais são freqüentemente limitadas nesses aminoácidos. Dessa forma, as proteínas do soro apresentam efeito favorável sobre proteínas comuns que apresentam CEP menor que 2,5 incluindo soja, amêndoas, milho e glúten do trigo (WALZEM et al., 2002).

As proteínas do soro têm sido reconhecidas como valiosos ingredientes alimentares com importantes propriedades nutricionais e funcionais, que possuem elevada quantidade de aminoácidos sulfurados, os quais apresentam funções antioxidantes (SINHA et al., 2007).

A desnaturação térmica das proteínas do soro do leite ocorre em temperaturas superiores a 60 °C, após trinta minutos de aquecimento. Já a 95 °C verifica-se completa desnaturação térmica, sofrendo extensa transformação conformacional com exposição de grupos nucleofílicos, altamente reativos, e de áreas hidrofóbicas (SGARBIERI, 1996).

As propriedades funcionais das proteínas do soro estão relacionadas a processos de emulsificação, gelatinização, capacidade de ligação com a água, solubilização, poder espumante e desenvolvimento de viscosidade (KORHONEN et al., 1998). Tais propriedades estão relacionadas fundamentalmente, com suas características físicas, químicas e estruturais/conformacionais, que incluem: tamanho, composição, e seqüência aminoacídica, segmentos polipeptídicos do arranjo terciário e secundário, inter- e intraligações cruzadas, flexibilidade em resposta a condições externas (JOVANOVIC et al., 2005).

Além disso, uma importante característica que tem sido atribuída às proteínas do soro é a sua capacidade de aumento da resposta imune através de uma maior produção de glutathione celular. A glutathione, por sua vez, desempenha funções metabólicas como antioxidante celular, protegendo contra efeitos deletérios de radicais livres e como substrato para a enzima glutathione peroxidase com ação desintoxicante sobre o peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos (BRINK, 1996).

4.1.1 α -Lactoalbumina

A α -lactoalbumina (α -LA) é uma proteína do soro globular compacta, ácida, que apresenta 14,2 kDa de massa molar. É estabilizada pelas quatro ligações dissulfídicas e não apresenta grupo tiol livre, entretanto, uma dessas ligações é mais sensível à clivagem

que as demais, devido à sua menor estabilidade inerente (JOVANOVIC et al., 2005; CONSIDINI et al., 2007).

A α -LA é uma proteína ligante do cálcio e apresenta alta afinidade por outros íons metálicos, incluindo Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} e Al^{+3} . Essa proteína representa uma das proteínas do complexo enzimático da síntese de lactose que catalisa o último ponto da biossíntese. Por essa razão, essa proteína é a de maior interesse em termos de controle da secreção do leite (CONSIDINI et al., 2007). Entretanto, em valores de pH igual ou inferior a 4,0, a α -LA encontra-se susceptível à digestão pela pepsina do estômago (LECTURE, 1998).

Essa proteína constitui-se de uma cadeia polipeptídica que apresenta 123 resíduos de aminoácidos, sendo 67 desses, aminoácidos essenciais que contém quatro ligações dissulfídicas e não apresentam grupos sulfidril livres. Moléculas nativas de α -lactalbumina apresentam dois domínios: um domínio longo α -helicoidal e um domínio curto β -folheados que se encontram conectados com cálcios ligantes (JOVANOVIC et al., 2005).

A forma purificada da α -LA é usada comercialmente em fórmulas infantis devido à sua similaridade estrutural e conformacional com as proteínas do leite materno, sendo também utilizada em alimentos da nutrição esportiva em razão do seu conteúdo de aminoácidos ramificados. Tais aminoácidos são utilizados pelos músculos tanto para o fornecimento de energia quanto para a síntese de proteínas, sendo também reportado melhoria no desempenho físico, mediante o consumo de dietas enriquecidas com os aminoácidos de cadeia ramificada (WALZEM et al., 2002).

4.1.2 β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -Lg) é a proteína globular que apresenta massa molar de 36,6 kDa com estrutura secundária e terciária definidas. É composta por 162 resíduos de aminoácidos; 84 desses são aminoácidos essenciais e quatro resíduos de cisteína (JOVANOVIC et al., 2005).

Em valores de pH de 5,1 e 6,7 a β -lactoglobulina se apresenta como um dímero estável consistindo de duas unidades esféricas. Em valores de pH menor que 3,0 ou maior que 8,0, os dímeros se dissociam em monômeros. Na faixa de pH entre 5,1 e 3,8 a β -

lactoglobulina tende a formar octâmeros, a baixas temperaturas e elevadas concentrações de proteína (SGARBIERI, 1996).

O tratamento térmico da β -Lg em pH neutro, causa a dissociação da forma nativa da proteína a dímero, sendo parcialmente desdobrada havendo sua desnaturação e agregação. A taxa e via metabólica da dissociação é dependente da concentração da proteína, do pH, temperatura e outros fatores.

Embora isolada há 60 anos atrás, a função desta proteína, segundo WALZEM et al., (2002), ainda é desconhecida, mas ela se liga ao cálcio e zinco e a uma variedade de pequenas moléculas hidrofóbicas. Entretanto, LECTURE (1998), em seu trabalho, atribuiu à β -Lg 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).

A alergenicidade das proteínas do leite está associada à β -Lg e afeta 1-2% das crianças de idade inferior a 2 anos, entretanto, essa proteína não está presente no leite humano (TORRES, 2005).

A presença do aminoácido essencial cisteína, na β -Lg é relevante devido a sua propriedade de estímulo à síntese da glutathione, um tripeptídeo anticarcinogênico produzido pelo fígado para a proteção contra tumores intestinais (LECTURE, 1998).

Frações enriquecidas de β -Lg têm sido utilizadas em produtos manufaturados de carne e peixes, alimentos formulados, proteína ácida fortificada através ou como substituição do ovo branco (SMITHER et al., 1996).

4.2 Concentrado protéico do soro do leite (WPC)

Desde 1980, existe um grande interesse no estudo das proteínas do soro do leite devido ao seu alto valor nutritivo e propriedades nutricionais. Com o advento de técnicas de fracionamento por membrana incluindo ultrafiltração, osmose reversa, e microfiltração, foi possível o desenvolvimento de produtos à base do soro do leite. Esses produtos incluem a proteína do soro em pó, o concentrado protéico do soro (WPC), o isolado protéico do soro (WPI), hidrolisado protéico do soro (WPH) dentre outros como a lactoglobulina e lactalbumina puras (POPOVIC-VRANJES & VUJICIC, 1997).

Os concentrados protéicos de soro (WPC) são produtos com teor protéico de 35-80% e um conteúdo lipídico maior que 4%. A presença dos lipídios afeta as propriedades funcionais do WPC e promove o desenvolvimento de reações de oxidação as quais promovem o surgimento de *off-flavor* ou aroma desagradável. Por essa razão, têm sido desenvolvidos métodos para reduzir o conteúdo lipídico em produtos de WPC. Um desses métodos é a precipitação lipídica termocálcica que consiste na adição de íons cálcio divalentes à solução de WPC, com ajustamento do pH para valor de 7,3 e aquecimento da solução final. O resultado é a agregação e precipitação do complexo fosfolipoprotéico, sendo removido por microfiltração e produzindo WPC com reduzido teor lipídico (0,5%) (KARLESKIND et al., 1995).

A composição dos produtos típicos do soro está representada na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Composição centesimal dos produtos do soro do leite.

	Soro em Pó	WPC 34	WPC 80	Lactoalbumina	WPI
Proteína%	13	34	80	90	92
Lactose%	75	53	6	0,5	1
Cinzas%	8	7	3	0,5	2
Gorduras%	1	3	7	4	1
Umidade%	3	3	4	4	4

Fonte: HUFFMAN & HARPER (1999) WPC: concentrado protéico de soro; WPI= isolado protéico de soro.

Os produtos do concentrado protéico do soro (WPC) existem no mercado em concentrações de proteínas que variam de 34% a 85%. Na denominação comercial, é referido o teor aproximado de proteínas, assim o WPC80 terá um teor de proteínas próximo a 80%. Os isolados protéicos do soro (WPI) têm, por norma, concentrações superiores e, em muitos casos, acima de 90% (HUFFMAN & HARPER, 1999).

Nota-se uma considerável variabilidade na composição dos WPCs 80 e WPIs existentes no mercado americano e europeu que é demonstrada na Tabela 3. Essa variabilidade pode ser explicada pela composição inicial do soro, que depende da

composição do leite, e, sobretudo dos processos de obtenção de queijo ou caseínas (DE LA FUENTE et al., 2002).

Apesar do soro do leite apresentar nutrientes de alto valor biológico, sua utilização *in natura* é limitada devido à alta perecibilidade do material atribuída à alta diluição de seus componentes e conteúdo em minerais. Entretanto, diversas tecnologias de processamento têm sido aplicadas nessa matéria-prima como forma de agregação de valor.

Dentre as referidas tecnologias inclui-se a separação por membranas que produz proteínas nativas, sem impacto em suas propriedades funcionais e nutricionais, garantindo assim sua utilização como ingrediente na indústria alimentícia (USHIKUBO et al., 2001; ROMAN & SGARBIERI, 2005).

A produção do concentrado protéico do soro inclui as etapas de clarificação, ultrafiltração (permeável), filtração e secagem (HUFFMAN & HARPER, 1999).

Originalmente, o WPC era utilizado nos Estados Unidos (USA) para reduzir a poluição ambiental e na alimentação animal. Atualmente, o WPC vem ganhando espaço na utilização como ingrediente alimentar (HUFFMAN & HARPER, 1999).

Enquanto os Estados Unidos (USA) focavam na produção do WPC com um percentual protéico de 34%, outros países buscavam desenvolver produtos com alta concentração protéica e propriedades funcionais específicas. Diversas aplicações têm sido atribuídas utilizando-se WPC com alto teor protéico (acima de 80%) como, por exemplo, em carnes, produtos de panificação, sopas, dentre outros (HUFFMAN & HARPER, 1999).

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

Existem controvérsias em relação à atividade biológica das proteínas do soro. Alguns autores relataram que a atividade dessas proteínas depende da preservação de sua estrutura nativa (SMITHER et al., 1996), outros já acreditam na ocorrência de peptídeos bioativos de proteínas desnaturadas, sem, contudo especificar o grau de desnaturação (FITZGERALD & MEISEL, 1999; TAKADA et al., 1997).

O WPC apresenta uma concentração protéica, estabilidade e conservação das características físico-químicas superior ao soro do leite. Além disso, apresenta facilidade de manipulação laboratorial, o que justifica sua escolha como melhor forma da utilização das proteínas do soro (BRANS et al., 2004).

5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

5.1 Importância

A hidrólise enzimática das proteínas produz peptídeos de tamanhos diferentes e aminoácidos livres, como resultado da clivagem das ligações peptídicas (SINHA et al., 2007).

As soluções de hidrolisados protéicos contendo di- e tripeptídeos apresentam uma osmolaridade menor do que as soluções de aminoácidos livres e, por isso são mais bem toleradas por indivíduos com dificuldade de absorção (GONZÁLES-TELLO et al., 1994). Além disso, a imunogenicidade dos hidrolisados protéicos é menor do que a apresentada por proteínas e peptídeos de elevado peso molecular. Dessa forma, os hidrolisados são bastante utilizados na alimentação de pessoas que apresentam dificuldades na absorção de proteínas, como idosos e crianças com diarreia e fibrose cística (AUBES-DUFAU et al., 1995).

De acordo com LAHL & BRAUN (1994), a hidrólise de proteínas alimentares favorece as características nutricionais da proteína, aumenta a vida de prateleira e confere melhorias nas propriedades sensoriais devido à remoção de odores e ingredientes tóxicos ou inibitórios.

O uso dos hidrolisados enzimáticos é destinado geralmente, a três grandes grupos: (1) formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo; (2) formulações especiais para adultos com função gastrintestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos; e (3) suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Problemas de alergenicidade podem ocorrer na presença de hidrolisados protéicos e peptídeos de alto peso molecular. Durante o processo de hidrólise pode haver o aparecimento de sabor amargo que parece estar relacionado com a hidrofobicidade das cadeias laterais e com a fonte protéica utilizada. Esses fatores desaparecem para produtos formados por peptídeos de massas molares inferiores a 1000 Da (OTANI et al., 1990).

Estudos têm sido conduzidos na tentativa de identificar os fatores relacionados com a ocorrência do sabor amargo e desenvolver métodos para evitar o seu aparecimento. Peptídeos com sabor amargo apresentaram alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos (AUBES-DUFAU et al., 1995).

De acordo com FREITAS et al., (1998), o controle da quantidade da enzima utilizada na hidrólise pode favorecer a formação de peptídeos de massa molecular maiores que aqueles responsáveis pelo desenvolvimento de sabor amargo. O trabalho de MORAIS et al., (2004, 2005) realizado no laboratório de Bromatologia/Pesquisa utilizou o encapsulamento em lipossomas e lipoesferas, sendo eficiente para mascarar o sabor amargo de hidrolisados de caseína, obtidos pela ação da papaína.

5.2 Processo de hidrólise

A hidrólise das proteínas pode ser conduzida por métodos ácidos, alcalinos ou enzimáticos, cujas vantagens e desvantagens irão depender da forma de utilização do hidrolisado e objetivos a serem alcançados (SINHA et al., 2007).

A hidrólise ácida e alcalina tende a ser um processo de difícil controle, e os produtos obtidos apresentam qualidade nutricional reduzida. A hidrólise química pode formar substâncias tóxicas como a lisino-alanina devido à racemização dos aminoácidos, reduzindo, assim, a qualidade nutricional dos produtos formados (GUADIX, et al., 2000).

O processo enzimático de hidrólise apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos tradicionais (ácido e alcalino). Dentre estas, vale ressaltar: a seletividade, uma vez que as enzimas são específicas para seus substratos, o que reduz a possibilidade do aparecimento de produtos de degradação; condições moderadas de temperatura (40-60 °C) e pH (6-8); manutenção do valor nutritivo, já que não ocorre degradação dos aminoácidos, ao contrário da hidrólise ácida que destrói triptofano e desamina os

aminoácidos serina e treonina, e da hidrólise alcalina que elimina arginina e cisteína (GUADIX et al., 2000).

A hidrólise enzimática pode conduzir ao desenvolvimento de componentes nutricionais biologicamente ativos, capazes de promover oportunidades de ganhos na saúde. Além disso, esse processo tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, tais como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (VOJDANI & WHITAKER, 1994).

Diversos trabalhos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa empregaram a hidrólise enzimática no intuito de elevar o teor de oligopeptídios de hidrolisados protéicos (MORATO et al., 2000; MORAIS et al., 2005; BARBOSA et al., 2004; LOPES et al., 2005; DELVIVO et al., 2006; SOARES et al., 2007; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2008; LOPES et al., 2008; AFONSO et al., 2008) ou de melhorar as propriedades funcionais de proteínas (SILVA & SILVESTRE, 2003; BIZZOTO et al., 2005; CAPOBIANGO et al., 2007).

5.3 Fatores interferentes

A otimização do processo de hidrólise enzimática depende do controle de diversas variáveis como: pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de matéria-prima, relação enzima:substrato, inativação enzimática ao final do processo (CÂNDIDO et al., 1998). De acordo com CLEMENTE (2000), dentre os fatores que devem ser levados em consideração para a obtenção de hidrolisados protéicos com características físicas, químicas e nutricionais definidas são: a fonte protéica, enzimas proteolíticas apropriadas e o desenvolvimento de processos pós-hidrólise.

A escolha da enzima proteolítica é muito importante, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e teor de aminoácidos livres desejáveis (HAQUE & MOZAFFAR, 1992).

De acordo com SCHIMIDT & POOL (1991), o processo de hidrólise da α -La utilizando-se diferentes enzimas, variou com a composição do meio (presença de Ca^{+}), temperatura de incubação e grau de desnaturação da proteína.

PINTADO et al., (1999) verificaram significativas diferenças na ação das enzimas *Aspergillus niger* e a tripsina, em termos de performance catalítica, ao analisar a concentração total de aminoácidos livres dos hidrolisados.

Entretanto, diferentes enzimas (alcalase, pancreatina e mistura de enzimas proteolíticas) apresentaram resultados similares de hidrólise das principais proteínas do soro do leite (α -La e a β -Lg), em relação ao tamanho médio dos peptídeos formados. Esses resultados estão de acordo com os de CHOBERT et al. (1988) que, empregando duas enzimas diferentes (tripsina e protease V8 (*S. aureus*), na hidrólise da caseína, não observaram variações no tamanho dos peptídeos obtidos nos dois processos.

Em trabalho realizado por SILVESTRE et al., (1994b), empregando-se as mesmas condições hidrolíticas, o hidrolisado preparado com pancreatina, apresentou maior conteúdo de peptídeos nas frações cromatográficas do que aquele preparado com tripsina, exceto a fração de grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos).

De acordo com KILARA (1985), o tempo requerido para atingir um determinado grau de hidrólise diminui exponencialmente com o crescente aumento da temperatura da reação, até o momento em que a inativação enzimática pelo calor se torna significativa. Em calor de desnaturação ocorre uma perda gradual das propriedades catalíticas da enzima, sendo crescente a taxa de inativação com o aumento da temperatura (REED, 1975).

A ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada por alguns autores, visando a interrupção da reação hidrolítica, empregando-se temperaturas na faixa de 80 a 90 °C, por 10 a 20 min (SILVESTRE et al., 1993; MORATO et al., 2000).

A relação enzima: substrato (E:S) interfere no processo de hidrólise tanto na velocidade da reação quanto no tamanho dos peptídeos formados no final do processo (GAUTHIER et al., 1986).

SILVESTRE et al., (1994b), comparando dois hidrolisados pancreáticos de caseína, mostraram que uma redução na relação E:S de 1:25 para 1:200 levou a um maior conteúdo de grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos), e a uma menor proporção de peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos) e aminoácidos livres. Por outro lado, o teor de di- e tripeptídeos permaneceu inalterado.

Já SCHIMIDT & POOL (1991), utilizando enzimas diferentes, verificaram que a redução da relação E:S de 1:100 para 1:1000, aumentou ou diminuiu a velocidade de hidrólise da α -La e/ou da β -Lg dependendo da enzima utilizada.

Um outro fator que deve ser controlado é o grau de hidrólise (SILVESTRE et al., 1993). Esse representa a relação entre o número de aminoácidos livres e o conteúdo total de aminoácidos, indicando o percentual de clivagem das ligações peptídicas (NEVES et al., 2004).

Muitos processos pós-hidrólise têm sido utilizados para a produção de hidrolisados protéicos com características desejáveis. Um dos aspectos a ser considerado relaciona-se com o tamanho dos peptídeos resultantes. Neste contexto, a ultrafiltração apresenta resultados eficientes para a remoção de peptídeos e proteínas de alto peso molecular (CLEMENTE & CHAMBERS, 2000).

5.4 Proteases

De acordo com o sistema internacional de nomenclatura as enzimas proteolíticas, pertencem à subclasse 4 da classe 3 (EC 3.4 Peptídeo hidrolase). Essas enzimas pertencem a um grupo grande e complexo e diferem entre si por suas especificidades pelo substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, perfis de estabilidade e atividade quanto à temperatura e ao pH (BEYNON & BOND, 2001).

Em relação ao mecanismo de hidrólise, as enzimas proteolíticas são classificadas em endopeptidases e exoproteases. As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas das moléculas de proteína até determinado nível, dando origem a peptídeos de cadeia longa. Já as exopeptidases removem sistematicamente aminoácidos da porção N terminal e C terminal das ligações peptídicas terminais, através da hidrólise (CLEMENTE, 2000).

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

A associação de enzimas foi empregada em alguns estudos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, como por exemplo, MORATO et al. (2000), que utilizaram a associação das enzimas tripsina e subtilisina; CARREIRA et al. (2001), que empregaram as enzimas tripsina, subtilisina e pepsina, associadas; LOPES et al. (2005) que associaram papaína e protease do *Aspergillus oryzae* e SOARES et al. (2006) que fizeram as associações papaína/protease do *Aspergillus oryzae* e pepsina/protease do *Aspergillus oryzae*.

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

Existem também certas desvantagens no uso das enzimas proteolíticas. Entre elas pode-se citar sua instabilidade ou alteração da atividade sob certas condições de pH, temperatura e concentração de substrato, além da difícil recuperação após o uso (DINIZ & MARTIN, 1999).

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

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

5.5 Algumas Proteases comerciais

Existem no mercado diversas proteases, apresentadas, geralmente como misturas de enzimas, sendo vendidas na forma líquida ou em pó. A comercialização dessas enzimas, com o intuito de utilização no processamento de alimentos, apresenta como pré-requisito a aprovação por organismos internacionais (FAO/WHO e FCC-Food Chemical Codex) e, no Brasil, pela ANVISA (BRASIL, 2005). Essas enzimas são provenientes de microrganismos ou vegetais, e diferem entre si por suas especificidades pelo substrato, sítio ativo e mecanismo catalítico, perfis de estabilidade e atividade quanto à temperatura e ao pH (BEYNON & BOND, 2001). Algumas características das proteases comerciais que foram utilizadas no presente trabalho, estão apresentadas abaixo.

5.5.1 Protezyn L

A Protezyn L é produzida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil), obtida de cepas do *Bacillus subtilis*, classificada como endopeptidase. Segundo a Prozyn, esta enzima apresenta estabilidade de atuação na faixa de pH de 8 a 12 e temperatura ótima de atuação de 50 a 60°C. É comercializada na forma de um líquido marrom, com cheiro característico, com densidade de 1,05 a 1,15 g/mL.

5.5.2 Corolase LAP

Segundo dados do fabricante (AB ENZYMES, Barueri, SP, Brasil), a Corolase[®] LAP é um preparado enzimático proteolítico, contendo exclusivamente atividade de exopeptidase. Esta enzima é um produto derivado do *Aspergillus sojae* (EC 3.4.11.1), e classifica-se no grupo das metalo-proteases, apresentando um íon metálico no seu centro ativo, o qual participa do mecanismo catalítico.

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

5.5.3 Protemax N200

A Protemax[®] N200 (Prozyn; São Paulo, SP, Brasil), de origem microbiana derivada de cepas *Bacillus subtilis*, apresenta como característica a capacidade de hidrolisar diferentes fontes protéicas em peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos.

Segundo a Prozyn, esta enzima é classificada como uma subtilisina (EC 3.4.21.62), sendo uma serino-protease, portanto uma endopeptidase, que exibe atividade catalítica na faixa de pH de 7 a 10. Todas as endopeptidases apresentam em comum ácido aspártico, histidina e serina no sítio ativo (BEYNON & BOND, 2001).

Os benefícios desta protease estão relacionados com a alta velocidade e especificidade para degradar proteínas, além de possuir alta solubilidade. O produto é comercializado sob a forma de um pó fino, de cor branca e totalmente solúvel em água (PROZYN, 2005).

5.5.4 Corolase L10

A Corolase[®] L10 é um preparado enzimático obtido a partir da *Papaya carica*, produzido pela AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil), sendo, portanto, uma papaína. Possibilita uma hidrólise protéica de alta eficiência e baixo custo. Possui ampla faixa de pH de atuação (3<pH<9), adaptando-se aos mais diversos processos. Apresenta estabilidade em temperaturas de 60 a 80°C e sua inibição ocorre na presença de agentes sulfidrílicos.

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

5.5.5 Protemax N411

A Protemax N411 é uma neutrase, produzida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil), oriunda do *Bacillus amyloquefaciens*. De acordo com as especificações técnicas da Prozyn, a Protemax N411 apresenta atuação em ampla faixa de pH (4,5 a 7,5), e sua temperatura ótima de ação é de 55°C. É comercializada na forma líquida, apresentando densidade de 1,28 g/mL.

5.5.6 Corolase PP

Corolase[®] PP é um preparado enzimático proteolítico, obtido de pâncreas suíno, composto por várias enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina, amino e carboxipeptidase). De acordo com seu fabricante, a AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil), o produto é comercializado sob a forma sólida, apresenta coloração bege e cheiro característico. As proteases pancreáticas são divididas em serino-proteases (tripsina e quimiotripsina) e metalo-proteases (carboxipeptidases A e B) (HINSBERGER & SANDHU, 2004).

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

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

5.5.7 Corolase TS

A Corolase[®] TS, derivada de *Bacillus stearothermophilus*, é um preparado enzimático proteolítico que possui atividade exclusiva de endopeptidase. Segundo seu fabricante, a AB ENZYMES (Barueri, SP, Brasil), a Corolase TS apresenta melhor desempenho em valores de pH neutro a ligeiramente alcalino, com pH ótimo igual a 8,0. Além disso, apresenta excelente estabilidade térmica, podendo ser utilizada em reações com elevada temperatura. É comercializada sob a forma líquida, apresentando coloração

marrom clara e cheiro característico, com densidade igual a 1,15 g/mL (AB ENZYMES, 2002).

5.5.8 Flavourzyme

A Flavourzyme é uma enzima mista, ou seja, atua como endo e exopeptidase, sendo obtida a partir de cepas do *Aspegillus oryzae*. Apresenta estabilidade na faixa de pH de 5 a 7, e temperatura ótima de atuação de 55°C. É comercializada na forma líquida, apresentando coloração marrom escuro, cheiro característico e densidade de 1,18 g/mL.

6. REMOÇÃO DA FENILALANINA

6.1 Métodos de remoção

Diversos métodos foram desenvolvidos para remover a fenilalanina de proteínas hidrolisadas (MIRA e MARQUEZ, 2000).

De acordo com SHIMAMURA et al. (1999) os métodos utilizados para a remoção da Phe, baseiam-se na liberação deste aminoácido por tratamento químico ou enzimático, sendo posteriormente removido por processos diferenciados.

Em alguns trabalhos foram produzidos peptídeos com baixo teor de Phe em escala laboratorial, outros ainda em escala piloto. A remoção da Phe foi realizada segundo técnicas e procedimentos diferenciados, como: uso de carvão ativado, peneira molecular, cromatografia de troca iônica, biorreator com células imobilizadas de *Rhodotorula glutinis*, ou por filme de membrana líquida (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991).

A enzima fenilalanina amônio-liase é capaz de reduzir os níveis de Phe plasmáticos através da desaminação da fenilalanina a ácido cinâmico e amônia, que podem ser excretados na urina. Entretanto, a utilização desta enzima para a obtenção de produtos

alimentícios isentos de fenilalanina ainda é desconhecida (MACDONALD & D’CUNHA, 2007).

MOSZCZYNSKI & IDIZIAK (1993) avaliaram a eficiência da remoção da fenilalanina através dos seguintes métodos: uso de carvão ativado, resinas de troca iônica e exclusão molecular. Esses autores obtiveram uma maior remoção da fenilalanina através do uso do carvão ativado (90% de Phe removida), de hidrolisados de caseína, os quais foram preparados utilizando a associação das enzimas quimiotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase.

Em estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, o carvão ativado foi utilizado com eficiência na remoção de Phe (valores superiores a 90%) de diversas fontes protéicas, tais como leite (SOARES et al, 2006; LOPES et al, 2007), soro de leite (DELVIVO et al, 2006; SILVA et al, 2007), arroz em grãos (LOPES et al, 2008), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2008) e feijão (LOPES Jr., 2008). Uma resina de adsorção foi, igualmente, utilizada por este mesmo grupo de pesquisa na remoção de Phe de soro de leite, tendo levado a resultados inferiores (95%) aos obtidos com o emprego do carvão ativado (99%) (LOPES et al., 2007).

6.2 Avaliação da eficiência da remoção

A avaliação da eficiência da remoção de Phe é realizada pela sua quantificação na matéria-prima, assim como em suas proteínas hidrolisadas, após emprego de um meio adsorvente.

Vários métodos são descritos na literatura para a quantificação de Phe, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa (ZEZZA et al., 1992), HPLC de troca iônica (FANG et al., 1992) e sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999)

Outro método cromatográfico foi desenvolvido no laboratório do presente trabalho, baseado na cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), que permitiu a determinação, não apenas da Phe, mas dos demais aminoácidos essenciais (CARREIRA et al., 2002).

A espectrofotometria derivada segunda (EDS) representa uma outra alternativa reportada na literatura para a quantificação de Phe, pois trata-se uma técnica analítica

simples, rápida e de custo relativamente baixo, tendo sido considerada, por vários autores como um método quantitativo e qualitativo vantajoso, de grande utilidade. Baseia-se na derivação do espectro de absorção normal dos compostos analisados, originando picos negativos sendo que os correspondentes à fenilalanina vão de 250 a 280 nm, do triptofano de 285 a 295 e da tirosina de 300 a 310 (O'HARVER, 1979; RAGONE et al., 1984; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988).

Vários autores utilizaram esta técnica. Assim, ICHIKAWA & TERADA (1977, 1979, 1981) relataram a eficiência da EDS para medir Phe em proteínas ou em proteínas hidrolisadas. Estes autores, primeiramente, examinaram resíduos de Phe em proteínas e demonstraram que entre 245 e 270 nm os resíduos de aminoácidos de tirosina e triptofano não causam diferença significativa nas propriedades da Phe. Dois anos mais tarde, determinaram a Phe, por este método, em proteínas desnaturadas, encontrando resultados que concordavam com os descritos na literatura. Vários autores têm relatado a grande confiabilidade do uso da EDS, entre 245 e 270 nm para quantificar os resíduos de Phe em proteínas, desde que as variáveis como o pH e a adição de outras substâncias sejam controladas (BRANDTS & KAPLAN, 1973; O'HAVER, 1979; MATSUSHIMA et al., 1975; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; ICHIKAWA & TERADA, 1981a,b; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988).

Em estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, a EDS foi utilizada para a quantificação de Phe em várias fontes protéicas, tais como leite em pó (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), soro de leite (LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007), arroz em grão (LOPES et al., 2008), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009) e feijão (LOPES Jr., 2008).

7 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

A caracterização do hidrolisado protéico apresenta, normalmente, um dos seguintes objetivos: determinação do grau de hidrólise; avaliação da distribuição dos peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia; identificação de peptídeos bioativos; determinação da especificidade de novas endoproteases; verificação e localização de modificações

químicas na estrutura primária dos peptídeos, nomeadamente, alterações nas cadeias laterais de alguns aminoácidos e glicação dos aminoácidos por açúcares redutores (LÉONII et al., 2000).

Neste trabalho, a caracterização dos hidrolisados protéicos envolveu, apenas, dois dos objetivos citados acima, ou seja, a determinação do grau de hidrólise e a distribuição dos peptídeos; de acordo com o tamanho da cadeia. Portanto, abaixo, estão descritos os métodos utilizados para a avaliação destes dois parâmetros.

7.1 Grau de Hidrólise

Para o acompanhamento e controle da hidrólise de proteínas, é necessária a avaliação do grau de hidrólise (GH), que se define como o percentual de rompimento das ligações peptídicas de uma proteína, podendo ser expresso através da razão:

$$\%GH = \frac{\text{nitrogênio } \alpha\text{-aminado (NA)}}{\text{nitrogênio total (NT)}} \times 100$$

sendo:

-GH= percentual de grau de hidrólise.

-NA=nitrogênio α -aminado (correspondente às ligações peptídicas clivadas da proteína).

-NT=nitrogênio total (considerado o total de ligações peptídicas da proteína).

Os diferentes métodos utilizados para medir o GH baseiam-se, principalmente, em três fundamentos: na determinação do nitrogênio solúvel, após precipitação da proteína com ácido tricloroacético; na determinação de grupos amino livres ou na determinação de prótons liberados após ruptura das ligações peptídicas em determinados valores de pH.

Para a determinação do GH através do nitrogênio solúvel, as técnicas mais utilizadas são: o método de Kjeldhal (AOAC, 1995); a reação de Biureto (Hung et al., 1984) ou através da determinação de peptídeos contendo grupos aromáticos, por meio da técnica da espectrofotometria na região UV. A determinação dos grupos amino livres, pode ser realizada através de sua reação com substâncias químicas, tais como ninidrina,

ácido tricloroacético (TNBS) ou ortofenillaldeído (OPA), e a medida espectrofotométrica dos produtos formados.

O controle da hidrólise enzimática das proteínas em pH alcalino pode ser realizado, de forma sensível e precisa, através da medida do consumo de base, necessária para manter constante o pH na reação de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986). Entretanto, o consumo da quantidade de base não está diretamente relacionado com o grau de hidrólise, sendo necessário o conhecimento de outros parâmetros, como o pK médio dos grupamentos amino liberados na hidrólise (CAMACHO et al., 2001).

A quantificação do grau de hidrólise, através da determinação de grupos amino liberados durante a hidrólise na presença de formol, é relevante, devido à sua eficácia, rapidez e reduzidos custos. O método de SORENSEN (A.O.A.C., 1995), baseado na titulação com formol, determina o grau de hidrólise por meio da relação do nitrogênio α -aminado (sendo considerado o número de ligações peptídicas clivadas pelas proteínas), e o nitrogênio total (considerado o número total de ligações peptídicas) (NILSANG et al., 2005).

7.2 Perfil Peptídico

Diversos métodos têm sido relatados na literatura visando o fracionamento de hidrolisados protéicos. Atualmente, em escala laboratorial, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a caracterização de hidrolisados. Para avaliação da distribuição dos peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, a cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular (SE-HPLC), baseada nas diferenças de volumes hidrodinâmicos das moléculas, tem sido largamente utilizada. A cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC), baseada na diferença da hidrofobicidade, vem sendo, igualmente, empregada na caracterização de hidrolisados protéicos, sendo possível, através do perfil cromatográfico, prever a distribuição dos pesos moleculares dos peptídeos (VAN DER VEN et al. 2002). Esta técnica, ao ser utilizada por LEMIEUX et al., (1991), mostrou ser eficiente para separar peptídeos de hidrolisados protéicos de caseína obtidos pela ação da tripsina e quimiotripsina, além de fornecer algumas informações sobre a sua hidrofobicidade ou hidrofiliicidade. A cromatografia de troca iônica (IE-HPLC), baseada na separação de cargas das moléculas, ou aquela fundamentada na afinidade

específica por determinados ligantes (LE-HPLC), é outro método que, também, tem sido utilizado para analisar os hidrolisados protéicos (VAN DER VEN et al. 2002).

A combinação de SE-HPLC e AE-HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica) mostrou grande sucesso na separação de peptídeos fosforilados e desfosforilados no hidrolisado de caseína, além da identificação de mais de 200 destes compostos (LEMIEUX & PIOT, 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 lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000Daltons.

A espectrofotometria derivada segunda (EDS) foi empregada por SILVESTRE et al. (1993) para analisar hidrolisados de caseína. Com este método, os autores estimaram o grau de hidrólise e a homogeneidade do hidrolisado (presença de hidrolisado protéico ou mistura de aminoácidos). Essa técnica já foi empregada, no mesmo laboratório onde foi realizado o presente projeto, para a avaliação do grau de encapsulação de hidrolisados enzimáticos de caseína (MORAIS et al., 2004), como também para a determinação de aminoácidos aromáticos de hidrolisados enzimáticos de leite em pó (SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2005), de soro de leite (SILVA et al., 2007; DE MARCO et al. 2005) e de arroz (BIZZOTTO et al., 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Estas referências bibliográficas incluem as citadas na Introdução e na Revisão de Literatura.

- ACOSTA, P.B. Nutrient intake and grow of infants with phenylketonuria undergoing therapy. *J. Ped. Gastr. Nutr.* n.27, p.287-291, 1998.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S. Protocolo 1 – Phenylketonuria (PKU). In:ROSS PRODUCTS DIVISION. Abbott Laboratories. The ross metabolic formula system: nutrition support protocol. 3rded. Columbia: Keziaz Strvat, 1997.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AGUADO, C.; PÉREZ, B.; GARCÍA, M.J.; BÉLANGER-QUITANA, A.; MARTÍNEZ-PARDO, M.; UGARTE, M.; DESVIAT, L.R. BH4 responsiveness associated to a PKU mutation with decreased binding affinity for the cofactor. *Clinica Chimica Acta* 380 8-12, 2007.
- AGUIAR, M.J.B. Experiências dos programas de triagem neonatal. In:XIV Congresso Brasileiro de Genética Clínica, 5, 2002, Ribeirão Preto(SP). Anais, SBGC, Ribeirão Preto (SP) p.16.
- ALAIZ, M.; NAVARRO, J.L.; GIRON, J.; VIOQUE, E. Amino acids analysis by high-performance liquid chromatograph after derivatization with diethyl ethoxymethylenervanolate. *J. Chromatogr.*, v.591, n.1, p.181-186, 1992.
- AUBES-DUFAU, I. SERIS, J.L.; COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates betterness demonstration and charactrization. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C. v. 43, 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. 4, p.1891-1900, 2004.
- BEYNON, R.; BOND, J.S. Proteolytic Enzymes. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 340 p.
- 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.
- 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.
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pré-column derivatization. *J. Chromatogr.*, Amsterdan, v.336, n.1, p.93-104, 1984.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluation of functional properties of a blood protein. *J. Nutr.*, v.4, n.1, p.11-16, 2005.
- BIZZOTTO, C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Uso da pancreatina e do carvão ativado no preparo de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. *Rev. Tecno-Lóg.*, v.10, n.1, p.9-30, 2006a.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de

- fenilalanina, obtidos pela ação da corolase PP e uso do carvão ativado. *Cienc. Agrotec.*, v.30, n.2, p.308-316, 2006b.
- BOUNOUS, G.; GOULD, P. The biological-activity of undenatured dietary whey proteins-role of glutathione. *Clinical and investigative medicine* 14(4): 296-309, 1991.
- 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.
- BRANDTS, J.F.; KAPLAN, L.J. Derivate spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem.*, v.12, n.10, p.2011-2024, 1973.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº. 93, de 21 de dezembro de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 22/12/2005. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 05/03/2007.
- 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.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivative analysis of UV/visible spectra. *American laboratory*, v. 12, p. 101-112, 1980.
- CAMACHO, F.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; PÁEZ-DUENÑAS, M.P.; GUADIX, E.M.; GUADIX, A. Correlation of base consumption with degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *Journal of Dairy Research* 68 p. 251-265, 2001.
- CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998, 207p. (Tese, Doutorado em Engenharia de Alimentos).
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L. ; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *International Journal of Food Engineering*, v. 3, p. 1-19, 2007.
- CARISANO, A. Rapid and sensitive method for the determination of proline by reversed-phase high-performance liquid chromatography with automated pré-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.318, n.1, p.132-138, 1985.
- CARREIRA, R.L.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Otimização na produção de di e tripeptídeos em hidrolisados de caseína pela associação de enzimas: pepsina, tripsina e subtilisina. *Braz. J. Food Technol.*, v.4, p. 103-108, 2001.
- CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.22, n.3, p.229-232, 2002.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; ORNELLAS, C.B.D.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v.23, n.1, p.17-25, 2004.
- 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, 1988.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Food Science & Technology* 11, p. 254-262, 2000.

- CLEMENTE, A.; CHAMBERS, S.J. Development and production of hypoallergenic protein hydrolysates for use in infant formulas. *Food Allergy and Intolerance*, 1, p.175-190, 2000.
- CONSIDINI, T.; PATEL, H.A.; ANEMA, S.G.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments- A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, p.1-23, 2007.
- 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.da.; GONTIJO, J.A.R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal* 17 p. 632-640, 2007.
- CUNNIF, C.; FRIAS, J.L.; KAYE, C.; MOESCHELER, J.B.; PANNY, S.R.; TROTTER, T.L. Maternal Phenylketonuria. *Pediatr.*, v.107, n.2, p. 427-428, 2001.
- DE LA FUENTE MA, HEMAR Y, TAMEHANA M, MUNRO PA, SINGH, H. Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal* 12, p.361-369, 2002.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v.8, n.3, p.210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *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, 430p.
- 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.
- FANG, F.W.; AGUIAR, M.E.; HEARN, T.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXX. Evaluation of bandwidth behavior of proteins chromatographe on tentacle-type anion exchangers. *J. Chromatogr. A*, v. 599, n. 1-2, p.163-170, 1992.
- FESTE, A.S. Reversed-phase chromatography of phenylthiocarbamyl amino acid derivates of physiological amino acids: an evaluation and a comparison with analysis by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.574, n.1, p.23-24, 1992.
- FITZGERALD, R.J.; MEISEL, H. Lactokinins: Whey protein-derived ACE—inhibitory peptides. *Nahrung*, 43, p.165-167, 1999.
- FREITAS, S.P.; COURI, S.; VIEIRA, C. R.; PONTES, S.M.; CABRAL, L.M.C.; HARTMAN, L. Recuperação e caracterização dos peptídeos da soja resultantes da hidrólise enzimática do grão extrusado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v.3, p.1975-1978.
- 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.
- FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado Protéico de Pescado. *Rev. Ciên. Tecnol.*, v. 10, n 19, p. 79-89, 2002.
- GIOVANNINI, M.; VERDUCI, E.; SALVATICI, E.; FIORI, L.; RIVA, E. Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis* 30, p.145-152, 2007.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M.. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chromatog. A*, v.347, p.219-235, 1985.
- GREVE, L. C.; WHEELER, M. D.; GREEN-BURGESSON, D. K.; ZORN, E. M.. Breast-feeding in the management of the newborn with phenylketonuria: A practical approach to dietary therapy. *Journal of the American Dietetic Association* v.94 p.305-309, 1994.
- GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41:1; 79-89, 2000.
- GUAUTHIER, S. F.; VACHON, C.; SAVOIE, L. Enzymatic conditions of an in vitro method to study protein digestion. *J. Food Sci.*, p.960-964, 1986.
- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v.5, n.6, p.559-571, 1992.
- HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr.*, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- HEATHCOTE, J.G.; HAWORTH, C. An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose. *J. Chromatogr.*, v.43, n.1, p. 84-92, 1969.
- HENDRIKSZ, C.J.; WALTER, J.H. Update on phenylketonuria. *Current Paediatrics* 14, p. 400-406, 2004.
- HINSBERGER, A. & SANDHU, B.K. Digestion and absorption *Cur. Paed.*, v. 14, p. 605-611, 2004.
- HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. *Int. Dairy J.* 11, 495-503, 2001.
- HUFFMAN, L.M.; HARPER, W.J. Maximizing the value of milk through separation technologies. *J. Dairy Sci*, 82:2238-2244, 1999.
- IDOLO-IMAFIDON, G.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A.M. Isolation ,purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, p.663-689, 1997.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivate spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 494, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 671, p. 33-37, 1981.
- JOVANOVIC, S.; BARAC, M.; MACEJ, O. Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljedarstvo* 55, p. 215-233, 2005.

- KARLESKIND, D.; LAYE, I.; MEI, F.I.; MORR, C.V. Chemical pretreatment and microfiltration for making delipidized whey protein concentrate. *J. Food Sci.* 60, p. 221-226, 1995.
- KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr Res.*, v.33, p. 343-347, 1989.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients, *Proc. Biochem.* p.149-157, 1985.
- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low-phenylalanine peptide. *Enz.* v. 38, p. 321-327, 1987
- KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPALA, A.; RANTAMAKI, P.; TUPASELA, T. The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agric. Food Sci. Finland* 7: 283-296, 1998.
- LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol* , 48 (10), p. 68-71, 1994.
- LAMAS, E.M.; BARROS, R.M.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* an immobilized onto highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology.* vol. 28: 642-652, 2001.
- LECTURE, M.R.A. Nutricional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci* 81:597-608, 1998.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J. M. Efficiency of five chromatographic systems for separation of casein digest. *J. Liquid Chromatogr.*, v.13, n. 20, p. 4023-4035, 1990.
- 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.
- LÉONIL J.; GAGNAIRE V.; MOLLÉ D.; PEZENNEC S.; BOUHALLAB S. Application of cromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *Journal of Chromatography A* 881:1-2, 2000.
- LEWIS M.J. Pressure-activated membrane processes. In: Grandison AS, Lewis MJ(eds) *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries - Principles and Applications.* Woodhead Publishing Limited, Cambridge, p. 65-96, 1996.
- 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)*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. . *British Food Journal, Inglaterra*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.*, v.107, n.1, p.42-53, 2005a.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Techol.*, v.38, n.5, p. 447-453, 2005b.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb ; STARLING, A. L. P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *Journal of Food Technology (Faisalabad)*, v. 5, p. 191-197, 2007.
- LOPES-JR, C. O. Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. p.81 (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 938-942, 1991.
- MACDONALD, A.; HARRIS, G.; RYLANCE, G.; ASPLIN, D.; BOOTH, I.W. Abnormal feeding behaviours in phenylketonuria. *J Hum Nutr Diet* 10, p. 163-170, 1997.
- MACDONALD, A.; DALY, A.; DAVIES, P.; HALL, S.K.; RYLANCE, G.; CHAKRAPANI, A. Protein substitutes for PKU: What's new? *J. Inherit. Metab. Dis.* 27 (2004) 363-371.
- MACDONALD, M.J.; D'CUNHA, G.B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* 85, p. 273-282, 2007.
- MACDONALD, A.; FERGUSON, C.; RYLANCE, G.; MORRIS, A.A.M.; ASPLIN, D.; HALL, S.K.; BOOTH, I.W. Are tablets a practical source of protein substitute in phenylketonuria? *Arch Dis Child*, 88, p.327-329, 2003.
- MARCO, D.; WAITZBERG, D.L. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: WAITZBERG, D.L. (Ed.) *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 499-464.
- MARTINS, A. M.; FISBERG, R. M.; SCHMIDT, B. J. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica NESTLÉ, São Paulo, n.54, 1993.
- MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA, K. Derivate absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal. Biochem.*, v.65, n.3, p.362-368, 1975.
- MCINTOSH G.H; ROYLE P.J; LE LEU R. K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey protein as a functional food ingredients? *International Dairy Journal* 8, p.425-434, 1998.
- MICLO, L., PERRIN, E.; DRIOU, A.; MELLET, M.; LINDEN, G. Determination of the ratios of the aromatic amino acids residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides. *Int. J. Pep. Prot. Res. Haguenau*, v. 46, n.2, p.186-192, 1995.
- MIRA, N.V.M. e MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pub.* v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr., Campinas*, 19 (3): 381-387, maio/jun., 2006.
- MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; LOPES, D.C.F.; OLVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.52, n.1, p.77-83, 2002.
- MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S ; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. *J. Food Biochem.*, v.28, n.1, p.21-42, 2004.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v.34, n.1, p.59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. Anal.*, v.13, n.5, p.843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochem. Microbiol.*, v.29, n.3, p. 302-306, 1993.
- NEVES, R.A.M.; MIRA, N.V.M. de; MARQUEZ, U.M.L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Ciên. Tecnol. Aliment.*, Campinas, p. 101-108, 2004.
- NILSANG, S.; SITTIWAT, L.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*. 571-578, 2005.

- O'FLYNN, M. E.; HOLTZMAN, N. A.; BLASKOVICF, M.; AZEN, C.; WILLIAMSON, M. L. Diagnosis of phenylketonuria. *Am. J. D. is Child*, n.134, p.769-774, 1980.
- O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength.-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, p. 1548-1553, 1979.
- OTANI, H.; DONG, X.Y.; HOSONO, A. Preparation of low-inmunogenic peptide fragments from milk casein. *Milchwissenschaft.*, 45, p.217-220, 1990.
- PINTADO, M.E.; PINTADO, A.E.; MALCATA, F.X. Controlled whey protein hydrolysis using two alternative proteases *J. Food. Engin.*, v. 42, p. 1-13, 1999.
- POPOVIĆ-VRANJEŠ, A. and VUJIČIĆ, I. Tehnologija surutke. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1997.
- RAGONE, R.; COLONNA, G.; BALESTRIERI, C.; SEVILLO, L.; IRACE, G. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy. *Biochem.*, 1984.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 1975, 573 p.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, p. 753-761, 1988.
- 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.
- SANTOS, M.F.; SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H. Hidrolisado enzimático para dietoterapia de fenilcetonúricos. *Biotechnol. Ciên. Desenv.*, v. 29, p.152-157, 2003.
- SARKISSIAN, C.N.; GÁMEZ, A. Phenylalanine ammonia-lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Molecular Genetics and Metabolism* 86 , p.22-26, 2005.
- 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.
- SMITHER, .W.; BALLARD, F.J.; COPELAND, A.D.; DE SILVA, K.J. DIONYSIUS, D.A.; FRANCIS, G.L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P.A.; MCINTOSH, G.H.; MITCHELL, I.R.; PEARCE, R.J.; REGESTER, G.O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 1996.
- SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. The hyperphenylalaninemias. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE D. (Ed). *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. p. 1015 - 1075, 1997.
- 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, no.4, p. 397-409, 2004.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA,N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M.. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Sci. Technol.*, v. 37, n.7, p. 709-718, 2003.
- SILVA, V.D.M.; 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.

- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; STARLING, A. L. P. ; SILVESTRE, M. P. C. . Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *American Journal of Food Technology*, v. 2, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M.P.C.; DAUPHIN, D.; HAMON, M. Application Of UV absorbance and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta*, v.82, n.3, p.603-612, 1993.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hidrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates.2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994b.
- SILVESTRE, M.P.C.; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R.; SILVA, M.C.; LOPES JR, C.O.; SILVA, V.D.M. Use of enzymatic process for extracting and hydrolyzing rice proteins aiming at phenylalanine removal. *International Journal of Food Engineering*. v. 5, 2009.
- 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. *Bioresource Technology* , 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.
- SOARES, R.D.L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M. P. C. . Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnology*, v. 21, p. 45-56, 2007.
- SPRONSEN, F.J.V.; RIJN, M.V.; BELCHOF, J.; KOCH, R.; SMIT, G.A. Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *Am J. Clin Nutr* , 2001.
- STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. *Rev. Méd.de Minas Gerais*, v.9, n.3, 106-110, 1999.
- STEGINK, L.D.; FINDER, L.J.; BRUMMEL, M.C.J.; BAKER, G.L.; KRAUSE, W.L.; BELL, E.F.; et al. Plasma amino acid concentrations and amino acid rations in normal adults and adults heterozygous for phenylketonuria ingesting a hamburger and mild shake meal. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:670-5.
- TAKADA, Y.; MATSUYAMA, H.; KATO, K.; KOBAYASHI, N.; YAMAMURA, J.; YAHIRO, M., et al. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. *Nutrition Research*, 17, p. 1709-1720, 1997.
- TESMER, E.; VETTER, M.; RAFFLER, G.; SCHWEIKHARDT, F. Process of making phenylalanine-free food for infants and small children. *Milupa GmbH & Co. KG, Friedrichsdorf, Germany*, Patents US 1996000682627, A23L 1/305, A23L 1/304; 09/10/1996; 07/04/1998.
- 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).

- TRAHMS, C. M. Cuidado nutricional nos distúrbios metabólicos. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. *Alimentos nutrição e dietoterapia*. 9. ed. São Paulo: Roca, p.921-946,1998.
- 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. *International Dairy Journal*, 12, p. 813-820, 2002.
- VENDRELL, J.; AVÉLES, F. Complete amino acids analysis of proteins by dansyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr., Amsterdam*, v. 358, n.3, p.401-413, 1986.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, p. 5680-5687, 2003.
- VOJDANI, F.; WHITAKER, J.R. Chemical and enzymatic modification of proteins for improved functionality. In: HETTIARACHCHY, N.S.; ZIEGLER, G.R. (Ed). *Functionality in food systems*. New York: Marcel Dekker, 1994, p.261-309.
- WAISBREN, S.E.; NOEL, K.; FAHRBACH, K.; CELLA, C.; FRAME, D.; DORENBAUM, A.; LEVY, HARVEY. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: A systematic literature review and meta-analysis. *Mol. Genet. Metab.* , 2007.
- 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. *Food Science and Nutrition*, 42, p. 353-375, 2002.
- WAITZBERG D L. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática clínica*. São Paulo: Editora Atheneu. 2000.
- WYNGAARDEN, J. B.; SMITH JR., L.H. *Tratado de Medicina Interna*. 16. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984. v 1. 1338 p.
- WHITHADER, J.R. *Principles of enzymology for the food science*. 2 ed. California: Marcel Dekker, 1994, 625p.
- ZEZZA, F.; KERNER, J.; PASCALE, M.R.; GIANNINI, R.; R.; MARTELLI, E.A. Rapid determination of amino acids by high-performance liquid chromatography; release of amino acids by perfused rat liver. *J. Chromatography*, v.593, n.2, p.99-101, 1992.

TRABALHO EXPERIMENTAL

1 APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho está apresentada na forma de fluxograma, nas Figuras 1 e 2. Os resultados foram divididos em dois capítulos e redigidos sob a forma de artigos científicos.

O primeiro capítulo refere-se à obtenção de hidrolisados protéicos a partir do concentrado protéico do soro do leite (WPC), com baixo teor de fenilalanina. Inicialmente, foi realizada a determinação da composição centesimal do WPC. A partir disso, foram preparados, enzimaticamente, hidrolisados protéicos, sob diversas condições de reação. As variáveis empregadas foram: tipo de enzima, relação E:S, concentração da matéria-prima e tempo de hidrólise. Utilizou-se o carvão ativado (CA) para remoção da fenilalanina dos hidrolisados protéicos, e a eficiência da remoção foi avaliada pela espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor de fenilalanina livre na matéria-prima inicial e nos hidrolisados do WPC após tratamento com o CA.

O segundo capítulo refere-se à caracterização dos hidrolisados protéicos do WPC quanto ao grau de hidrólise e perfil peptídico, tendo sido avaliado o efeito dos seguintes parâmetros: tipo de enzima, relação enzima:substrato e concentração da matéria-prima. O grau de hidrólise foi determinado por meio da relação entre os teores de nitrogênio α -aminado e total. A análise do perfil peptídico envolveu o 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. Além disso, foi verificada a existência de correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico utilizando-se o coeficiente de correlação de *Pearson*.

Capítulo I

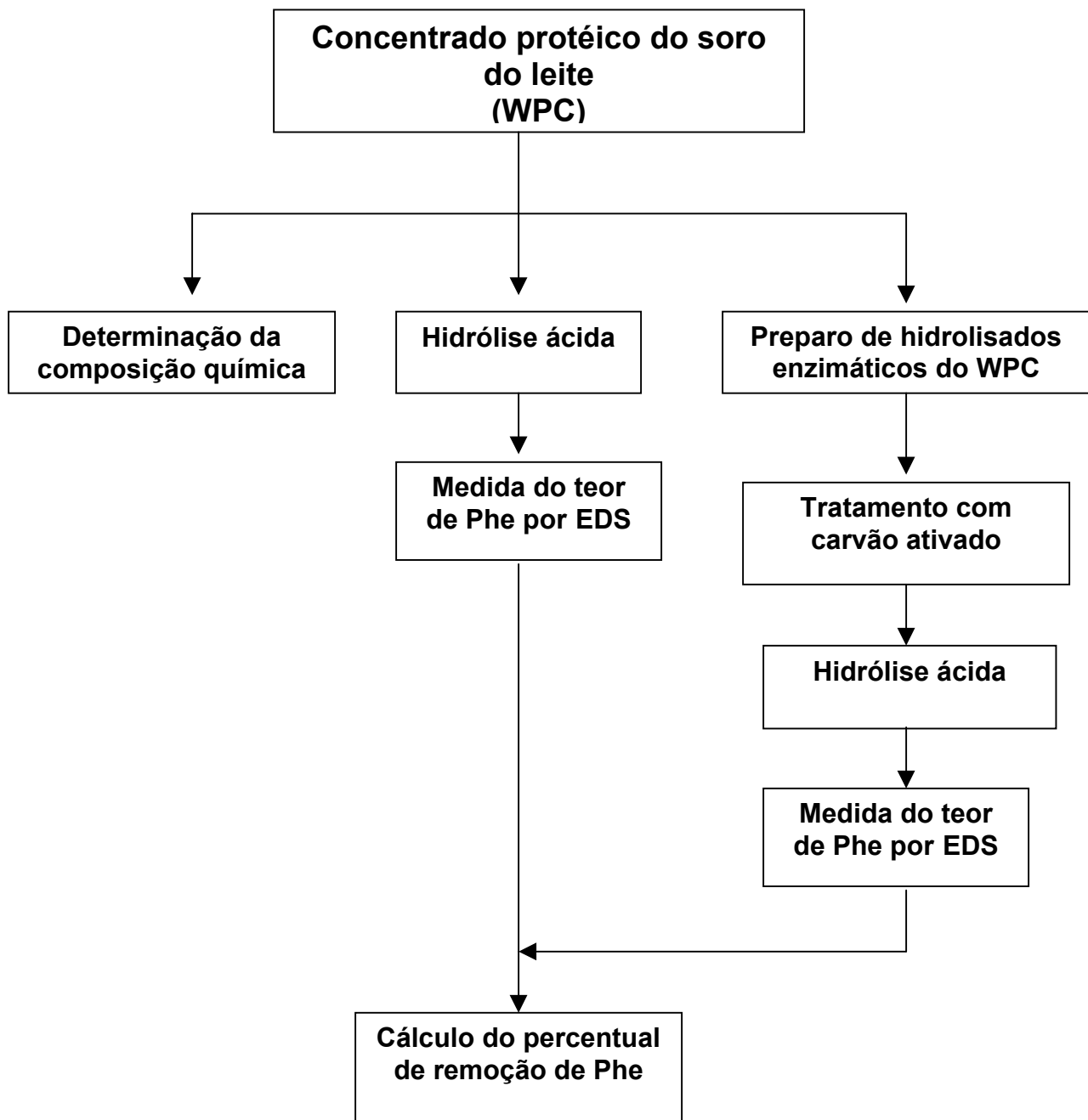
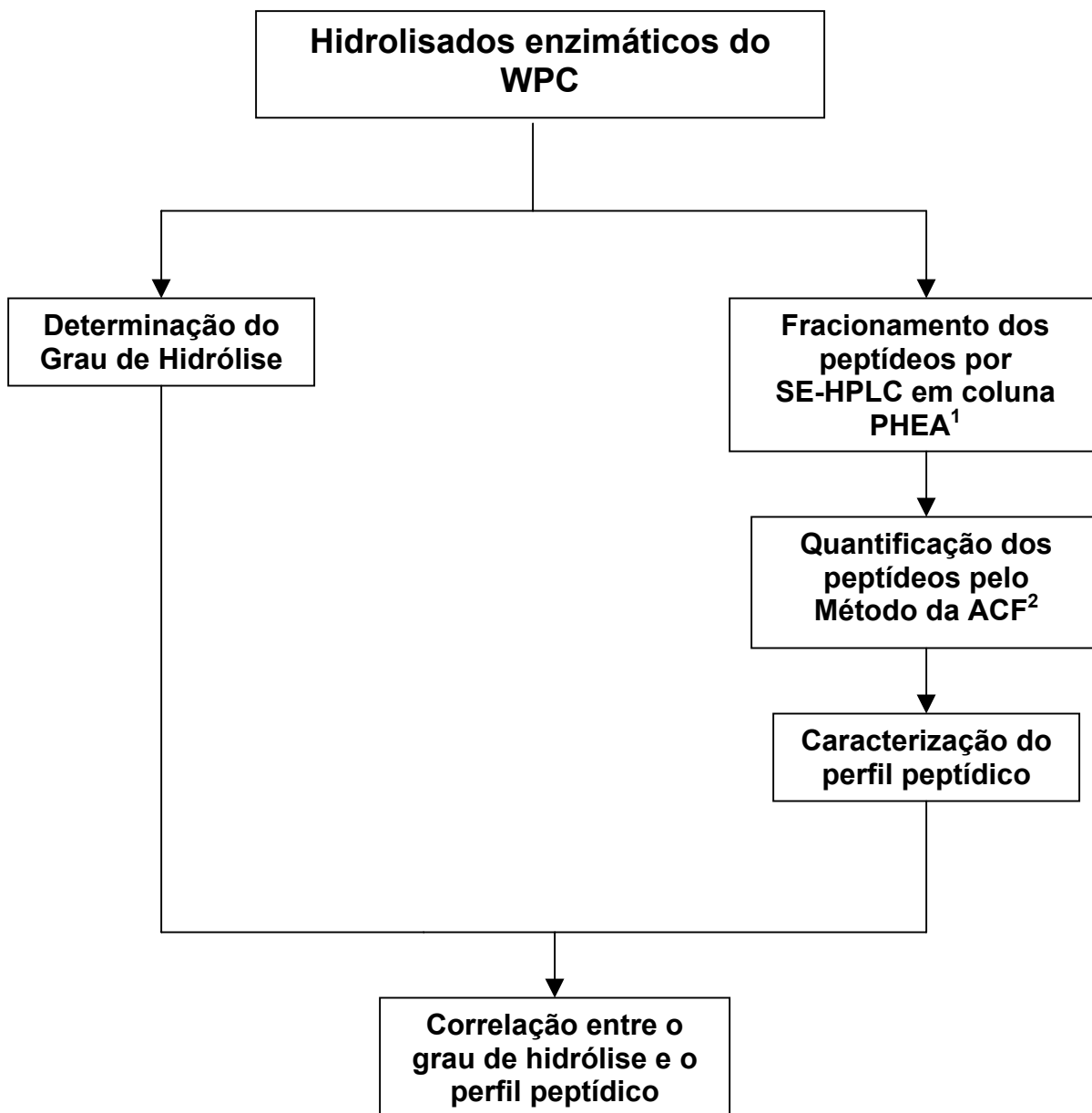


Figura 2 - Principais etapas do trabalho experimental do Capítulo I.

Capítulo II



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 3 - Principais etapas do trabalho experimental do Capítulo II

Capítulo I

OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTEICO DO SORO DE LEITE COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados enzimáticos a partir do concentrado protéico do soro do leite (WPC), servindo como alimento ou ingrediente alimentar na dieta de fenilcetonúricos. Foram preparados 17 hidrolisados enzimáticos, avaliando-se o efeito de alguns parâmetros, como tipo de enzima, relação enzima:substrato (E:S), concentração da matéria-prima e tempo de hidrólise. O carvão ativado foi utilizado como meio adsorvente, e mostrou-se eficaz na remoção da Phe, obtendo-se percentuais acima de 70%. O melhor resultado foi encontrado utilizando-se a pancreatina na relação E:S de 1:100, com a concentração da matéria prima de 10% (p/v) após 5 horas de hidrólise, tendo atingido 81,3% de remoção e o teor final de Phe de 394,1 mg/100g de hidrolisado.

Palavras-chave: Concentrado protéico do soro do leite; hidrólise enzimática; fenilalanina; fenilcetonúria.

ABSTRACT

PREPARATION OF WHEY PROTEIN CONCENTRATE HYDROLYSATES WITH LOW PHENYLALANINE CONTENT. The objective of this work was to prepare enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate (WPC) with low phenylalanine (Phe) content, serving as food or ingredient in the phenylketonuric's diet. Seventeen enzymatic hydrolysates were prepared and the effect of some parameters, such as type of enzyme; enzyme:substrate ratio; substrate concentration and time of hydrolyse was evaluated. The activated carbon was used as adsorbent and showed to be efficient for removing Phe, leading to values above 70%. The best results were found using a pancreatin in a E:S ratio of 1:100, a substrate concentration of 10% (w/v) after 5 hours of hydrolysis, obtaining 81.3% of removal and a final Phe content of 394.1 mg/ 100g of hydrolysate.

Key words: Whey protein concentrate; enzymatic hydrolysis; phenylalanine; phenilketonuria.

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética causada pela mutação do gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), ativa no fígado e responsável pela transformação da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr) (STRYER, 1996; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS et al., 1993). A deficiência ou inatividade da PAH resulta no acúmulo da Phe e seus metabólitos no sangue e outros tecidos, acarretando retardo mental, microcefalia, hiperatividade, ou comportamento autista, tremor, falhas de crescimento, convulsões, menor pigmentação da pele e cabelos e odor característico na urina (MIRA & MARQUEZ, 2000).

A incidência da fenilcetonúria é bastante variável, abrangendo números que vão de 1:3.000 nascidos vivos na Turquia até 1:60.000 no Japão. Nos Estados Unidos, a fenilcetonúria atinge aproximadamente uma criança para cada 15.000 nascidas. No Brasil, a prevalência gira em torno de 1:15.000 a 1:20.000 nascidos vivos (BRASIL, 2004).

O tratamento para a PKU consiste, acima de tudo, numa dieta pobre em Phe, que deve ser iniciada o mais precocemente possível e mantida por toda a vida (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS et al., 1993; SHIMAMURA et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000). As necessidades protéicas dos fenilcetonúricos são, geralmente, supridas pelas misturas de aminoácidos livres, isentas de fenilalanina, disponíveis no mercado, podendo ser acrescidas de outros nutrientes. Entretanto, essas misturas possuem odor e paladar desagradáveis, são monótonas, dispendiosas, hiperosmóticas, além de apresentarem elevado custo (MIRA & MARQUEZ, 2000, GUADIX et al., 2000).

Dessa forma, os hidrolisados protéicos isentos ou com baixo teor de fenilalanina, constituem boa alternativa para o tratamento dos fenilcetonúricos, pois, apresentam melhor tolerância, sabor e odor agradável e menor osmolaridade (MILUPA, 1995; MIRA & MARQUEZ, 2000).

As formulações especiais descritas na literatura para fenilcetonúricos são elaboradas a partir de fontes protéicas como caseína e concentrado protéico do soro (KITAGAWA et al., 1987; LOPEZ-BAJONERO, et al., 1991). O concentrado protéico do soro de leite (WPC) foi a matéria-prima de escolha do presente trabalho por apresentar

alto teor protéico (34%) e conter proteínas de elevado valor nutricional e biológico (HUFFMAN & HARPER, 1999; BRANS et al., 2004).

O WPC é um produto originado da separação em membranas das proteínas do soro do leite, podendo apresentar de 35 a 80% de proteínas. Diversas 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).

Os métodos utilizados para a remoção da Phe baseiam-se na liberação deste aminoácido por hidrólise química ou enzimática, sendo posteriormente removidos por processos diferenciados, tais como tratamento com carvão ativado ou resina de troca iônica, uso de peneira molecular e cromatografia de troca iônica. A desaminação com a enzima fenilalanina amônio liase também é sugerida. A escolha do método deve sempre considerar a relação custo/eficiência (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993).

O carvão ativado e uma resina de adsorção foram testados, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, tendo sido eficientes na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de fontes diversas e empregando condições de hidrólises variadas (DELVIVO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SILVA, et al., 2007; CAPOBIANGO et al., 2007; LOPES et al., 2008).

A eficiência da remoção de Phe é efetuada por meio de sua quantificação na matéria-prima, assim como em seus hidrolisados protéicos após tratamento por um meio adsorvente. Para quantificar o teor de Phe em proteínas ou em hidrolisados protéicos, a espectrofotometria derivada segunda (EDS) tem sido utilizada por diversos autores, mostrando ser uma técnica rápida, útil e confiável (O'HARVER, 1979; CAHILL & PADERA, 1980; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988). Esta técnica foi, igualmente, utilizada no mesmo laboratório do presente trabalho para a avaliação da porcentagem de remoção de Phe de hidrolisados de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2005 SOARES et al., 2006), de soro de leite em pó (LOPES, et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO, et al., 2007), de arroz (VIERA, et al., 2008) e de feijão (LOPESJR, 2008).

Diante da necessidade da criação de ingredientes ou produtos alimentares que sirvam, primordialmente, como fonte protéica de alta qualidade para fenilcetonúricos, o presente trabalho apresentou como objetivo a obtenção de hidrolisados protéicos com

baixo teor de fenilalanina, a partir do concentrado protéico do soro do leite. Dessa forma, verificou-se o efeito de diversos parâmetros neste processo, tais como, tipo de enzima; relação enzima:substrato; concentração da matéria-prima e tempo de hidrólise.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O concentrado protéico do soro do leite (*Whey Protein Concentrate* - WPC) na forma de pó (Kerrylac 750) foi gentilmente doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A papaína (Corolase® L10) foi comprada da AB Enzymes (Darmstadt, Alemanha). As demais proteases foram gentilmente doadas pela Prozyn (São Paulo, Brasil) (*B. subtilis* - Protemax N200 e *B. subtilis* - Protezyn L) e pela AB Enzymes (*B. stearothermophilus* - Corolase® TS, pancreatina - Corolase® PP, *A. sojae* - Corolase® LAP; *A. oryzae* - Flavourzyme e *B. amyloquefaciens* - Protemax N411). Algumas características destas enzimas estão apresentadas na Tabela I.1. Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O carvão ativado (granulado n° 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação da composição química da matéria-prima

A composição química do WPC foi determinada segundo os métodos descritos na *Association of Analytical Communities* (AOAC, 1995), sendo todas as análises realizadas em triplicata. O método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP), a 105 °C até peso constante, foi utilizado para a determinação da umidade; o teor de cinzas foi determinado 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, pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína total (NIELSEN, 1998); e o teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteínas, lipídeos totais e cinzas totais.

Tabela I.1 - Características das proteases utilizadas para o preparo dos hidrolisados protéicos.

Grupo	Nome comercial	Origem	Atividade enzimática ⁵ U/mL	Estabilidade	
				pH	T (°C)
Metalo protease Serino e Metalo protease Cisteíno Protease	Corolase® TS ²	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	44,13	7<pH<8	60<T<80
Metalo protease Cisteíno Protease	Corolase® PP ²	Pancreatina	34,71	7<pH<9	45<T<55
Metalo protease	Corolase® L10 ²	<i>Carica papaya</i>	31,56	3<pH<9	50<T<70
Metalo protease	Corolase® LAP ²	<i>Aspergillus sojae</i>	63,19	3<pH<9	50<T<70
Metalo protease Serino protease	Flavourzyme® ¹	<i>Aspergillus oryzae</i>	512,43	6<pH<9	50<T<70
Serino protease	Protemax N411 ¹	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	53,00	7<pH<7,5	55
Serino protease	Protemax ® N200 ¹	<i>Bacillus subtilis</i>	20,19	4,5<pH<7	50<T<55
Serino protease	Protezyne® L ¹	<i>Bacillus subtilis</i>	29,83	9	55

Fonte: ¹PROZYN (2005); ^{2,3,4}AB ENZYME (2001, 2002, 2003); ⁵Valor determinado no presente trabalho de acordo com a metodologia descrita por DIAS et al., 2008.

2.2.2 Preparo dos hidrolisados protéicos

Foram preparados 17 hidrolisados enzimáticos a partir de soluções do WPC, variando-se os seguintes parâmetros: tipo de enzima, relação enzima:substrato (E:S), concentração da matéria-prima (p/v) e tempo de hidrólise (Tabela I.2). A relação proteína: carvão ativado (CA) utilizada foi de 1:88.

¹PROZYN. Especificações técnicas de enzimas. s.n., 2005. 2p;

²AB ENZYMES. Corolase® PP, Corolase® 7089, Corolase® LAP, Corolase® N: *Description and Specification*. Rev. Nr. 02. 2001, 8p;

³AB ENZYMES. Corolase® TS: *Description and Specification*. Rev. Nr. 00. 2002, 2p;

⁴AB ENZYMES. Corolase® L10: *Description and Specification*. Rev. Nr. 03. 2003, 2p.

⁵CALIK et al., (2002). *Enzyme and Microbial Technol.*, 31, pp. 685-697; KUMAR, C.G. (2002). *Letters in Applied Microbiology*, 34, pp. 13-17.

Para a obtenção dos hidrolisados, 100 mL de solução do WPC a 10% (p/v) foram inicialmente colocados em um erlenmeyer e o pH foi ajustado a um valor compreendido na faixa ótima apresentada nas fichas técnicas de cada enzima, disponibilizadas pelos fornecedores. Em seguida, a temperatura foi estabilizada, também de acordo com as especificações técnicas dos fornecedores, e as enzimas adicionadas em quantidade suficiente para se obter a relação E:S desejada. Ao final da reação, o processo foi interrompido por aquecimento em banho-maria a 75°C, por 15 segundos, a fim de inativar a enzima, o que foi confirmado pela medida da atividade enzimática, antes e após o tratamento enzimático, pelo método descrito por DIAS et al., 2008, porém sem adição de caseína.

2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos do WPC pela utilização do carvão ativado como meio adsorvente. Foi empregado o procedimento de passagem por coluna, desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho (SOARES et al., 2006). O CA foi hidratado com água destilada por 10 min sob agitação constante e, em seguida, colocado em seringa descartável de 10 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. A coluna de carvão ativado foi montada colocando-se embaixo o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por cima o de maior granulometria. Em seqüência, os hidrolisados foram passados pela coluna, em quantidade suficiente para atingir a relação proteína:CA desejada, e submetidos à pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE 11778, São Paulo, SP, Brasil), tendo sido recolhidos os eluatos.

2.2.4 Efeito de alguns parâmetros sobre o preparo dos hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina

Os parâmetros estudados estão citados na Tabela I.2. O efeito do tipo de enzima foi testado empregando-se seis diferentes proteases de microrganismos, uma pancreatina e uma papaína. Para o estudo da influência da relação enzima:substrato foram utilizadas as relações de 1:100, 2:100 e 4:100. O efeito da concentração da matéria-prima foi estudado nos valores de 7%, 8%, 9% e 10% (p/v). Finalmente, estudou-se o efeito do tempo de hidrólise, sendo testados os valores de 1, 2, 3, 4 e 5 horas.

Tabela I.2 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de concentrado protéico do soro do leite (WPC).

Hidrolisados	Enzima	pH (ótimo)	Temperatura (°C)	E:S	WPC (p/v)	Tempo (h)
H1	<i>B.subtilis</i> (Protezyn L)	9	55	1:100	10%	5
H2	<i>A. sojae</i> (Corolase LAP)	9	55	1:100	10%	5
H3	<i>B.subtilis</i> (Protemax N200)	7	55	1:100	10%	5
H4	Papaína (Corolase L10)	7	55	1:100	10%	5
H5	<i>B. amyloquefaciens</i> (Protemax N411)	7	55	1:100	10%	5
H6	<i>A. oryzae</i> (Flavourzyme)	7	50	1:100	10%	5
H7	<i>B. stearothermophilus</i> (Corolase TS)	8	60	1:100	10%	5
H8	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	5
H9	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	2:100	10%	5
H10	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	4:100	10%	5
H11	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	7%	5
H12	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	8%	5
H13	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	9%	5
H14	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	1
H15	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	2
H16	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	3
H17	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%	4

WPC = *Whey Protein Concentrate*; E:S = relação enzima:substrato

2.2.5 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina

A avaliação da eficiência da remoção de Phe foi realizada pela medida do teor de Phe livre, no WPC e em seus hidrolisados, após tratamento com CA, empregando-se a espectrofotometria derivada segunda (LOPES et al., 2005). As amostras foram submetidas a hidrólise ácida (HCl a 5,7 mol/L, 110 °C, 24 h) e, após ajuste do pH para 6,0, com solução de fosfato de sódio dibásico (1 mol/L), foram submetidas às leituras de absorbância na faixa de 250 a 280 nm. Foram traçados os espectros de derivada segunda (Espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Hanslope, Inglaterra) e a área do terceiro pico negativo foi usada para calcular a quantidade de Phe presente nas amostras, empregando-se a curva padrão. O software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, EUA) foi utilizado para traçar os espectros da derivada segunda.

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

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

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

sendo:

A = Teor de Phe no concentrado protéico do soro do leite.

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

C = Teor de proteína no concentrado protéico do soro do leite.

D = Teor de proteína no hidrolisado protéico do concentrado protéico do soro do leite.

2.2.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em 3 repetições, e as análises realizadas em triplicata. Para comparar a porcentagem de remoção de fenilalanina dos hidrolisados

protéicos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan para comparação de médias, ambos a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE

O conhecimento da composição química do WPC é relevante, pois esse concentrado representa a matéria-prima para o desenvolvimento de novos ingredientes ou produtos que, no caso do presente trabalho, serão destinados a um grupo específico de pacientes, os fenilcetonúricos.

Observa-se na Tabela I.3 que os teores obtidos para proteínas, cinzas totais e lactose estão próximos aos encontrados por outros autores. 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 superior aos obtidos pelos outros autores. Por outro lado, a quantidade de lípidos aqui encontrada é bem inferior à reportada na literatura. Esta diferença deve estar relacionada ao fato de que o método utilizado por MORTENSON et al. (2007) para a determinação deste nutriente (método de Mojonier) não foi o mesmo do presente trabalho. No caso de SAMMEL & CLAUS (2003), não foi relatada a metodologia utilizada.

Outros autores também relataram diferenças na composição química de WPC proveniente de diversas empresas. Assim, ONWULATA, et al., (2004) observaram significantes variações na composição química de 6 concentrados protéicos de soro de leite fornecidos por diferentes empresas, especialmente com relação aos teores de umidade, proteína, lipídios, cinzas e carboidratos. Da mesma forma, REGESTER et al. (1992), ao analisarem 6 concentrados protéicos de soro de leite de diferentes empresas, encontraram consideráveis variações quanto ao teor de cinzas totais.

Tabela I.3 – Composição química do concentrado protéico de soro do leite

Componentes	¹ Valores obtidos (g%)	WPC 1 (g%)	WPC2 (g%)	WPC 3 (g%)
Proteínas	32,64	---	34,5	38,6
Umidade	5,06	> 5	3,5	2,4
Lipídeos	0,15	---	3,5	2,8
Cinzas totais	7,40	---	6,4	6,5
Lactose	54,75	---	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).

3.2 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Na Tabela I.4 estão representados os resultados obtidos para a remoção de Phe dos hidrolisados do concentrado protéico do soro do leite.

Os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg Phe/ 100g de hidrolisado do concentrado protéico do soro), sendo esta última forma a mais apropriada para os cálculos de adequação das prescrições dietéticas de substitutos protéicos destinados a fenilcetonúricos, além de atender à regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos no Brasil (ANVISA, 2003). O teor de Phe encontrado no WPC foi de 2106,7 mg de Phe/100g do produto, sendo que não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre o teor de Phe do WPC utilizado no presente trabalho (WPC com 32,64% de proteína, conforme Tabela I.3). Entretanto, foi encontrado na literatura um trabalho realizado com WPC proveniente da empresa Mahaan (New Delhi, USA) contendo 75,6% de proteína, o qual apresentou teor de Phe de 3620 mg de Phe/100g do produto (SINHA, *et al.*, 2007).

Tabela I.4- Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos do concentrado protéico do soro do leite.

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mgPhe/100 g do hidrolisado de WPC ¹)
H1	77,8 ^b	467,6
H2	61,7 ^{d,e,f}	806,4
H3	55,6 ^g	934,1
H4	64,7 ^d	743,2
H5	60,8 ^{e,f}	826,4
H6	79,0 ^{a, b}	441,1
H7	69,6 ^c	641,2
H8	81,3 ^a	394,1
H9	63,0 ^{d,e}	778,6
H10	63,2 ^{d,e}	775,3
H 11	62,7 ^{d,e}	785,5
H 12	62,3 ^{d,e,f}	794,8
H 13	59,1 ^f	861,8
H 14	19,4 ^k	1697,3
H 15	22,6 ^j	1631
H 16	30,3 ⁱ	1468,4
H 17	33,5 ^h	1400,9

¹WPC= *Whey protein concentrate*

Como pode ser observado, o uso do carvão ativado mostrou-se eficaz na remoção de Phe dos hidrolisados protéicos do WPC, tendo o percentual de remoção variado de 19,4% a 81,3%, e o teor final de Phe de 394,1 a 1697,3 mg de Phe/100g de hidrolisado de WPC, dependendo dos parâmetros empregados. Ressalta-se, ainda que, dos 17 hidrolisados estudados, o H8 foi o que apresentou a maior remoção de Phe (81,3%).

Levando-se em conta que o teor máximo de Phe permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002) para pacientes fenilcetonúricos é de 0,1g/100g de produto, o hidrolisado H8 poderia ser utilizado como fonte protéica na elaboração de um suplemento nutricional para fenilcetonúricos na quantidade de 25,4g, o que corresponde a 0,1 g de Phe/100g e a um teor protéico de 8,28 g/100 g. Apesar deste valor ser bem menor que o do WPC,

representa um valor superior ao teor protéico de alimentos convencionais, fontes de proteínas, tais como o leite (3,0%), bebida láctea (2,0%) e iogurte (3,0%) (TACO, 2006).

Vale a pena ressaltar que a possibilidade de introduzir o WPC na dieta de fenilcetonúricos, através da utilização do hidrolisado H8 em uma formulação dietética, teria um elevado impacto nutricional, já que os alimentos de origem animal não são permitidos na alimentação destes pacientes, devido ao elevado teor de Phe.

Além disso, a introdução de proteínas na forma hidrolisada na dieta destes pacientes é vantajosa, do ponto de vista nutricional, uma vez que os oligopeptídeos, especialmente di-tripeptídeos, são mais rapidamente absorvidos do que misturas de aminoácidos livres (FRENHANI & BURINI, 1999), que são normalmente usadas na alimentação de fenilcetonúricos.

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

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre a remoção de Phe de WPC. Por outro lado, em estudos previamente realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, a remoção de Phe foi realizada partindo-se de outras fontes protéicas. Assim, o CA foi utilizado com eficiência para a remoção de Phe de leite em pó (93,6 a 99%) (SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2006), do soro de leite (75 a 99 %) (SILVA et al., 2007; DELVIVO et al., 2006), do arroz (85 a 100%) (LOPES et al., 2008) e do fubá de milho (68,63 a 97,55%) (CAPOBIANGO et al., 2007). Observa-se que, para a maioria dos hidrolisados de WPC aqui estudados, a porcentagem de remoção de Phe está próxima dos valores destes outros trabalhos.

3.3 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

O efeito do tipo de enzima foi avaliado com o intuito de se obter o hidrolisado protéico com o maior percentual de remoção de Phe. Os demais parâmetros – relação enzima:substrato (E:S), concentração da matéria-prima (p/v) e tempo de hidrólise – foram

analisados levando-se, igualmente, em consideração a redução dos custos do processo para adaptação em larga escala. Assim, o emprego de uma menor relação E:S está associado à utilização de menor quantidade de enzima necessária para hidrólise; a utilização de uma maior concentração da matéria-prima, facilita posterior processo de secagem na obtenção do produto final; e o menor tempo de hidrólise está associado à diminuição da contaminação bacteriana, à redução da formação de produtos de degradação, além de menor gasto de energia.

3.3.1 Efeito do tipo de enzima

Para a avaliação do efeito do tipo de enzima, foram comparados os hidrolisados de H1 até H8. Dentre as enzimas utilizadas, a pancreatina (H8) foi a mais eficiente, levando à obtenção do hidrolisado com o menor teor final de Phe (394,1 mg Phe/100g). Este resultado poderia ser, pelo menos em parte, explicado pelo fato de que a pancreatina é um complexo enzimático que apresenta tanto endopeptidases (tripsina, quimiotripsina) como exopeptidases (carboxipeptidase A e B) sendo, portanto, capaz de hidrolisar ligações peptídicas tanto no interior quanto nas porções N- ou C- terminais da cadeia peptídica, favorecendo uma maior exposição da fenilalanina, o que facilitaria a sua remoção pelo carvão ativado.

Pode-se observar, ainda, na Tabela I.4, que o emprego de duas enzimas obtidas do mesmo microrganismo (*B. subtilis*; H1 e H3) levou a resultados diferentes, tanto para a atividade enzimática quanto para a remoção de Phe. De fato, como essas enzimas foram preparadas por fabricantes distintos, os processos utilizados não devem ter sido os mesmos, o que influenciaria na composição dos extratos enzimáticos, alterando não apenas a quantidade, mas também a qualidade das atividades das enzimas.

O efeito do tipo de enzima sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos foi, anteriormente, avaliado em três estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho. Assim, ao se utilizar uma papaína (Biobrás, Montes Claros, Brasil) e uma pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para preparar hidrolisados protéicos de leite em pó, não foi observada diferença significativa nos percentuais de remoção de Phe (97,6% e 97,1%, respectivamente) (SOARES et al., 2006). Por outro lado, o uso desta mesma papaína na obtenção de hidrolisados protéicos de farinha de arroz levou a uma maior remoção de Phe (94,1%) do que a obtida com uma pancreatina (AB Enzymes,

Darmstadt, Alemanha, 69,1%) ou proteases de quatro diferentes microrganismos (76,67%, em média) (VIEIRA et al., 2008). Da mesma maneira, a ação desta mesma papaína levou a uma maior remoção de Phe de hidrolisados protéicos de feijão (81,5%), quando comparada com a ação de proteases de cinco diferentes microrganismos (70,26%, em média) (LOPESJR, 2008).

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores comparando o efeito do uso de diferentes enzimas na remoção de Phe de hidrolisados protéicos.

3.3.2 Efeito da relação enzima:substrato

Visando manter constantes os demais parâmetros, para se avaliar o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe, foram comparados entre si os seguintes hidrolisados: H8 (E:S = 1:100), H9 (E:S = 2:100) e H10 (E:S = 4:100). Observa-se na Tabela I.4 que a vantagem da utilização de uma menor quantidade de enzima (menor relação E:S) foi obtida ao se comparar E:S de 2:100 (63% de remoção) com 1:100 (81,3% de remoção). O mesmo não ocorreu ao se comparar E:S de 4:100 com 2:100, uma vez que os resultados obtidos foram praticamente os mesmos.

Em estudo realizado, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, utilizando o fubá de milho como matéria-prima (CAPOBIANGO et al., 2007), diversas condições de hidrólise foram testadas, e os valores reportados foram bastante variados, sendo que, em alguns casos, o emprego de uma menor relação E:S (1:100 e 2:100) levou a uma remoção de Phe mais elevada (86,68% e 79,01%, respectivamente), como aconteceu no presente trabalho ao se comparar 1:100 e 2:100. Entretanto, em outro estudo deste mesmo laboratório (LOPES et al., 2008), observou-se que o emprego de uma menor relação E:S não afetou a remoção de Phe de hidrolisados protéicos de arroz, assim como ocorreu ao se comparar 2:100 com 4:100 no presente trabalho.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores comparando o efeito do uso de diferentes relações E:S na remoção de Phe de hidrolisados protéicos.

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

3.3.3 Efeito da concentração da matéria-prima

A avaliação do efeito deste parâmetro pode ser feita comparando-se os hidrolisados H11 (7%), H12 (8%), H13 (9%) e H8 (10%). Observa-se na Tabela I.4, que o emprego de uma maior concentração da matéria-prima (10%) foi altamente favorável, uma vez que obteve o hidrolisado com o maior percentual de remoção de Phe (81,3%). Entretanto, ao se comparar os hidrolisados H11 (7%) e H12 (8%), observou-se que o emprego de uma menor concentração da matéria-prima não teve efeito sobre o percentual de remoção de Phe (62,7% e 62,3%, respectivamente), os quais não diferiram significativamente entre si.

Em estudo anterior, realizado no mesmo laboratório, avaliando-se a concentração do extrato protéico do arroz sobre a remoção de Phe foi, também, observado que a utilização de uma maior concentração da matéria-prima (3 g/100mL) foi favorável, pois levou a 95% de remoção de Phe, ao passo que ao se usar 2 g/100 mL este percentual caiu para 90% (LOPES, et al., 2008).

Entretanto, em outro trabalho também realizado neste laboratório avaliando-se a concentração do extrato protéico do fubá de milho, observou-se que o emprego de um maior valor (2 g/100 mL) foi prejudicial, uma vez que obteve-se percentual de remoção de Phe (68,72%) bem inferior ao obtido com a concentração de 1 g/100mL, cujo valor obtido foi de 97,31% (CAPOBIANGO, et al., 2007).

Estes resultados demonstram que o efeito da concentração da matéria-prima sobre a remoção de Phe é mais complexo do que o esperado e pode estar associado a outros parâmetros empregados no processo. Dessa forma, o aumento vantajoso da concentração protéica poderia levar a resultados tanto positivos quanto negativos. Assim, se por um lado contribuiria para aumentar a probabilidade da enzima entrar em contato com o substrato, levando a uma maior exposição e remoção de Phe, por outro, uma maior quantidade de proteínas poderia provocar uma sobrecarga na coluna de carvão, reduzindo, conseqüentemente, a remoção de Phe.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores avaliando-se o efeito da concentração da matéria-prima sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos.

3.3.4 Efeito do tempo de reação

A avaliação deste efeito pode ser feita comparando-se os hidrolisados 14 (1h), H15 (2h), H16 (3h), H17 (4h) e H8 (5h). Os resultados apresentados na Tabela I.4 indicam que não foi observada a vantagem da utilização de um menor tempo de reação, uma vez que uma hidrólise menos demorada levou a uma menor remoção de Phe. Na verdade, quanto maior o tempo de reação, mais pronunciada foi a remoção de Phe, sendo que o tempo de 5h foi muito mais vantajoso que os demais valores testados. Este resultado está de acordo com que seria esperado teoricamente, uma vez que o emprego de um maior tempo de reação deve ser capaz de promover uma hidrólise mais acentuada das proteínas, elevando a exposição de Phe e facilitando a sua adsorção pelo carvão ativado.

Não foram encontrados na literatura dados sobre o efeito do tempo de hidrólise na eficiência da remoção de Phe.

4 CONCLUSÃO

Empregando-se várias proteases para a hidrólise das proteínas do concentrado protéico do soro do leite, e o CA como meio adsorvente, foi possível obter hidrolisado protéico com baixo teor de Phe (394,1 mg/100 g), que poderia ser utilizado em uma quantidade de até 25,4 g/100g como ingrediente alimentar ou alimento na dieta de fenilcetonúricos. O melhor resultado obtido foi aquele em que se utilizou a pancreatina na relação E:S de 1:100, concentração da matéria-prima de 10% e tempo de reação de 5 horas, tendo atingido 81,3% de remoção de Phe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial, Brasília, 26 dez. 2003. 33p.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. 16. ed. 3. Rev. Arlington: AOAC International, 1995. 1141p.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 04 nov. 2002, p. 83.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Políticas, Programas e Ações: alguns exemplos. Seminário Nacional de Saúde da População Negra Brasília – 18 a 20 de agosto de 2004.
- CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivate analysis of uv/visible spectra. Amer. Laborat., v. 12, p. 101-112, 1980.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D.C.F.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M. P. C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. International Journal of Food Engineering, v. 3, p. 1-19, 2007.
- DELVIVO, F.M ; VIEIRA, C.R ; BIASUTTI, E.A.R ; AFONSO, W.de.O ; SILVESTRE, M.P.C. . Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates.. American Journal Of Food Technology, Estados Unidos, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- DIAS, D.R.; VILELA, D.M.; SILVESTRE, M.P.C.; SCHWAN, R.F. Alkaline protease from Bacillus sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. World J Microbiol Biotechnol, 24, p. 2027-2034, 2008.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. Arq. Gastroenterol., v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. J. Chromatog. A, v.347, p.219-235, 1985.
- GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars Pharmaceutica, p. 79-89, 2000.
- HUFFMAN, L.M.; HARPER, W.J. Maximizing the value of milk through separation technologies. J. Dairy Sci, 82, p. 2238-2244, 1999.
- KINSELLA, J.E. & WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. Adv. Food Nutr Res., v.33, p.343-437, 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.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. . British Food Journal, Inglaterra, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.

- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Dietary Supplements for Phenylketonuria: Removing Phe by Activated Carbon. *Nutrition & Food Science*, Inglaterra, v. 36, n. 2, p. 96-104, 2006.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M. P. C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *Journal of Food Technology*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- 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)*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A. ; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 938-942, 1991.
- LOPESJR, C. O. Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. p.81 (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- MARTINS, A. M.; FISBERG, R. M.; SCHMIDT, B. J. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica NESTLÉ, São Paulo, n.54, 1993.
- MILUPA. Protein substitutes for the dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia, 1995.
- MIRA, N.V.M. e MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pub.* v. 34, n. 1, p. 86 - 96, 2000.
- MORTENSON, M.A.; VICKERS, Z.M.; REINECCIUS, G.A. Flavor of whey protein concentrates and isolates. *International Dairy Journal*, 2007, (in press).
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochem. Microbiol.*, v.29, n.3, p. 302-306, 1993.
- NIELSEN S.S. *Food Analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- ONWULATA, C.I.; KONSTANCE, R.P.; TOMASULA, P.M. Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. *Journal of Dairy Science* vol. 87, nº3, 2004.
- O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength.-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, p. 1548-1553, 1979.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba: Livraria Nobel S/A, 2000. 477p.
- REGESTER, G.O.; SMITHERS, G.W.; MANGINO, M.E.; PEARCE, R.J. Seasonal changes in the physical and functional properties of whey protein concentrates. *J. Dairy Sci.*, 1992.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, p. 753-761, 1988.
- 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.
- 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., Tokyo, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; 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.
- 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.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, Argentina, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000p.
- TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA – UNICAMP, versão II, 2 ed., Campinas: NEPA – UNICAMP, 2006. 113p.
- VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; SILVA, A.L.S.; AMORIM, A.C.P.; SILVESTRE, M.P.C. Elaboração de hidrolisados protéicos de farinha de arroz destinados a dietoterapia de pacientes com fenilcetonúria. *Rev. Brás. Nutr. Clin*, p.83-90, 2008.

Capítulo II

GRAU DE HIDRÓLISE E PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar hidrolisados enzimáticos de WPC quanto ao grau de hidrólise e perfil peptídico. Foi avaliado o efeito dos seguintes parâmetros: tipo de enzima (subtilisina; papaína; pancreatina; proteases do *A. sojae*, *B. amyloquefaciens*, *A. oryzae* e *B. stearothermophilus*), relação E:S (1:100, 2:100 e 4:100) e concentração da matéria-prima (7%, 8%, 9% e 10%). O grau de hidrólise foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio α -aminado e total. A análise do perfil peptídico envolveu o 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. Além disso, foi estudada a correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico, utilizando-se o coeficiente de correlação de *Pearson*. Concluiu-se que a pancreatina e a protease do *A. oryzae*, ambas na relação E:S de 1:100 e concentração da matéria-prima de 10%, levaram à obtenção dos maiores valores de grau de hidrólise (30% e 27%, respectivamente). Em relação ao perfil peptídico, a utilização da protease do *A. oryzae* e da pancreatina, na relação E:S de 1:100 e concentração da matéria-prima de 10% e 7%, respectivamente, foi a mais vantajosa, do ponto de vista nutricional, uma vez que levou à obtenção do maior conteúdo de di-tripeptídeos (16,14% e 9,12%, respectivamente) e do menor teor de grandes peptídeos (média de 20%). Além disso, foi observada a existência de correlação de fraca intensidade de associação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico, tendo sido positiva para as frações F2, F3 e F4 e negativa para a F1.

Palavras-chave: WPC; hidrolisados enzimáticos; grau de hidrólise; perfil peptídico; correlação.

ABSTRACT

DEGREE OF HYDROLYSIS AND PEPTIDE PROFILE OF ENZYMATIC HYDROLYSATES FROM WHEY PROTEIN CONCENTRATE.

The present work aimed to characterize enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate by the degree of hydrolysis and peptide profile. The effect of the following parameters was evaluated: enzyme type (subtilisin; papain; pancreatin; proteases from *A. sojae*, *B. amyloquefaciens*, *A. oryzae*, and *B. stearothermophilus*), enzyme:substrate ratio (1:100, 2:100 e 4:100) and substrate concentration (7%, 8%, 9% e 10%). The degree of hydrolysis was obtained by the ratio between α -amino and total nitrogen. The analysis of peptide profile involved the fractionation of hydrolysates by high performance size-exclusion liquid chromatography and the Rapid Correct Fraction Area method was used to quantify the chromatographic fractions components. Moreover, the correlation between the degree of hydrolysis and peptide profile was studied, using the *Pearson* correlation coefficient. It was concluded that the pancreatin and the protease from *A. oryzae*, both in E:S ratio of 1:100 and substrate concentrate of 10%, produced the best values for the degree of hydrolysis (30% and 27%, respectively). In respect to peptide profile, the use of the protease from *A. oryzae* and pancreatin, on the E:S ratio of 1:100 and substrate concentration of 10% and 7%, respectively, was more advantageous, from the nutritional point of view, since it gave rise to the highest di-tripeptide contents (16,14% and 9,12%, respectively) and the lowest level of large peptides (20%, in average). Also, a correlation of low intensity association between the degree of hydrolysis and peptide profile was observed, with positive values for F2, F3 and F4 fractions and negative for F1.

Key words: WPC; enzymatic hydrolysates; degree of hydrolysis; peptide profile; correlation.

1 INTRODUÇÃO

O processo de clivagem das ligações peptídicas, originando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, é denominado de hidrólise protéica. Este processo pode ser catalisado por ácidos, bases ou enzimas. Cada um apresenta aspectos positivos e negativos, dependendo da sua utilização e dos objetivos a serem alcançados (ADLER-NISSEN, 1981).

A hidrólise enzimática apresenta vantagens em relação ao tratamento químico, pois possui alta especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (MANNHEIM e CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995; CLEMENTE, 2000).

O uso dietético dos hidrolisados protéicos deve levar em consideração o controle do processo da reação de hidrólise e a caracterização dos hidrolisados com base no tamanho dos peptídeos formados, pois, sabe-se que o comprimento da cadeia dos peptídeos influencia sua taxa de absorção (VIJAYALAKSHIMI *et al.*, 1986; GUADIX, *et al.*, 2000). Além disso, diversos trabalhos têm relatado que fórmulas contendo oligopeptídeos, especialmente di-tripeptídeos, possuem maior valor nutricional do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou proteínas intactas (FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA *et al.*, 2000).

Dentre as proteínas mais usadas em formulações especiais, contendo hidrolisados protéicos, encontram-se a caseína e as proteínas do soro de leite e da soja. Outras fontes podem ser empregadas, mas, por razões nutricionais, econômicas ou práticas, são menos satisfatórias (LAHL & BRAUN, 1994).

O concentrado protéico do soro de leite (*WPC - Whey protein concentrate*) foi a matéria-prima de escolha do presente trabalho, devido ao seu alto teor protéico de 35-80%, e à presença de proteínas de alto valor biológico, sendo obtido a partir da separação das proteínas do soro por membranas. Além disso, diversas aplicações importantes estão associadas ao WPC, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande

variedade de produtos como cárneos, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; BRANS et al., 2004).

A extensão da proteólise pode ser avaliada pelo grau de hidrólise (GH), referente ao percentual de clivagem das ligações peptídicas de uma proteína. A avaliação do GH depende de três princípios básicos: do teor de nitrogênio liberado pela hidrólise da proteína, na presença de um agente precipitante; da determinação de grupos amino livres e da titulação de prótons liberados (WANG, et al., 2007). Dessa forma, diversos métodos são utilizados para a quantificação do GH, como por exemplo, através da determinação do teor de nitrogênio liberado durante a hidrólise, solúvel na presença de um agente precipitante (como o ácido tricloroacético). Outros métodos incluem o de Kjeldahl (AOAC, 1995), a determinação em espectrofotometria na região do visível após reação colorimétrica, por exemplo, pela reação de biureto (HUNG, VAS, CHEKE & BOLCSI, 1984) ou, ainda, pelo uso de compostos que reagem especificamente com grupos amino, como ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS).

Em relação ao perfil peptídico de hidrolisados protéicos, SILVESTRE et al. (1994a) desenvolveram um método baseado no fracionamento dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC), que lhes possibilitou separar e quantificar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000Da. Este método foi, posteriormente, utilizado em estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, para caracterizar o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de diversas fontes protéicas, tais como concentrado protéico do soro do leite (AFONSO, 2008), soro de leite (DE MARCO *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006; BIASUTTI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007), 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).

O objetivo do presente trabalho consistiu em caracterizar hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro do leite (WPC), em relação ao grau de hidrólise e perfil peptídico, avaliando-se o efeito do tipo de enzima, relação E:S e concentração da matéria-prima. Além disso, considerando que não foi encontrado na literatura qualquer relato abordando a correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico, este tema foi, igualmente, aqui estudado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O concentrado protéico do soro do leite (*Whey Protein Concentrate* - WPC) na forma de pó (Kerrylac 750) foi gentilmente doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A papaína (Corolase® L10) foi comprada da AB Enzymes (Darmstadt, Alemanha). As demais proteases foram gentilmente doadas pela Prozyn (São Paulo, Brasil) (*B. subtilis* - Protemax N200 e *B. subtilis* - Protezyn L) e pela AB Enzymes (*B. stearothermophilus* - Corolase® TS, pancreatina - Corolase® PP, *A. sojae* - Corolase® LAP; *A. oryzae* - Flavourzyme e *B. amyloquefaciens* - Protemax N411). Algumas características destas enzimas estão apresentadas na Tabela II.1. Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O carvão ativado (granulado n° 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil). 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) foi usado para secar 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 (PolyIC, Columbia, MD, USA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, USA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, USA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo dos hidrolisados protéicos

Foram preparados 12 hidrolisados do concentrado protéico do soro do leite (WPC), tendo sido variados os seguintes parâmetros: pH, tipo de enzima, relação enzima: substrato (E:S) e concentração da matéria-prima. Estes hidrolisados com seus respectivos parâmetros de hidrólise estão representados na Tabela II.2.

Para a obtenção dos hidrolisados, um volume de 100 mL de solução aquosa do WPC a 10% (p/v) foi, inicialmente, colocado em um erlenmeyer e o pH foi ajustado a um valor compreendido na faixa ótima apresentada nas fichas técnicas de cada enzima, disponibilizadas pelos fornecedores. Em seguida, a temperatura foi estabilizada também de acordo com as especificações técnicas dos fornecedores, e as enzimas foram adicionadas para se obter a relação E:S desejada. Após 5 horas, o processo foi interrompido por aquecimento em banho-maria a 75°C, por 15 segundos, a fim de inativar a enzima, confirmado pela medida da atividade da enzima, antes e após tratamento enzimático, pelo método de DIAS et al., 2008, sem adição de caseína.

2.2.2 Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

O grau de hidrólise (GH) é definido como a porcentagem de grupamentos amino que são liberados no rompimento da molécula protéica pela ação de enzimas. Neste caso, o GH foi calculado por meio da relação entre o nitrogênio α -aminado (NA) e o nitrogênio total (NT) de acordo com a equação 1.

$$\%GH = \frac{\text{nitrogênio } \alpha\text{-aminado (NA)}}{\text{nitrogênio total (NT)}} \times 100 \quad (1)$$

Para a determinação do NA utilizou-se o método de Sorensen (AOAC, 1995) baseado na titulação com formol. Dessa forma, um volume de 5 mL da amostra foi adicionado a um mesmo volume de solução de formaldeído-fenolftaleína. Após ajuste do pH para 7,0, usando uma solução de NaOH a 0,2 mol/L, a amostra foi titulada com esta

mesma solução até viragem de cor, sendo, em seguida, adicionado um excesso, equivalente ao volume titulado, dessa mesma solução. Por fim, fez-se uma retro-titulação com uma solução de HCL a 0,2 mol/L. O NT foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína total (AOAC, 1995).

2.2.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de WPC

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 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 1g% (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 30µL. 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; F2, de 16,0 a 19,5 min; F3, de 19,5 a 20,5 min; e F4, de 20,5 a 32,0 min.

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 WPC. Após a multidetecção das frações a 230, 280 e 300 nm, para se eliminar a interferência da absorção dos aminoácidos aromáticos, calcula-se a ACF. Esta, por sua vez, é levada a uma curva padrão, para se encontrar a quantidade de peptídeos de cada fração, preparada como descrito em outros trabalhos realizados no mesmo laboratório em que o presente estudo foi desenvolvido (SILVESTRE et al., 1994b; MORATO et al., 2000; LOPES et al., 2005).

2.2.4 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casual com 12 hidrolisados em 3 repetições, e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para a avaliação das diferenças entre as

médias dos percentuais de grau de hidrólise e dos teores de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados do WPC, foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 2000). O teste *t-Student* foi utilizado para as análises descritivas referentes ao grau de hidrólise, aos teores de peptídeos das frações cromatográficas e ao valor de “p”. A correlação entre as variáveis grau de hidrólise e perfil peptídico foi obtida pelo coeficiente de correlação de *Pearson* (*r*), que mede o grau de associação entre duas variáveis.

Tabela II.1- Características das proteases utilizadas para o preparo dos hidrolisados protéicos.

Grupo	Nome comercial	Origem	Atividade enzimática ⁵ (U/mL)	Estabilidade	
				pH	T (°C)
Metalo protease Serino e Metalo protease	Corolase® TS ²	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	44,13	7<pH<8	60<T<80
Cisteíno Protease	Corolase® PP ²	Pancreatina	34,71	7<pH<9	45<T<55
Metalo protease	Corolase® L10 ²	<i>Carica papaya</i>	31,56	3<pH<9	50<T<70
Metalo protease	Corolase® LAP ²	<i>Aspergillus sojae</i>	63,19	3<pH<9	50<T<70
Metalo protease	Flavourzyme® ¹	<i>Aspergillus oryzae</i>	512,43	6<pH<9	50<T<70
Serino protease	Protemax N411 ¹	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	53,00	7<pH<7,5	55
Serino protease	Protemax® N200 ¹	<i>Bacillus subtilis</i>	20,19	4,5<pH<7	50<T<55
Serino protease	Protezyn® L ¹	<i>Bacillus subtilis</i>	29,83	9	55

Fonte: 2PROZYN (2005); ^{2, 3, 4}AB ENZYME (2001, 2002, 2003); ⁵Valor determinado no presente trabalho de acordo com a metodologia de Dias et al., (2008).

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

²AB ENZYMES. Corolase® PP, Corolase® 7089, Corolase® LAP, Corolase® N: *Description and Specification*. Rev. Nr. 02. 2001, 8p;

³AB ENZYMES. Corolase® TS: *Description and Specification*. Rev. Nr. 00. 2002, 2p;

⁴AB ENZYMES. Corolase® L10: *Description and Specification*. Rev. Nr. 03. 2003, 2p.

⁵CALIK et al., (2002). *Enzyme and Microbial Technol.*, 31, pp. 685-697; KUMAR, C.G. (2002). *Lettrers in Applied Microbiology*, 34, pp. 13-17.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GRAU DE HIDRÓLISE

Os resultados do GH dos hidrolisados enzimáticos do WPC estão representados na Tabela II.3. Observa-se que o grau de hidrólise apresentou uma ampla faixa de valores, indo de 2,5% para o hidrolisado preparado com a protease do *A. sojae* a 30% para o hidrolisado preparado com a pancreatina, o que se explica pela variedade de parâmetros utilizados no preparo dos hidrolisados enzimáticos do WPC. Ressalta-se, ainda, que o hidrolisado preparado com a pancreatina (H7) apresentou o maior grau de hidrólise (30%), sendo esta enzima a escolhida para o estudo do efeito dos parâmetros (relação E:S e concentração da matéria-prima) sobre o grau de hidrólise e o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos do WPC.

Tabela II.2 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de concentrado protéico do soro do leite (WPC).

Hidrolisados	Enzima (Tipo / Nome comercial)	pH	Temperatura (°C)	E:S	WPC (p/v)
H1	<i>B. subtilis</i> (Protezyn L)	9	55	1:100	10%
H2	<i>A. sojae</i> (Corolase LAP)	9	55	1:100	10%
H3	Papaína (Corolase L10)	7	55	1:100	10%
H4	<i>B. amyloquefaciens</i> (Protemax N411)	7	55	1:100	10%
H5	<i>A. oryzae</i> (Flavourzyme)	7	50	1:100	10%
H6	<i>B. stearothermophilus</i> (Corolase TS)	8	60	1:100	10%
H7	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	10%
H8	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	2:100	10%
H9	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	4:100	10%
H10	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	7%
H11	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	8%
H12	Pancreatina (Corolase PP)	7	50	1:100	9%

WPC =Concentrado protéico do soro do leite; E:S = relação enzima:substrato

3.2 PERFIL PEPTÍDICO DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE WPC

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente com relação ao fracionamento de peptídeos de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1000Da. Assim, 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; 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 H1, a 230nm, está apresentado na Figura II.1.

Tabela II.3- Grau de hidrólise dos hidrolisados protéicos de WPC.

Hidrolisados	Grau de Hidrólise (%)
H1	20 ^{b,c}
H2	2,5 ^e
H3	15 ^d
H4	14 ^d
H5	27 ^a
H6	17 ^d
H7	30 ^a
H8	23 ^b
H9	15 ^d
H10	19 ^{b,c}
H11	17 ^d
H12	17 ^{c,d}

WPC=Concentrado protéico do soro do leite; GH (%)= percentual de grau de hidrólise, ou seja, percentual de clivagem das ligações peptídicas dos hidrolisados do WPC. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3.2.1 Teor de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados de WPC

Observa-se na Tabela II.4, uma significativa variação do perfil peptídico entre os diferentes hidrolisados enzimáticos do WPC. 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- e tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores os di- e 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- e tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di- e tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior. GONZÁLEZ-TELLO et al., (1994) também relataram as vantagens dos di- e tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

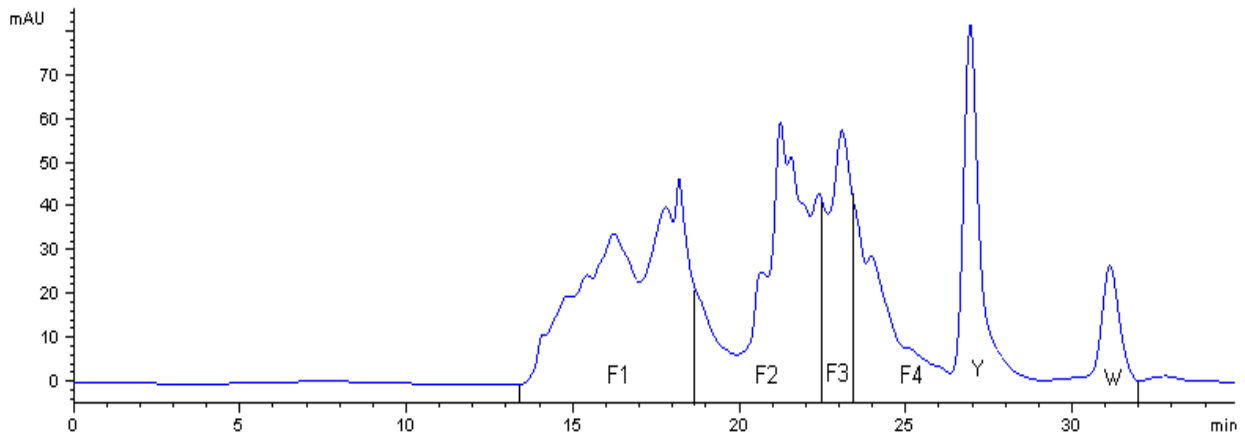


Figura II.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm.

Coluna: PHEA em equipamento HPLC; fase móvel: ácido fórmico a 0,05 mol/L. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado H1: substrato a 10%; tempo de hidrólise = 5h; relação E:S = 1%.

Desta maneira, conclui-se que, do ponto de vista nutricional, os melhores perfis peptídicos foram obtidos para os hidrolisados H5 e H10, uma vez que apresentaram os menores teores de grandes peptídeos (média de 20%) e os maiores de di-tripeptídeos (16,14% e 9,12%, respectivamente). Além disso, ressalta-se a semelhança entre os perfis peptídicos destes dois hidrolisados, já que não houve diferença significativa com relação aos teores de grandes peptídeos e, além disso, embora o teor de di-tripeptídeos do H5 (16,14%) tenha sido superior ao do H10 (9,12%), o oposto foi observado com relação à quantidade de aminoácidos livres (18,43% para H5 e 38,04% para H10). Por outro lado, deve-se ressaltar uma ligeira superioridade de H5 sobre H10 com relação ao teor de oligopeptídeos (F2+F3), que foi de 62,38% e 40,61%, respectivamente, o que daria a H5 uma certa vantagem sobre H10, do ponto de vista nutricional.

Considerando que não foram encontrados na literatura estudos de outros autores sobre o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de WPC ou soro de leite, os resultados do presente trabalho foram comparados com os obtidos, anteriormente, no mesmo laboratório para estas duas fontes protéicas. Assim, ao se utilizar a mesma pancreatina do presente trabalho, mas para hidrolisar o soro de leite, o resultado obtido para o perfil peptídico foi inferior ao do H5 aqui encontrado, com relação ao menor teor de di-tripeptídeos (10,45%) e maior de grandes peptídeos (23,34%). Por outro lado, este tratamento produziu uma maior quantidade de aminoácidos livres (36,97%) do que a obtida no presente trabalho para o H5 (SOUZA et al., 2008).

O efeito da ação de uma subtilisina (Protamax N200, Prozyn, São Paulo, SP) na hidrólise das proteínas do soro do leite foi, igualmente, testado, sendo observado que o melhor resultado obtido para o perfil peptídico foi inferior ao resultado do H5 do presente trabalho, uma vez que apresentou um maior teor de grandes peptídeos (43,21%), e menor conteúdo de di-tripeptídeos (10,89%) e de aminoácidos livres (15,37%) (SOUZA et al., 2008).

A ação desta mesma subtilisina sobre o perfil peptídico de hidrolisados do WPC foi, igualmente, estudada neste mesmo laboratório. Neste caso, o melhor perfil peptídico obtido foi, também inferior ao H5 em termos de di-tripeptídeos (13,43%). Por outro lado, apresentou vantagens quanto aos teores de aminoácidos livres (45,56%) e de grandes peptídeos (12,28%). Em outro estudo, utilizou-se a mesma pancreatina do presente trabalho para hidrolisar as proteínas do WPC, porém em condições diferentes de reação. Apesar de ter sido encontrado um teor de di-tripeptídeos inferior (12,11%, em média), o

conteúdo de aminoácidos livres foi superior (49,06%, em média) e o de grandes peptídeos inferior (12,8%, em média), quando comparado com os resultados do H5 do presente trabalho (AFONSO, 2008).

3.3 EFEITO DOS PARÂMETROS HIDROLÍTICOS SOBRE O GRAU DE HIDRÓLISE E PERFIL PEPTÍDICO

O efeito do tipo de enzima foi avaliado com o intuito de se obter o hidrolisado com o maior percentual de grau de hidrólise e o melhor perfil peptídico. Os demais parâmetros – relação enzima:substrato (E:S) e concentração da matéria-prima (p/v) - foram analisados levando-se, igualmente, em consideração a redução dos custos do processo para adaptação em larga escala. Assim, o emprego de uma menor relação E:S está associado à utilização de menor quantidade de enzima necessária para hidrólise e a utilização de uma maior concentração da matéria-prima, facilita posterior processo de secagem na obtenção do produto final.

3.3.1 Efeito de diferentes enzimas

Para a avaliação do efeito da utilização das diferentes enzimas no preparo dos hidrolisados do WPC sobre o grau de hidrólise e perfil peptídico, foram comparados os hidrolisados de H1 até H7.

Observa-se na Tabela II.3 que a pancreatina e a protease do *A. oryzae* levaram à obtenção dos hidrolisados com os maiores valores de grau de hidrólise (H7-30% e H5-27%, respectivamente). No caso da pancreatina, este resultado poderia ser explicado pelo fato de que trata-se de um complexo enzimático que apresenta tanto endopeptidases (tripsina, quimiotripsina) como exopeptidases (carboxipeptidase A e B) sendo, portanto, capaz de hidrolisar ligações peptídicas tanto no interior quanto nas porções N- ou C-terminais da cadeia peptídica. Quanto à protease do *A. oryzae*, a sua maior eficiência na hidrólise das proteínas, poderia estar associada ao fato de que esta enzima é a que possui a maior atividade enzimática, dentre todas as testadas (Tabela II.1).

Tabela II.4 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.

Hidrolisados	F1 (>7 resíduos de AA)	F2 (4-7 resíduos de AA)	F3 (di-tripeptídeos)	F4 (AA livres)
H1	72,25 ^{b/1}	24,23 ^{d/2}	2,81 ^{d/3}	0,70 ^{g/4}
H2	75,77 ^{b/1}	12,95 ^{e,f/2}	2,56 ^{d/4}	8,72 ^{f/3}
H3	24,42 ^{f/2}	34,41 ^{b/1}	6,29 ^{c/3}	34,87 ^{b/1}
H4	46,46 ^{d/1}	29,56 ^{c/2}	3,51 ^{d/4}	20,47 ^{c,d/3}
H5	18,76 ^{g,h/2}	46,66 ^{a/1}	16,14 ^{a/2}	18,43 ^{d/2}
H6	34,37 ^{e/1}	38,21 ^{b/1}	9,79 ^{b/3}	17,62 ^{d,e/2}
H7	15,75 ^{h/3}	22,29 ^{d,e/2}	6,51 ^{c/4}	55,43 ^{a/1}
H8	53,99 ^{c/1}	19,39 ^{e,f/3}	2,76 ^{d/4}	23,86 ^{c/2}
H9	80,64 ^{a/1}	9,81 ^{f/2}	5,75 ^{c/3}	3,80 ^{g/4}
H10	21,35 ^{f,g/3}	31,49 ^{c/2}	9,12 ^{b/4}	38,04 ^{b/1}
H11	24,20 ^{f/2}	33,23 ^{b/1}	5,37 ^{c/3}	37,17 ^{b/1}
H12	52,27 ^{c/1}	27,10 ^{c,d/2}	5,14 ^{c/4}	15,47 ^{e/3}

AA: aminoácidos. 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).

Com relação ao perfil peptídico, observa-se na Tabela II.4 que o emprego de diferentes enzimas afetou de forma variada o perfil peptídico dos hidrolisados de WPC, sendo que o melhor resultado foi obtido pela ação da protease do *A. oryzae* (H5), enquanto as enzimas do *B. subtilis* (H1) e do *A. sojae* (H2) produziram os perfis peptídicos mais desfavoráveis do ponto de vista nutricional.

Nenhum relato foi encontrado na literatura abordando o efeito da utilização de diferentes enzimas sobre o grau de hidrólise de hidrolisados protéicos. Com relação ao efeito deste parâmetro sobre o perfil peptídico, não foram encontrados na literatura estudos de outros autores. Portanto, os resultados aqui obtidos foram comparados com os encontrados, anteriormente, no mesmo laboratório para o soro de leite e o WPC.

Assim, o estudo da ação isolada de três enzimas, papaína (Biobrás, Montes Claros, MG), protease de *A. sojae* (Sigma, St. Louis, MO, USA) e pepsina (Sigma, St. Louis, MO, USA) sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos de leite desnatado, revelou que a papaína deu origem ao melhor perfil peptídico apresentando teores de 25,6%, 19,9% e 25,7% para os grandes peptídeos, di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, respectivamente (SOARES et al., 2007).

O efeito da utilização de uma papaína (P-1500, Sigma, St. Louis, MO, USA) e de uma pancreatina (Sigma, St. Louis, MO, USA), imobilizadas em carvão ativado e alumina, sobre o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do soro do leite foi também avaliado. Observou-se que a ação da pancreatina foi favorável à obtenção do hidrolisado com o maior teor de di- e tripeptídeos (17%). Entretanto, a papaína apresentou o maior conteúdo de aminoácidos livres (34%) e menor quantidade de grandes peptídeos (45%) (SILVA, et al., 2007).

No caso de se utilizar, separadamente, a mesma pancreatina do presente trabalho, e uma subtilisina (Protemax N200, Prozyn, São Paulo, SP), para hidrolisar as proteínas do soro do leite, o resultado encontrado para o melhor perfil peptídico foi obtido pela pancreatina, tendo apresentado teores de 22,98%, 9,77% e 40,91% para grandes peptídeos, di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, respectivamente (SOUZA et al., 2008).

Estas mesmas enzimas citadas acima foram, igualmente, empregadas para hidrolisar o concentrado protéico do soro do leite (WPC), tendo sido observado que os teores de di- e tripeptídeos originados da ação das duas enzimas (13,34% para subtilisina e 12,11 %, em média, para a pancreatina) foram estatisticamente iguais e os 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), situaram-se muito próximos, apesar de serem estatisticamente diferentes (AFONSO, 2008).

3.3.2 Efeito da relação E:S e concentração da matéria-prima

A influência da relação E:S sobre o grau de hidrólise e o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos do WPC, pode ser avaliada comparando-se os hidrolisados H7, H8 e H9, para os quais empregou-se a pancreatina nas relações E:S de 1:100, 2:100 e

4:100, respectivamente. Observa-se na Tabela II.3 que o emprego de uma menor relação E:S (1:100; H7) levou à obtenção do hidrolisado com o maior grau de hidrólise (30%).

No que se refere ao efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico, observa-se na Tabela II.4, que a utilização da menor relação E:S (1:100) foi benéfica pois, quando comparada com 2:100, levou à obtenção de uma menor quantidade de grandes peptídeos, maior de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, com relação ao valor de 4:100, esta vantagem não foi observada apenas para os teores de di- e tripeptídeos, os quais não diferiram significativamente entre si.

Uma provável explicação para estes resultados poderia estar relacionada à autólise enzimática, uma vez que a enzima pode conter em sua estrutura ligações peptídicas compatíveis com sua especificidade. Este fenômeno sofre influência de fatores físico-químicos, tais como a concentração da enzima que, quando elevada, favorece a autólise em detrimento da hidrólise (FORTES-DIAS & ROGANA, 1986).

Para analisar o efeito da concentração inicial do WPC, sobre o grau de hidrólise e perfil peptídico, devem ser comparados os hidrolisados H10, H11, H12 e H7, para os quais foram utilizados valores de 7%, 8%, 9% e 10%, respectivamente. Como observado na Tabela II.3, pode-se dizer que, como esperado teoricamente, o emprego de uma maior concentração da matéria-prima, ou seja, do substrato, embora não tenha sido de forma linear, levou a um maior GH, uma vez que passando-se de uma concentração de 7% para 10%, o GH variou de 19% para 30%. Neste caso, não deve ter sido ultrapassado o ponto de saturação dos sítios ativos da enzima, e, portanto, uma maior quantidade de substrato levou, conseqüentemente, a uma maior formação de produto.

Resultado semelhante foi obtido para o efeito da concentração da matéria-prima sobre o perfil peptídico, já que comparando-se os valores encontrados ao se utilizar 7% e 10% de WPC, observa-se uma hidrólise enzimática relativamente mais pronunciada. Isto ocorre com relação aos teores de grandes peptídeos e de aminoácidos livres, para os quais foram observados uma redução e uma elevação, respectivamente. Por outro lado, o emprego de uma maior concentração do substrato (10%) produziu menor teor de di- e tripeptídeos.

Este estudo revelou, ainda, um certo paralelismo entre os resultados obtidos para o GH e o perfil peptídico. Assim, em linhas gerais, quanto maior foi o GH mais elevados foram os teores de peptídeos de cadeias média e curta (di-tripeptídeos) e de aminoácidos livres, enquanto que os teores de grandes peptídeos caminham no sentido contrário.

Estes resultados se devem, provavelmente, ao fato de que o método empregado para a avaliação do GH baseia-se na medida da quantidade de grupamentos amino liberados no meio da reação. Assim sendo, este valor será tanto mais elevado quanto maior for a quantidade de peptídeos de cadeias média e curta ou de aminoácidos livres encontrados.

Não foi encontrado qualquer relato na literatura abordando o efeito da relação E:S e da concentração da matéria-prima sobre o grau de hidrólise de hidrolisados protéicos. Com relação ao efeito destes parâmetros sobre o perfil peptídico, nenhuma publicação de outros autores foi encontrada. Desta maneira, os resultados aqui obtidos foram comparados com os encontrados, anteriormente, no mesmo laboratório para a hidrólise do soro do leite e do WPC. Para estas duas matérias-primas, foram utilizadas as mesmas enzimas do presente trabalho (subtilisina e pancreatina) e, para cada enzima, foram testados os efeitos da relação E:S (1:100, 2:100 e 4:100) e da concentração da matéria-prima (10% e 15%) sobre o perfil peptídico.

No caso de se utilizar o soro de leite e a subtilisina, foi observado que, ao contrário do presente trabalho, não foram encontradas diferenças entre os perfis peptídicos obtidos com uma relação E:S de 1:100 e 2:100 e, ainda, este menor valor de E:S levou a um perfil peptídico inferior ao obtido com uma E:S de 4:100. Observou-se, também, que ao se utilizar a concentração mais elevada de substrato (15%), os resultados obtidos para as 3 frações foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho, uma vez que houve uma elevação dos teores de grandes peptídeos e de aminoácidos livres e uma redução na quantidade de di-tripeptídeos, quando comparados com a concentração de 10% (SOUZA et al., 2008).

Ao se utilizar a pancreatina para hidrolisar o soro do leite, observou-se que com o uso da menor relação E:S (1:100) obteve-se resultado semelhante ao do presente trabalho apenas para os di-tripeptídeos, cujos teores apresentaram uma elevação. Entretanto, este tratamento produziu uma maior quantidade de grandes peptídeos e menor conteúdo de aminoácidos livres, sendo estes resultados o oposto ao obtido no presente trabalho. Com relação à concentração da matéria-prima, observou-se que a utilização do maior valor (15%), diferentemente do presente trabalho, não alterou o teor de grandes peptídeos e, ainda, reduziu a quantidade de aminoácidos livres. Por outro lado, da mesma maneira como aqui observado, os teores de di-tripeptídeos sofreram uma redução (SOUZA et al., 2008).

Em outro estudo, utilizando uma subtilisina para hidrolisar as proteínas do WPC, observou-se que o emprego da menor relação E:S (1:100) produziu resultados opostos aos do presente trabalho, referentes a todas as três frações, uma vez que obteve-se um maior teor de grandes peptídeos, e menor conteúdo de di- e tripeptídeos e aminoácidos livres. Ao se avaliar o efeito da concentração da matéria-prima, foi observado que o uso de maior valor (15%) levou a resultados diferentes aos do presente trabalho, uma vez que não houve alteração dos teores de grandes peptídeos e de di- e tripeptídeos, enquanto que a quantidade de aminoácidos livres foi reduzida (AFONSO et al., 2008).

Ao se utilizar a pancreatina para hidrolisar as proteínas do WPC, observou-se que o emprego da menor relação E:S (1:100), levou a resultados semelhantes aos do presente trabalho, uma vez que reduziu o teor de grandes peptídeos e elevou os conteúdos de di- e tripeptídeos e aminoácidos livres. Com relação ao efeito da concentração do substrato, a única semelhança observada referente ao presente trabalho está associada à redução dos teores de di- e tripeptídeos. Para as outras duas frações, os resultados obtidos foram os opostos aos aqui encontrados, uma vez que obteve-se uma elevação dos teores de grandes peptídeos e uma queda dos aminoácidos livres (AFONSO, et al., 2008).

3.4 CORRELAÇÃO ENTRE PERFIL PEPTÍDICO E GRAU DE HIDRÓLISE

Estão apresentados na Tabela II.5 os dados referentes à correlação entre o grau de hidrólise e as frações peptídicas e de aminoácidos livres dos hidrolisados enzimáticos do WPC. Pode-se observar que existe correlação ($p < 0,05$) entre o grau de hidrólise e os teores de peptídeos e aminoácidos livres obtidos para os hidrolisados do WPC, entretanto, observa-se que esta correlação (r) apresentou fraca intensidade de associação, pois todos os valores apresentados encontram-se abaixo de 0,7, de acordo com o estabelecido por SAMPAIO (2002). A intensidade de associação entre as variáveis (grau de hidrólise e perfil peptídico), em termos absolutos, foi mais forte para a fração F1 (-0,523), o que poderia ser explicado, provavelmente, pelo menor desvio da linearidade observado ao se analisar esta correlação. Ressalta-se, ainda, que as frações F2, F3 e F4 apresentaram correlação positiva com o GH, enquanto que para a F1 foi negativa, conforme esperado, uma vez que com o aumento da taxa de hidrólise das proteínas do WPC, ocorre uma

diminuição do teor de grandes peptídeos e um aumento da quantidade de peptídeos menores e de aminoácidos livres.

Tabela II.5- Correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos do WPC.

Variáveis	r	p
GH com F1	-0.523	0.001
GH com F2	0.335	0.0455
GH com F3	0.452	0.0056
GH com F4	0.434	0.0081

r: correlação; p:determinado pelo teste *t-Student* com diferenças significativas para $p < 0,05$; GH: Grau de hidrólise; Frações cromatográficas: F1: grandes peptídeos; F2: Peptídeos médios; F3:di-tripeptídeo; F4: aminoácidos livres.

Para as demais frações, a correlação foi positiva, ou seja, uma maior taxa de hidrólise elevou os teores de peptídeos e de aminoácidos livres, ou seja, reduziu o tamanho das moléculas como era, igualmente, esperado. Além disso, é importante ressaltar o resultado obtido para fração F3, que apresentou associação relativamente forte com o grau de hidrólise ($r = 0,452$), uma vez que os di-tripeptídeos são, preferencialmente, absorvidos pelo trato gastrointestinal, quando comparados aos aminoácidos livres e grandes peptídeos (FRENHANI & BURINI, 1999).

4 CONCLUSÃO

O emprego da pancreatina e da protease do *A. oryzae* levaram à obtenção de hidrolisados protéicos que apresentaram o maior grau de hidrólise (30% e 27%, respectivamente) e os teores mais elevados de di- e tripeptídeos (9,12% e 16,14%, respectivamente). Estes resultados foram obtidos com uma relação E:S de 1:100 para

ambas as enzimas, e valores de 7% e 10%, respectivamente, para a concentração da matéria-prima. Além disso, o grau de hidrólise apresentou correlação com o perfil peptídico, com fraca intensidade de associação (0,7).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29 - 33, 1981.
- AFONSO, W.O. Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com elevado teor de di-tripeptídeos para utilização em nutrição clínica. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. p. 88 (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) *Official methods of analysis of AOAC international*. 16 ed. Arlington: AOAC International, 2v, 1995.
- BARBOSA, Cristiane Márcia da Silva ; MORAIS, Harriman Aley ; DELVIVO, Fernanda Meneghelo ; MANSUR, Herman S ; OLIVEIRA, Mônica Cristina de ; SILVESTRE, M. P. C. . Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. . *Journal Of The Science And Food Agriculture*, Inglaterra, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BIASUTTI, Eliza Augusta Rolim ; VIEIRA, Claudia Regina ; CAPOBIANGO, Michely ; SILVA, Viviane Dias Medeiros ; SILVESTRE, M. P. C. Study of some functional properties of casein: effect of pH and tryptic hydrolysis.. *International Journal of Food Properties*, v. 10, p. 173-183, 2007.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase PP e uso do carvão ativado. *Cienc. Agrotec.*, v.30, n.2, p.308-316, 2006.
- 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.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; ORNELLAS, C.B.D.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v.23, n.1, p.17-25, 2004.
- CLEMENTE, A.; CHAMBERS, S.J. Development and production of hypoallergenic protein hydrolysates for use in infant formulas. *Food Allergy and Intolerance*, 1, p. 175-190, 2000.
- 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.
- 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.
- DIAS, D.R.; VILELA, D.M.; SILVESTRE, M.P.C.; SCHWAN, R.F. Alkaline protease from *Bacillus* sp. Isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol Biotechnol*, 2008.

- FORTES-DIAS, C. L. ; ROGANA, E. . Autolysis of Beta -trypsin at pH 3.0.. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Brasil, v. 19, p. 11-18, 1986.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41:1; 79-89, 2000.
- 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.
- HUNG, N.D.; VAS, M.; CHEKE, E. Y. BOLCSI, S.Z.A. Relative tryptic digestion rates of food proteins. *J. Food Sci.*,49, p. 1535-1542, 1984.
- KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr Res.*, v.33, p.343-347,1989.
- LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol* 1994; 48 (10), p. 68-71, 1994.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. . *British Food Journal*, Inglaterra, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- 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.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. Anal.*, v.13, n.5, p.843-857, 2000.
- 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.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.Ed. Belo Horizonte: FEPMUZ, 2002.
- SILVA, Viviane Dias Medeiros ; MARCO, Leticia Misságia de ; AFONSO, Wendel de Oliveira ; LOPES, Daniella Cristine Fialho ; 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., 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.*, 42, 2783-2789, 1994b.
- 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.
- SOARES, Rosângelis Del Lama ; CAPOBIANGO, Michely ; BIASUTTI, Eliza Augusta Rolim ; SILVESTRE, M. P. C. . Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnology*, v. 21, p. 45-56, 2007.
- SOUZA, M.W.S.; BIASUTTI, E.A.R.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. *American Journal of Food Technology*, p. 315-324, 2008.
- 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.

CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS

Na primeira etapa deste trabalho, as condições de reação testadas para a hidrólise enzimática do concentrado protéico do soro do leite (WPC), assim como o emprego do carvão ativado (CA), como meio adsorvente, levaram à obtenção de hidrolisados enzimáticos com teor reduzido de fenilalanina (Phe), tendo o percentual de remoção ultrapassado os 80%. Este procedimento deu origem a um hidrolisado protéico que poderia ser utilizado, em uma quantidade de 25,4g/100g, como alimento ou ingrediente alimentar na dieta de fenilcetonúricos.

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

Dentre as condições testadas para a remoção de Phe nos hidrolisados, o melhor resultado foi obtido ao se empregar a pancreatina na relação E:S de 1:100, concentração da matéria-prima de 10% (p/v) e tempo de reação de 5 horas, tendo atingido 81,3% de remoção e o teor final de Phe de 394,1 mg/100g de hidrolisado. Sugere-se o desenvolvimento de uma bebida que forneça 8,28g/100g de proteína, adicionada de carboidratos e aromatizantes, para o oferecimento aos pacientes portadores de fenilcetonúria, sendo as porções recomendadas de acordo com a tolerância de cada paciente ao aminoácido fenilalanina, ou ainda, a utilização do hidrolisado como um ingrediente alimentar para a produção de bebidas lácteas, produção de ricota e como ingrediente na produção de alimentos industrializados diversos.

Na segunda etapa, foi possível caracterizar os hidrolisados protéicos de WPC, quanto ao grau de hidrólise e perfil peptídico, sendo observado que as condições hidrolíticas testadas neste estudo levaram à obtenção de hidrolisados com percentuais variados de grau de hidrólise e, ainda, ricos em di- e tripeptídeos e aminoácidos livres e com baixo teor de grandes peptídeos. Ou seja, a partir do WPC, foi possível obter

produtos de melhor valor nutricional, uma vez que na forma de pequenos peptídeos a proteína é mais completa e rapidamente absorvida pelo organismo.

Os hidrolisados obtidos pela ação da pancreatina e da protease do *A. oryzae*, ambos na relação E:S de 1:100 e concentração da matéria-prima de 10%, apresentaram os maiores valores de grau de hidrólise (30% e 27%, respectivamente). Em relação ao perfil peptídico, os melhores resultados foram obtidos pela ação da protease do *A. oryzae* e pancreatina, ambas com relação E:S de 1:100 e concentração da matéria-prima de 10% e 7%, respectivamente, uma vez que levaram à formação de uma maior quantidade de di- e tripeptídeos (16,14% e 9,12%, respectivamente) e menor teor de grandes peptídeos (20%, em média).

Considerando-se os resultados aqui obtidos, sugere-se a realização de estudos envolvendo o emprego de condições hidrolíticas diferentes das que aqui foram utilizadas, que poderão incluir o teste de outras enzimas de diversas origens (animal, vegetal ou microorganismos), na busca de hidrolisados protéicos com teores ainda mais elevados de di- e tripeptídeos. Além disso, outras fontes protéicas poderiam ser utilizadas como matéria-prima. Nesse caso, torna-se importante avaliar economicamente a escolha do substrato.

Estes resultados levam à conclusão de que os hidrolisados do WPC 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 de diversas propriedades bioativas destes hidrolisados protéicos, assim como foi feito com os hidrolisados obtidos a partir das proteínas do 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.

Em relação à avaliação da existência de correlação entre o grau de hidrólise e o perfil peptídico, observou-se que existe correlação entre estes dois parâmetros, entretanto, com fraca intensidade de associação. A realização deste estudo, empregando-se um número maior de amostras (hidrolisados analisados), poderia elevar a precisão quanto à

avaliação da associação entre estas variáveis, sendo importante, neste caso, considerar o custo do trabalho, tanto do ponto de vista econômico, quanto em relação ao tempo de execução.