

MARIANA WANESSA SANTANA DE SOUZA

**HIDRÓLISE PROTÉICA E REMOÇÃO DE
FENILALANINA, NA OBTENÇÃO DE LEITE PARA
PACIENTES FENILCETONÚRICOS: EMPREGO
DA PROTEASE DO *Aspergillus sojae* E DA
SUBTILISINA**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009

MARIANA WANESSA SANTANA DE SOUZA

**HIDRÓLISE PROTÉICA E REMOÇÃO DE
FENILALANINA, NA OBTENÇÃO DE LEITE PARA
PACIENTES FENILCETONÚRICOS: EMPREGO
DA PROTEASE DO *Aspergillus sojae* E DA
SUBTILISINA**

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 Coelho
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

MARIANA WANESSA SANTANA DE SOUZA

**“HIDRÓLISE PROTÉICA E REMOÇÃO DE FENILALANINA, NA
OBTENÇÃO DE LEITE PARA PACIENTES FENILCETONÚRICOS:
EMPREGO DA PROTEASE DO *Aspergillus sojae* E DA SUBTILISINA”**

APROVADA EM 30 DE MARÇO DE 2009

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. ANA LÚCIA PIMENTA STARLING


Prof. Dr. SÉRGIO DUARTE SEGALL


Profa. Dra. ACCÁCIA JÚLIA GUIMARÃES PEREIRA


Profa. Dra. MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE
Orientadora

*À Deus, aos meus pais,
à minha família e aos meus mestres.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por me guiar e me acompanhar nas minhas escolhas.

À Prof. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre pela orientação deste trabalho, pelos ensinamentos científicos e humanos, pela confiança, pelo profissionalismo, e especialmente por ter me dado a oportunidade de estudar, trabalhar e aprender com pessoas tão especiais.

Aos professores membros da banca examinadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Pimenta Starling, Prof. Dr. Sérgio Duarte Segall e Profa. Dra. Accácia Júlia Guimarães Pereira. Muito obrigada por todas as correções, sugestões e contribuições para o trabalho.

À minha mãe, presença constante em minha vida, sempre disposta a ouvir e tentar entender o meu amor pela pesquisa e pela ciência. Muito obrigada Mãe, pela paz que você me transmite, pelos seus ensinamentos e dedicação às suas filhas e a toda a sua família.

À minha irmã, Lu, pelo carinho, apoio, amizade e convivência.

Ao meu pai e a toda a minha família, por sempre torcerem por mim e pelo meu sucesso. Obrigada a todos.

Ao Bruno, pela paciência, pelo companheirismo, e pela convivência. Muito obrigada.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, que direta ou indiretamente, contribuíram com minha formação acadêmica e científica.

Às professoras Ionara Vieira e Deila Jordão, que apesar da distância, sempre me orientaram, me incentivaram, e torceram por mim. Se não fosse pelos conselhos de vocês, talvez nada disso seria possível!

À Tati, amiga, companheira de faculdade e de sonhos! Obrigada pela torcida.

À toda equipe do Laboratório de Bromatologia/Pesquisa. Muito obrigada por me acolherem e me ensinarem tanto!

Às Letícias, Menicucci e Lima, que tanto me ajudaram na parte experimental deste trabalho. Vocês foram essenciais!

À querida Vivi, que sem ela o Laboratório fica “vazio”. Obrigada por sua ajuda incondicional, pela sua humildade e paciência.

Ao Carlos e Wendel, os meninos do Laboratório, que me receberam de braços abertos e que me ensinam tanto, todos os dias. Muito obrigada pelo companheirismo e pela confiança.

Aos colegas de mestrado: Maitê e Mauro. As futuras doutoras: Raquel e Dani. Todos sempre muito dispostos a ajudar e contribuir com este trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

Ao funcionário Marcos pela constante convivência e ajuda.

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

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

À todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho

“A vida é generosa e, a cada sala que se vive,
Descobre-se tantas outras portas.
E a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas.”

Içami Tiba

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1 HIPERFENILALANINEMIAS	18
1.1 Considerações Históricas.....	19
1.2 Classificação.....	20
1.3 Fenilcetonúria	21
1.4 Diagnóstico	23
1.5 Tratamento	24
2 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS PARA FENILCETONÚRICOS	25
2.1 Substitutos protéicos.....	27
2.1.1 Misturas de aminoácidos.....	27
2.1.2 Proteínas hidrolisadas com baixo teor de fenilalanina.....	28
3 LEITE	29
3.1 Composição e características físico-químicas	30
3.2 Proteínas do leite.....	31
3.2.1 Caseínas.....	31
3.2.2 Proteínas do soro - Albuminas e globulinas.....	32
4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	33
4.1 Importância	34
4.2 Proteases	35
4.3 Fatores interferentes	36
5 REMOÇÃO DE FENILALANINA	38
5.1 Métodos de remoção.....	38
5.2 Avaliação da eficiência da remoção	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
TRABALHO EXPERIMENTAL	53
CAPÍTULO I	55
OBTENÇÃO DE LEITE COM TEOR REDUZIDO DE FENILALANINA PELA AÇÃO DA PROTEASE DO <i>Aspergillus sojae</i> E USO DO CARVÃO ATIVADO	55
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1 MATERIAL	58
2.2 MÉTODOS	59
2.2.1 Determinação da composição química do leite.....	59
2.2.2 Hidrólise enzimática das proteínas do leite	59
2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite.....	60
2.2.6 Análise estatística	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE.....	62

3.2 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA	63
3.3 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA	65
3.3.1 Efeito do tempo de reação.....	66
3.3.2 Efeito da temperatura de reação	67
3.3.3 Efeito da relação enzima:substrato	69
3.3.4 Efeito da relação proteína:carvão ativado.....	70
4 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
CAPÍTULO II	78
EMPREGO DA PROTEASE DO <i>Bacillus subtilis</i> E DO CARVÃO ATIVADO NA OBTENÇÃO DE LEITE PARA PACIENTES FENILCETONÚRICOS.....	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT.....	79
1 INTRODUÇÃO	80
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1 MATERIAL	82
2.2 MÉTODOS	82
2.2.1 Determinação da composição química do leite.....	82
2.2.2 Hidrólise enzimática das proteínas do leite	82
2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite.....	84
2.2.4 Efeito de alguns parâmetros sobre o preparo dos hidrolisados protéicos isentos de fenilalanina	84
2.2.6 Análise estatística	85
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE.....	86
3.2 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA	86
3.3 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA	89
3.3.1 Efeito do tempo de reação.....	89
3.3.2 Efeito da temperatura de reação	91
3.3.3 Efeito da relação enzima:substrato	92
3.3.4 Efeito da relação proteína:carvão ativado.....	93
4 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CAPÍTULO III	101
CONCLUSÕES GERAIS: COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EMPREGANDO-SE AS DUAS PROTEASES	101
1. EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA	101
2. EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA	101
2.1 EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO	101
2.2 EFEITO DA TEMPERATURA	102
2.3 EFEITO DA RELAÇÃO E:S.....	102
2.4 EFEITO DA RELAÇÃO PROTEÍNA:CARVÃO ATIVADO.....	103
3. COMPARAÇÃO DOS MELHORES RESULTADOS OBTIDOS PARA AS DUAS ENZIMAS	103
4. CONCLUSÃO	104
PERSPECTIVAS.....	105

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1: Classificação das diferentes formas de hiperfenilalaninemias de acordo com o nível sanguíneo de fenilalanina, apresentado no teste de sobrecarga.....	21
Tabela 2: Produção e consumo de leite no Brasil – 2000/2007.....	29
Tabela 3: Composição média do leite integral esterilizado.....	30

Capítulo 1

Tabela I.1: Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de leite e na remoção de fenilalanina	60
Tabela I.2: Composição química do leite.....	62
Tabela I.3: Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite	64

Capítulo 2

Tabela II.1: Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de leite e na remoção de fenilalanina	83
Tabela II.2: Composição química do leite.....	86
Tabela II.3: Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite	87

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1: Via de hidroxilação da fenilalanina.22

Trabalho Experimental

Figura 2: Principais etapas do trabalho experimental.....54

Capítulo 1

Figura I.1: Efeito do tempo de reação sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.....66

Figura I.2: Efeito da temperatura sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.68

Figura I.3: Efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. 69

Figura I.4: Efeito da relação proteína:CA sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.....71

Capítulo 2

Figura II.1: Efeito do tempo de reação sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.....90

Figura II.2: Efeito da temperatura sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.
.....91

Figura II.3: Efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos.
.....93

Figura II.4: Efeito da relação proteína:CA sobre a remoção de Phe dos hidrolisados...94

Capítulo 3

Figura III.1: Melhores resultados obtidos para as duas enzimas..... 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-La	α -lactalbumina
β-Lg	β -lactoglobulina
AO	Protease de <i>Aspergillus sojae</i>
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BH₄	Tetrahidrobiopterina
CA	Carvão ativado
E:S	Relação enzima e substrato
EDS	Espectrofotometria derivada segunda
HILIC	Cromatografia de interação hidrofílica
HPA	Hiperfenilalaninemia
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LCPUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
PA	Papaína
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PKU	Fenilcetonúria
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
QI	Quociente de Inteligência
UHT	Ultra High Temperature

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é uma desordem metabólica congênita na qual os indivíduos não tratados ainda nos primeiros meses de vida desenvolvem retardo mental irreversível, sendo o leite proibido na alimentação destes pacientes. Visando o desenvolvimento de leite com teor reduzido de Phe, para ser utilizado por pacientes fenilcetonúricos, foram testadas 32 condições de hidrólise enzimática das proteínas, empregando-se, separadamente, uma protease do *Aspergillus sojae* e uma subtilisina, como também, alguns parâmetros de remoção de Phe, usando o carvão ativado (CA) como meio adsorvente. Foram avaliados os efeitos do tempo e da temperatura de reação, assim como da relação enzima:substrato (E:S) e da relação proteína:CA, visando a redução dos custos e a adaptação do processo em larga escala. Após passagem do leite contendo proteínas hidrolisadas por coluna de CA, a Phe foi dosada por espectrofotometria derivada segunda (EDS). Desta forma, empregando-se a protease do *A. sojae*, o melhor resultado foi obtido ao se utilizar o tempo de reação de 3h, a temperatura de 50 °C, a relação E:S de 4:100 e a relação proteína:CA de 1:22, tendo atingido 64,6% de remoção e o teor final de Phe de 54,2mg de Phe/100 ml de leite. Já para a subtilisina, os parâmetros estudados que levaram ao maior teor de remoção de Phe foram quase todos os mesmos observados para a protease do *A. sojae*, exceto o tempo de reação, que foi de 5h, obtendo-se 75,9% de remoção, o que equivale a um teor final de 36,9mg de Phe/100 ml. Conclui-se, portanto, que as duas enzimas testadas, assim como as condições avaliadas, foram eficientes na obtenção de leite com teor reduzido de Phe, situando-se abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Palavras-chave: leite; proteínas, enzimas, hidrólise, fenilalanina; fenilcetonúria.

ABSTRACT

PROTEIN HYDROLYSIS AND PHENYLALANINE REMOVAL AIMING THE PREPARATION OF MILK FOR PHENYLKETONURICS PATIENTS: USE OF A PROTEASE FROM *Aspergillus sojae* AND A SUBTILISIN. Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disease in which the untreated patients can show irreversible mental retardation, and the use of milk by phenylketonuric's patients is forbidden . Aiming the development of milk with reduced Phe content to be used by phenylketonuric's patients with no restriction, 32 conditions of enzymatic hydrolysis were tested employing, separately, a protease from *Aspergillus sojae* and a subtilisin, as well as some parameters of Phe removal were also evaluated, employing activated carbon (AC) as adsorbent support. The effects of reaction time and temperature, as well as of the enzyme:substrate ratio (E:S) and protein:activated carbon ratio were evaluated, aiming cost reduction and adjustment of the process for the scaling-up. After passing the milk containing hydrolyzed proteins through an AC column, the Phe content was evaluated by second derivative spectrophotometry (SDS). Thus, using the protease from *A. sojae*, the best result was obtained by using a reaction time of 3h, a temperature of 50 °C, an E:S ratio of 4:100 and a protein:AC ratio of 1:22, reaching 64.6% of Phe removal and a final content of 54.2mg/100 ml of milk. For subtilisin, the studied parameters that led to the highest Phe removal were almost the same as those observed for the *A. sojae* protease, except for the reaction time, which was 5h, obtaining 75.9% of removal which corresponds to a final Phe content of 36.9mg /100 ml. It can be inferred that both tested enzymes and the evaluated conditions showed to be efficient in obtaining milk with reduced Phe content, which is bellow the maximum limit stated by the Brazilian legislation.

Key words: milk, proteins, enzymes, hydrolysis, phenylalanine, phenylketonuria.

INTRODUÇÃO

Pacientes com fenilcetonúria (PKU) não são capazes de converter a fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr) devido a uma deficiência ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase no fígado. Se não tratada, a PKU leva a concentrações elevadas de Phe e de seus metabólitos, no sangue e nos tecidos, podendo resultar em retardo mental grave e irreversível, além de epilepsia e desordens comportamentais (STARLING et al., 1999; VAN RIJN et al., 2007). O tratamento consiste na restrição da ingestão de Phe, através da redução drástica do consumo de proteínas naturais e da complementação da dieta com misturas de aminoácidos isentas de Phe. No entanto, tais formulações são importadas e de elevado custo, além de resultarem em uma dieta monótona, pouco atrativa e de difícil adesão (MIRA & MARQUEZ, 2000; VAN RIJN et al., 2007).

Como alternativa, pode-se incorporar à dieta dos fenilcetonúricos alimentos cuja fenilalanina foi, total ou parcialmente, removida, ampliando, assim, a oferta de produtos alimentícios para os pacientes, que devem suportar, diariamente, uma alimentação altamente restrita (MIRA & MARQUEZ, 2000, KANUFRE et al, 2001; CABRERA-PADILLA et al., 2009).

O leite constitui uma das principais fontes de proteínas da alimentação humana, sendo que o mais consumido é o leite de vaca. Apresenta, ainda, importantes teores de carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais, indispensáveis ao bom funcionamento do organismo (SGARBIERI et al., 1996; ORNELLAS, 2001). No entanto, considerando que a incorporação do leite na dieta dos fenilcetonúricos é proibida, é de grande interesse o desenvolvimento deste alimento com teores reduzidos de Phe, para que possa ser utilizado por estes pacientes.

Para a obtenção de leite com teor reduzido de Phe são necessárias duas etapas principais: a liberação da Phe por hidrólise química ou enzimática, e sua remoção por um meio adsorvente. A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, sendo que o tratamento enzimático vem sendo empregado no mesmo laboratório do presente trabalho, apresentando resultados bastante favoráveis para a remoção de Phe de diversas matérias-primas (LOPES et al., 2004, 2006, 2008; DE MARCO et al., 2005; SOARES et al., 2006; CAPOBIANGO et al., 2007; SILVA et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009; LOPES Jr., 2008)

Ressalta-se, ainda, que o tratamento enzimático do alimento, com proteases, leva à obtenção de proteínas hidrolisadas que apresentam uma série de vantagens sobre as misturas sintéticas de aminoácidos livres, tais como melhor tolerância, sabor e odor mais agradáveis, menor osmolaridade e melhor absorção, além de possuírem menor custo (MIRA & MARQUEZ, 2000; BIZZOTO et al, 2006a,b; CAPOBIANGO et al, 2006).

No que se refere à etapa de remoção, vale a pena salientar que o carvão ativado (CA) foi, anteriormente, utilizado com eficiência por este mesmo grupo de pesquisa para remover a Phe de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2006 e SOARES et al., 2006), soro de leite (DE MARCO, et al., 2005; DELVIVO et al 2006; SILVA et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), arroz em grãos (LOPES et al., 2008), farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009) e feijão (LOPES Jr., 2008).

A avaliação da eficiência da remoção de Phe é realizada por meio da determinação do teor de Phe, na matéria-prima e em suas proteínas hidrolisadas após o tratamento com CA. Diversos métodos são empregados para a quantificação da Phe, sendo que a Espectrofotometria Derivada Segunda (EDS) tem demonstrado ser uma técnica rápida, útil e confiável (GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988). Esta técnica foi, previamente, utilizada pelo mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho, tendo sido eficiente para avaliar a remoção de Phe dos diversos alimentos citados acima.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Obter um leite com teor reduzido de fenilalanina, para ser utilizado na alimentação de pacientes fenilcetonúricos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a determinação da composição química do leite integral;
- Testar várias condições de hidrólise protéica, empregando-se a protease do *Aspergillus sojae* (Capítulo I) e do *Bacillus subtilis* (Capítulo II);
- Avaliar o efeito de diversos parâmetros de hidrólise, como tempo e temperatura de reação e relação enzima:substrato, sobre a remoção de fenilalanina;
- Remover a fenilalanina do leite, empregando o carvão ativado como meio adsorvente;
- Avaliar o efeito da relação proteína:carvão ativado sobre a remoção de fenilalanina;
- Comparar os resultados obtidos com as duas proteases.

REVISÃO DE LITERATURA

1 HIPERFENILALANINEMIAS

As hiperfenilalaninemias (HPAs), nome genérico dado a elevados níveis de fenilalanina (Phe) no sangue, são as mais comuns desordens do metabolismo de aminoácidos (TRAHMS, 2002; MARCO & WAITZBERG, 2004; MIRA & MARQUEZ, 2000). O sistema de hidroxilação da Phe é extremamente complexo, no qual várias enzimas e coenzimas atuam coordenadamente. Segundo STRYER, (1998) os componentes principais deste sistema são a fenilalanina hidroxilase, a diidrobiopterina redutase e o cofator, tetrahidrobiopterina (BH₄).

As HPAs têm caráter autossômico recessivo e podem resultar de defeitos nos genes que codificam alguma dessas enzimas: a fenilalanina hidroxilase ou a diidrobiopterina redutase. Assim, a conversão da Phe em tirosina (Tyr) se torna ineficiente, levando a um acúmulo de Phe no organismo (SCRIVER et al., 1997; MIRA & MARQUEZ, 2000; MARCO & WAITZBERG, 2004; STRYER, 1988).

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

A incapacidade de metabolizar a Phe leva a uma diminuição nos níveis plasmáticos de tirosina e, conseqüentemente, à redução dos neurotransmissores formados a partir deste aminoácido, como dopamina, epinefrina e norepinefrina, o que pode levar ao retardo mental, manifestação clínica mais severa da doença. A produção de melanina também é afetada, podendo ocorrer clareamento da pigmentação da pele, cabelo e olhos (BURTIS & ASHWOOD, 1996; MIRA & MARQUEZ, 2000).

Podem ser encontrados diferentes tipos de hiperfenilalaninemias, de acordo com o erro metabólico envolvido, formando um grupo heterogêneo de doenças, incluindo a fenilcetonúria (PKU) clássica, PKU leve e variações de hiperfenilalaninemias, como a HPA transitória e a PKU atípica (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

A PKU atípica é uma desordem que ocorre devido a erros no metabolismo da coenzima tetrahydrobiopterina (BH_4), cofator essencial na hidroxilação de Phe, aumentando indiretamente os níveis de Phe sanguínea. A BH_4 é também requerida pela tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, enzimas que catalisam reações que precedem a síntese de neurotransmissores como a serotonina e as catecolaminas (dopamina) (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Essa variante faz com que uma pequena parcela de pacientes com deficiência da coenzima tetrahydrobiopterina redutase ou sintetase seja diagnosticada incorretamente com PKU clássica e submetida ao tratamento baseado nos níveis de Phe sanguíneos. Vários grupos de pesquisadores relatam que o tratamento inadequado faz com que o quadro neurológico e de retardo mental desses pacientes persista, ou mesmo se agrave, pois a dieta restrita em Phe não reverte os efeitos causados no sistema nervoso central pela deficiência dos neurotransmissores (MIRA & MARQUEZ, 2000).

O tratamento da PKU atípica consiste na administração simultânea de BH_4 , 5-hidroxitriptofano, L-dopa e inibidor de Dopa carboxilase, que então permitem a penetração da BH_4 no sistema nervoso central e a correção da biossíntese dos neurotransmissores (MIRA & MARQUEZ, 2000).

1.1 Considerações Históricas

O primeiro relato referente às hiperfenilalaninemias se deu em 1934, quando Folling, um médico e bioquímico norueguês, identificou o ácido fenilpirúvico na urina de dois irmãos institucionalizados com retardo mental e que apresentavam odor característico na urina. Posteriormente, descobriu que 1% da população internada na mesma instituição que os irmãos também excretavam o ácido fenilpirúvico. Em 1935, Penrose caracterizou a doença como sendo geneticamente transmissível de natureza autossômica recessiva, nomeando-a Fenilcetonúria. Jervis, em 1947, identificou o defeito metabólico na hidroxilação da fenilalanina em tirosina no tecido hepático de um paciente afetado (MARTINS et al., 1993; TRAHMS, 2002).

As primeiras tentativas de dietoterapia na fenilcetonúria datam de 1953 em uma criança de dois anos de idade na qual, após duas semanas de tratamento, desapareceu o cheiro característico na urina, normalizaram-se os níveis sanguíneos e urinários de Phe e melhorou o desenvolvimento neuro-psicomotor. Após dez meses de tratamento foram introduzidas cinco gramas de L-fenilalanina na dieta da criança, que

passadas seis horas da administração, respondeu com intensa agitação, e após 24 horas, esta não mais conseguia engatinhar (MARTINS et al., 1993; TRAHMS, 2002). Já em meados dos anos 60, fórmulas semi-sintéticas restritas em Phe tornam-se comercialmente disponíveis (TRAHMS, 2002).

A partir destas observações surgiram esforços no intuito de desenvolver um método diagnóstico para detectar a doença em recém nascidos, a fim de que fosse introduzido o tratamento antes dos primeiros sinais clínicos. Guthrie & Susi apresentaram, em 1963, o método de determinação de Phe através da inibição do crescimento do *Bacillus subtilis*, ou seja, quanto maior a concentração de Phe, maior o halo de inibição. Atualmente, nos testes de triagem neonatal são utilizados tanto o método de Guthrie & Susi como os métodos fluorométricos de dosagem de Phe (MARTINS et al., 1993). Assim, entre os anos de 1965 e 1970, os Estados Unidos adotaram programas de triagem neonatal para detectar a fenilcetonúria (TRAHMS, 2002).

No Brasil, a Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Saúde e prevê a triagem com detecção de casos suspeitos, confirmação diagnóstica, acompanhamento e tratamento de pacientes de casos identificados com fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doenças falciformes e outras hemoglobinopatias e fibrose cística (BRASIL, 2001).

Já, em Minas Gerais, o programa de triagem neonatal foi implantado em setembro de 1993, fruto de uma parceria entre a Secretaria de Estado da Saúde e a Faculdade de Medicina da UFMG, através do NUPAD – Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico, que foi credenciado pelo Ministério da Saúde como serviço de referência em triagem neonatal no estado (STARLING et al., 1999; NUPAD, 2008)

Em Minas Gerais, a Triagem Neonatal, conhecida como Teste do Pezinho, é realizada no quinto dia de vida, e atinge 100% dos municípios mineiros, contemplando aproximadamente 96% dos nascidos vivos do estado. Este programa garante tratamento e acompanhamento médico gratuitos e o fornecimento de medicamentos e dieta especiais (AGUIAR, 2004; NUPAD, 2008).

1.2 Classificação

Existem controvérsias quanto à nomenclatura utilizada para caracterizar as diferentes condições associadas a altas concentrações de Phe sanguíneas. No entanto, a classificação mais utilizada atualmente é apresentada na Tabela 1.

Sabendo-se que a concentração normal de Phe no sangue está usualmente entre 50 e 120 $\mu\text{mol/L}$, as diferentes formas de PKU são classificadas de acordo com o nível de Phe apresentado no teste de sobrecarga, que é realizado aos seis meses de idade (STARLING et al., 1999; HEDRIKSZ & WALTER, 2004; KANUFRE, 2006).

Tabela 1: Classificação das diferentes formas de hiperfenilalaninemias de acordo com o nível sanguíneo de fenilalanina, apresentado no teste de sobrecarga

Nível de fenilalanina	Classificação
Menor que 240 $\mu\text{mol/L}$	Hiperfenilalaninemia transitória
Entre 240 $\mu\text{mol/L}$ e 600 $\mu\text{mol/L}$	Hiperfenilalaninemia não PKU
Entre 600 $\mu\text{mol/L}$ e 1200 $\mu\text{mol/L}$	PKU leve
Acima de 1200 $\mu\text{mol/L}$	PKU Clássica

Fonte: STARLING et al., 1999; KANUFRE, 2006.

1.3 Fenilcetonúria

A Fenilcetonúria é uma desordem autossomal recessiva, causada pela deficiência ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), resultando em redução ou ausência da conversão da Phe em tirosina, e conseqüentemente, no aumento na produção de metabólitos, tais como, fenilactato, piruvato, ortohidroxi-fenilacetato e feniletilamina (RAMASWAMI & SMITH, 1997; STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000).

A Figura 1 apresenta a via de hidroxilação da fenilalanina que é um passo obrigatório e limitante na via catabólica que leva a completa oxidação da fenilalanina a CO_2 e a água.

O acúmulo desses metabólitos anormais e de Phe no plasma podem ocasionar graves conseqüências no sistema nervoso central, ainda durante a infância, assim como falhas no andar ou falar, tremor, microcefalia, falhas no crescimento e retardo mental, progressivo e irreversível (STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000).

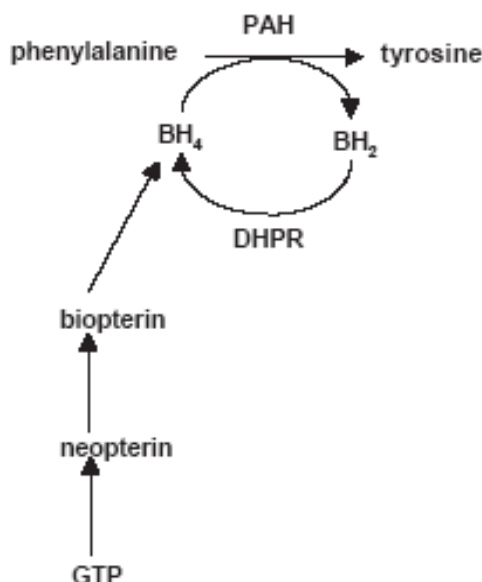


Figura 1: Via de hidroxilação da fenilalanina (HEDRIKSZ & WALTER, 2004).

Segundo MARCO & WAITZBERG (2004), um paciente pode perder, em média, cinco unidades de Quociente de Inteligência (QI) a cada 10 semanas de atraso no tratamento. Eles apresentam uma grave dificuldade de aprendizado e epilepsia, entretanto, o efeito prejudicial no QI torna-se progressivamente menor com o aumento de idade, e é mínimo após os 12-14 anos de idade (BEASLEY et al., 1994; HEDRIKSZ & WALTER, 2004).

Outra manifestação clínica da doença é a deficiência na pigmentação (cabelos e peles claras) devido à inibição completa da hidroxilação da tirosina pela tirosinase (primeira etapa na formação de melanina) (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Dentro do grupo de erros inatos do metabolismo de aminoácidos a fenilcetonúria é a manifestação clínica mais encontrada (MIRA & MARQUEZ, 2000). A PKU acomete aproximadamente 1:8.000 recém-nascidos na Europa Ocidental, em média 1:10.000 nos Estados Unidos, mas é muito mais rara em japoneses e quase desconhecida em africanos. Já no Brasil, a incidência é de uma criança fenilcetonúrica a cada 15.000 recém-nascidos, indicando a existência de variações de prevalência de acordo com a região geográfica (RAMASWAMI & SMITH, 1997; HEDRIKSZ & WALTER., 2004; MARCO & WAITZBERG, 2004).

MONTEIRO & CÂNDIDO (2006) realizaram uma pesquisa em 12 estados brasileiros e identificaram 1.225 casos. Admite-se que possam existir mais casos de fenilcetonúria no País, muitos ainda desconhecidos e sem tratamento, principalmente

em indivíduos com idade superior a 15 anos, os quais estariam com suas funções neurológicas comprometidas.

Considerando-se as informações divulgadas pelos órgãos oficiais e comparando-as com os resultados obtidos na pesquisa com os centros de tratamento para fenilcetonúria, somados à inexistência de controles de algumas regiões e ao pouco tempo da obrigatoriedade do teste para a detecção da doença, conclui-se que não se tem conhecimento de todos os casos brasileiros, principalmente daqueles com mais de 15 anos de idade (MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006).

Estudo desenvolvido na Universidade Federal de Minas Gerais demonstrou que a incidência de Fenilcetonúria em Minas Gerais é 1:21.175 nascidos vivos (MARTINS, 2005).

1.4 Diagnóstico

Os níveis de Phe sanguínea são normais ao nascimento em crianças portadoras de PKU, no entanto esses níveis aumentam rapidamente a partir dos primeiros dias de vida. Porém a criança é aparentemente normal durante os primeiros meses, sendo que os sinais de atraso no desenvolvimento aparecem apenas por volta do terceiro ou quarto mês. As crianças tornam-se inquietas, irritadas e podem apresentar convulsões, além de outros sintomas. Assim faz-se necessária a realização de exames em todos os recém-nascidos, preferencialmente entre o terceiro e o sétimo dia de vida, independentemente da história de prematuridade, alimentação recebida, uso de medicamentos ou internação hospitalar (MIRA & MARQUEZ, 2000; SOUZA et al., 2002; HEDRIKSZ & WALTER, 2004).

Os métodos de dosagem de Phe no sangue capilar de recém-nascidos são bastante confiáveis e sensíveis. A análise da enzima fenilalanina hidroxilase não é necessária, já que o procedimento requerido é muito invasivo, pois deve ser realizada uma biópsia de tecidos hepáticos (HEDRIKSZ & WALTER, 2004).

Em Minas Gerais, a conduta diagnóstica baseia-se na triagem neonatal, em que recém-nascidos com exames suspeitos para fenilcetonúria ($\geq 240 \mu\text{mol/L}$) são encaminhados ao Ambulatório de Fenilcetonúria do Hospital das Clínicas da UFMG para esclarecimento diagnóstico e tratamento, se necessário. Recém-nascidos com níveis sanguíneos de Phe $\geq 600 \mu\text{mol/L}$ no dia da primeira consulta, são imediatamente tratados (STARLING et al., 1999).

Aos seis meses de idade, é realizada a confirmação diagnóstica, pelo teste de sobrecarga de Phe, que consiste na ingestão normal de Phe, calculada em 180mg/Kg/dia, durante três dias seguidos. De acordo com o resultado, confirma-se o diagnóstico e classifica-se a PKU em leve (entre 600 e 1200 $\mu\text{mol/L}$) ou clássica ($>1200 \mu\text{mol/L}$). Pode, ainda, haver resultados entre 240 e 600 $\mu\text{mol/L}$, que permitem o diagnóstico de hiperfenilalaninemia não-PKU e resultados de Phe $<240 \mu\text{mol/L}$, diagnosticados como hiperfenilalaninemia transitória, que ocorrem com frequência muito baixa (STARLING et al., 1999; KANUFRE, 2006).

As metodologias laboratoriais utilizadas na triagem e no diagnóstico da PKU são variáveis de um local para o outro. Os métodos qualitativos, ou semi-quantitativos, são: o Teste de Guthrie, em que um pequeno disco de papel contendo excesso de Phe provoca a inibição do crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* em um meio de cultura; e a cromatografia de aminoácidos em camada delgada, que permite identificar, além do aumento de Phe, o aumento de outros aminoácidos, e assim detectar outros distúrbios metabólicos. Os métodos quantitativos são a análise fluorimétrica, a espectrometria de massa e métodos enzimáticos. As principais vantagens dos métodos qualitativos são o baixo custo e a facilidade de realização, enquanto que os quantitativos são mais sensíveis e específicos, ou seja, produzem menos casos falso-positivos e falso-negativos (MIRA & MARQUEZ, 2000; SOUZA et al., 2002).

1.5 Tratamento

Assim que for diagnosticada a PKU, os pacientes devem ser tratados e acompanhados periodicamente, em centros especializados em desordens metabólicas. Em Minas Gerais, o NUPAD – Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG, coordena todas as ações de tratamento dos pacientes. Assim, os pacientes com suspeita ou diagnóstico de fenilcetonúria são acompanhados pelo pediatra, mensalmente no primeiro ano, a cada dois meses no segundo ano, e semestralmente após os dois anos de idade (STARLING et al., 1999).

O tratamento da PKU é basicamente dietético, e consiste na redução dos níveis plasmáticos elevados de Phe para concentrações consideradas não lesivas ao sistema nervoso, de acordo com a faixa etária do paciente. Em geral, estes limites são, no mínimo, duas vezes superiores aos encontrados em indivíduos normais, e permitem a manutenção de uma dieta menos restrita em Phe (STARLING et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000; HEDRIKSZ & WALTER, 2004; MARCO & WAITZBERG, 2004).

A intenção da dieta pobre em Phe é fornecer ao organismo apenas as quantidades imprescindíveis do aminoácido, de acordo com a idade e os níveis sanguíneos de Phe, para a síntese de proteínas, regeneração e crescimento normal da criança (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Isto é alcançado por meio de uma restrição severa a proteínas naturais, já que a maioria das crianças com fenilcetonúria pode tolerar menos do que 500 mg de fenilalanina em 24 h. Isso gera a necessidade da utilização de uma outra fonte artificial de aminoácidos essenciais e não essenciais, e/ou na produção e disponibilização de alimentos adequados a esses pacientes (HEDRIKSZ & WALTER, 2004).

A necessidade do controle da dieta e dos níveis de Phe é bem estabelecida na infância. A interrupção prematura do tratamento põe em risco as funções cognitiva e emocional, incluindo a perda progressiva do QI, dificuldade de aprendizado, distúrbios de atenção e comportamentais (MIRA & MARQUEZ, 2000; MARCO & WAITZBERG, 2004).

2 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS PARA FENILCETONÚRICOS

No primeiro ano de vida, as necessidades de Phe são relativamente altas devido ao rápido crescimento da criança, uma vez que 50% da fenilalanina ingerida por uma criança normal de um ano de idade é utilizada para síntese protéica (MIRA & MARQUEZ, 2000). Assim, o aleitamento materno pode ser encorajado, utilizando-se fórmulas isentas de Phe, seguidas de quantidades específicas de leite materno, de acordo com os níveis sanguíneos de Phe, a fim de garantir quantidades suficientes do aminoácido para promover o crescimento ideal das crianças (HEDRIKSZ & WALTER, 2004).

O leite materno é rico em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFAs), importantes no desenvolvimento neuronal. Pesquisas têm demonstrado pequenas reduções na função visual e no desenvolvimento neurológico em crianças fenilcetonúricas que não receberam alimentos fontes de LCPUFAs no primeiro ano de vida. Atualmente, fórmulas comerciais estão sendo acrescidas de LCPUFAs em sua composição, mas os resultados a longo prazo ainda estão sendo investigados (HEDRIKSZ & WALTER, 2004).

A elevação sérica de Phe pode ser atribuída à ingestão do aminoácido em quantidades além das necessidades para o crescimento, ou ingestão de dieta aquém

das necessidades diárias, estimulando o catabolismo muscular para atingir, por meio da neoglicogênese, a energia necessária (MARCO & WAITZBERG, 2004).

A fenilalanina prescrita na dieta varia de acordo com os níveis séricos deste aminoácido e, por isso, são monitorados frequentemente. A quantidade de calorias e de líquidos é a mesma recomendada para indivíduos normais. Em relação aos micronutrientes, exceção feita para ferro e zinco, não há diferença em relação às recomendações feitas para crianças sem fenilcetonúria. A dieta do fenilcetonúrico é muito pobre em ferro com boa disponibilidade, e sua absorção pode estar alterada pela relação com outros micronutrientes na luz intestinal. Assim, recomenda-se a suplementação de ferro elemento, na dose de 1 a 2mg/kg/dia durante o tratamento (KANUFRE et al., 2001)

FISBERG et al. (1999) realizaram um estudo sobre a ingestão alimentar de crianças com PKU e observaram que estas apresentavam consumo de proteínas dentro da normalidade. No entanto, as calorias, cálcio, ferro, zinco e cobre estavam abaixo do que é recomendado, enfatizando-se a importância da vigilância nutricional de pacientes fenilcetonúricos.

O planejamento dietético da PKU consiste em prescrição dietética com baixa quantidade de Phe, geralmente associadas a fórmulas industrializadas isentas de Phe. A fórmula para PKU é associada com fórmula láctea para prover proteínas de alto valor biológico, promovendo o crescimento adequado da criança. Os outros alimentos são introduzidos de acordo com a idade da criança e sempre controlando a ingestão total de Phe (MARCO & WAITZBERG, 2004).

Os alimentos permitidos na alimentação dos fenilcetonúricos são, na sua maioria, os que devemos restringir na dieta de crianças normais. Dentre estes, alguns devem ser estimulados, tais como: balas, pirulitos, sorvetes de frutas, sucos artificiais, refrigerantes, farináceos oriundos da mandioca, e temperos, como vinagre, mostarda e pimenta. Considerando, que a oferta calórica adequada é fator essencial ao controle dos níveis séricos de Phe, esta recomendação torna-se necessária (ACOSTA & YANNICELLI, 1997; MARCO & WAITZBERG, 2004).

Os alimentos com médios teores de Phe devem ser fornecidos na dieta, pois são importantes para assegurar a saciedade e a oferta calórica adequada, evitando assim, possíveis transgressões. As quantidades destes alimentos são determinadas pela idade, tolerância individual e pelos níveis séricos apresentados periodicamente. Como exemplos destes alimentos temos: massas: (macarrão sem ovos), arroz, angu, farofa, raízes e tubérculos (batata inglesa, batata doce, batata baroa, mandioca, cará,

inhame), legumes (abóbora, abobrinha, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, chuchu, couve-flor, jiló, quiabo, repolho, vagem), folhosos e outros vegetais (acelga, alface, almeirão, couve, agrião, mostarda, pimentão, tomate, pepino, cebola), além de frutas em geral (ACOSTA & YANNICELLI, 1997; MARCO & WAITZBERG, 2004).

Os alimentos com altos teores de Phe não são permitidos em nenhuma circunstância, uma vez que até pequenas quantidades dos mesmos podem provocar alterações drásticas nos níveis séricos de Phe, além de predispor o paciente fenilcetonúrico a repetir este comportamento, transgredindo sua dieta. Dentre esses alimentos estão as carnes e derivados de qualquer tipo, as leguminosas (feijões, ervilhas, soja, grão de bico, lentilha), leite e derivados, assim como ovos, nozes, salgadinhos em pacotes, gelatinas, bolos, salgados, farinha de trigo, pães em geral, pão de queijo, biscoitos (ACOSTA & YANNICELLI, 1997; MARCO & WAITZBERG, 2004).

Produtos alimentícios, contendo adoçantes artificiais à base de aspartame, não devem ser utilizados na dieta, uma vez que o aspartame é um dipeptídeo do éster metílico de Phe e aspartato (MARCO & WAITZBERG, 2004).

2.1 Substitutos protéicos

Em pacientes com PKU é necessário o uso de substitutos protéicos sintéticos para fornecer a quantidade diária de proteína, necessária ao crescimento e desenvolvimento adequados, e para controlar os níveis séricos de Phe. Estes substitutos podem ser divididos em dois grupos: misturas de L-aminoácidos e proteínas hidrolisadas com baixo teor de Phe (MILUPA, 1995; CLEMENTE, 2000; SANTOS et al., 2003). Entretanto, no Brasil, apenas a mistura de aminoácidos encontra-se disponível, através da importação.

2.1.1 Misturas de aminoácidos

As fórmulas encontradas no mercado para tratamento da PKU são constituídas de misturas de aminoácidos sintéticos, isentas de Phe, podendo ser acrescidas de carboidratos, gorduras, vitaminas, minerais e elementos traço para suprir as necessidades nutricionais de diversas faixas etárias, porém são isentas de proteínas intactas, tendo como fonte de nitrogênio, exclusivamente aminoácidos livres (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

Do ponto de vista sensorial, essas misturas possuem odor e paladar desagradáveis e sua ingestão, que deveria ocorrer em pequenas porções durante o dia, frequentemente é feita de uma só vez, com prejuízo na utilização biológica e com aumento da metabolização dos aminoácidos por via oxidativa. O consumo dos aminoácidos em dose única pode resultar em náuseas, vômitos, tontura e diarreia. Além disso, as misturas de aminoácidos sintéticos também são indesejáveis do ponto de vista do equilíbrio osmótico, pois causam hiperosmolaridade do trato gastrointestinal, resultado em absorção ineficiente pelo organismo (MIRA & MARQUEZ, 2000; MaCDONALD et al., 2003).

Apesar desses produtos oferecerem facilidade na prescrição e distribuição aos pacientes, eles resultam em uma dieta dispendiosa, monótona e pouco palatável. O reconhecimento desses problemas faz com que países como a Inglaterra e os Estados Unidos recomendem investimentos em pesquisa e tecnologia para desenvolvimento de novos produtos de melhor aceitação (CLEMENTE, 2000; MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

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

2.1.2 Proteínas hidrolisadas com baixo teor de fenilalanina

Como alternativa à alimentação com as misturas de aminoácidos podem ser utilizadas proteínas hidrolisadas (incorporadas ou não a outros alimentos) para tratamento clínico de pacientes com desordens específicas na digestão, absorção e metabolismo de aminoácidos, pois prevêem algumas vantagens, como menor custo e maior facilidade na administração (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

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

A ingestão de proteínas hidrolisadas apresenta vantagens relacionadas ao seu teor de oligopeptídeos. A absorção de di- e tripeptídeos é mais rápida e completa que

aquela observada para uma mistura equivalente de aminoácidos (GRIMBLE et al., 1986; ZIEGLER et al., 1990; FRENANHI & BURINI, 1999; SHIMAMURA et al., 1999). Além disso, proteínas hidrolisadas apresentam menor osmolaridade do que as misturas de aminoácidos, reduzindo a incidência de diarreia osmótica (FURST et al., 1990; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994).

3 LEITE

O leite é o produto da secreção das glândulas mamárias dos mamíferos e constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades. O leite é praticamente o único alimento para os animais e humanos na primeira etapa da vida, sendo que o mais usado na alimentação humana é o leite de vaca, seguindo-se o de cabra (SGARBIERI et al., 1996; ORNELLAS, 2001).

Na tabela 2 estão citados os dados de produção e consumo de leite no Brasil, do ano de 2000 a 2007, demonstrando o aumento expressivo da produção neste período.

Tabela 2: Produção e consumo de leite no Brasil – 2000/2007

Ano	Produção (milhões de litros)	Consumo per capita (quilo/habitante/ano)
2000	19.767	72,3
2001	20.510	69,7
2002	21.644	68,3
2003	22.254	68,1
2004	23.478	69,2
2005	25.000	70,8
2006	25.398	72,7
2007	26.441	77,0

Fonte: EMBRAPA, 2008

3.1 Composição e características físico-químicas

O leite é um alimento contendo cerca de 86% de água. É constituído por mistura de várias substâncias: lactose e minerais em solução, proteínas em forma coloidal (estando a caseína dispersa e a albumina e globulina em solução); gorduras em forma de emulsão, também dispersas no líquido; vitaminas e gases também em solução. A cor esbranquiçada do leite deve-se à caseína e aos fosfatos de cálcio e o tom verde-amarelo do soro deve-se à lactoflavina (vitamina B₂) (ORNELLAS, 2001).

A composição do leite é bastante variável, em espécies diferentes, particularmente no que diz respeito aos teores de proteína, de gordura e lactose (SGARBIERI et al.,1996). A Tabela 3 apresenta os valores médios de composição do leite de vaca.

Tabela 3: Composição média do leite integral esterilizado

Componente	Teor
Água	87,6%
Proteína	3,3%
Gordura	3,6%
Carboidrato	4,7%
Cálcio	0,12%
Vitamina A	50 mg/100g
Vitamina D	2 mg/100g
Vitamina B1	30 mg/100g
Vitamina B2	150 mg/100g
Ácido Pantotênico	350 mg/100g
Ácido nicotínico	100 mg/100g
Vitamina B6	25 mg/100g
Biotina	1,25 mg/100g
Vitamina B12	Traços
Vitamina C	1,0mg/100g

Fonte: ITAL, 2007

A composição do leite é diferente para cada raça e varia também de acordo com diversos fatores, tais como a alimentação do animal, a estação do ano e a época de lactação. Por exemplo, em relação às oscilações na composição do leite de vaca, por 100 mL, as variações podem ser: proteínas de 3 a 4g (caseína 2,87 e albumina 0,56); lipídeos de 3 a 6g; glicídeos de 4,6 a 5g, minerais de 0,7 a 0,75g; vitaminas A de 97 a 785 U.I., C de 0,5 a 6,6 mg, B₂ de 0,65 a 100 mg e niacina de 0,05 a 0,5 mg (segundo diferentes tabelas) (ORNELLAS, 2001).

3.2 Proteínas do leite

As proteínas do leite bovino são usualmente divididas em dois grupos principais: caseínas (aproximadamente 79,5%), caracterizada por suas insolubilidade em pH 4,6 e 20 °C, e proteínas do soro do leite (19,3%). Outra classe (1,2%) corresponde ao conjunto de proteínas associadas aos glóbulos de gordura, enzimas, proteínas originárias do sangue e uma fração polipeptídica (proteose-peptona) (LÉONIL et al.,2000).

3.2.1 Caseínas

Caseína pode ser definida, de maneira simplificada, como a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado a um pH 4,6 a 20 °C. As proteínas que permanecem em solução, nestas condições, podem ser obtidas por precipitação com sulfato de amônio (SGARBIERI et al.,1996). Seu teor varia de 27 a 34 g/L de leite, na relação de 4:1:4:1 correspondendo às quatro frações: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína. A presença de fósforo nas caseínas permite classificá-las como fosfoproteínas (CHEFTEL et al.,1989; SWAISGOOD, 1993; SGARBIERI et al.,1996; WALSH & BROWN, 2000)

As frações da caseína (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) encontram-se sob a forma de complexos macromoleculares esféricos altamente hidratados, denominados de micelas, contendo uma parte mineral, composta principalmente por fosfato e cálcio. Na micela também se encontram quantidades substanciais de magnésio e certa quantidade de citrato. Além do cálcio, que está ligado aos grupos ortofosfato das caseínas, também pode-se encontrar pequenas quantidades de outros cátions. Devido a sua estrutura macromolecular tão particular, as caseínas são facilmente isoladas por centrifugação ou precipitação isoelétrica em pH 4,6 (CHEFTEL et al.,1989; SWAISGOOD, 1993).

A caseína apresenta um elevado valor nutricional, apesar de ser ligeiramente deficiente nos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). É interessante ressaltar que devido à sua estrutura micelar esponjosa é facilmente digerida e susceptível à ação catalítica de todas as proteinases conhecidas (ROBINSON, 1991; SWAISGOOD, 1993). A caseína e seus derivados têm tradicionalmente provido a indústria com ingredientes importantes para a textura e aparência, bem como para o enriquecimento nutricional de muitos alimentos processados (SMITHERS & BRADFORD, 1991). Os hidrolisados de caseína contendo pequenas frações peptídicas e aminoácidos livres são comumente utilizados em alimentos dietéticos, fórmulas infantis e como agentes reforçadores do sabor (ZHANG et al.,1992).

3.2.2 Proteínas do soro - Albuminas e globulinas

Quando a caseína é removida do leite, o líquido remanescente recebe o nome de soro de leite. Se a remoção da caseína é feita pela adição de ácido (pH 4,6) o soro se denomina “soro ácido”, se feito pela ação da enzima renina teremos o “soro doce” que contém em geral, maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres resultantes da ação da renina sobre a caseína (SGARBIERI et al.,1996).

Devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais, o valor biológico das proteínas do soro é alto se comparado ao de outras proteínas. Além disso, as proteínas do soro contêm uma alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Segundo HA & ZEMEL (2003), a abundância de leucina no soro é de particular interesse, uma vez que este aminoácido tem sido identificado como iniciador da síntese protéica muscular. Em razão do seu relativo excesso em aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina, isoleucina), as proteínas do soro são suplementos efetivos para proteínas vegetais que são deficientes nestes aminoácidos (WALZEN et al.,2002).

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

As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas do leite. As duas principais proteínas do soro, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, perfazem 70-80% das proteínas totais do soro. Além dessas são encontradas a soralbumina,

imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (SGARBIERI et al., 1996).

A α -lactalbumina (α -La) é uma proteína globular compacta e aparece como monômero no pH natural do leite (pH 6,6). Está presente no leite de todos os mamíferos cuja lactose é o principal açúcar. A proporção de α -La e β -Lg no leite bovino é de 1:3 (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; WALZEN et al., 2002).

A função biológica da α -La está relacionada com a síntese de lactose. A associação da α -La com o complexo lactose sintetase catalisa o último passo da biossíntese de lactose no tecido mamário (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; WALZEN et al., 2002).

A α -La purificada é usada comercialmente em fórmulas infantis devido à similaridade estrutural e composicional em relação à principal proteína do leite materno. É também utilizada em alimentos protéicos para esportistas, pois constitui uma boa fonte de aminoácidos de cadeia ramificada, os quais estão envolvidos no fornecimento de energia e síntese protéica muscular (WALZEN et al., 2002).

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

Embora isolada há 60 anos, a função desta proteína, segundo WALZEN et al. (2002), ainda é desconhecida, mas ela se liga ao cálcio e zinco e a uma variedade de pequenas moléculas hidrofóbicas. Entretanto WIT (1998), em seu trabalho, atribui à β -lactoglobulina a propriedade de transportador provitamina A. De acordo com o autor, a estrutura globular da β -Lg é extraordinariamente estável aos ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, tornando-a um resistente carreador de retinol (provitamina A) da vaca para o filhote. Porém, esta função biológica parece ser menos importante para bebês humanos, o que talvez explique por que a β -Lg não ocorre no leite humano (WIT et al., 1998).

4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

A hidrólise de proteínas é um processo no qual as ligações peptídicas das proteínas são clivadas originando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, e pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. As hidrólises ácidas e

alcalinas são totalmente inespecíficas, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1981; CLEMENTE, 2000).

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

Além disto, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (REED, 1975).

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

Vários trabalhos, realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, mostraram a influência desses parâmetros hidrolíticos na obtenção de perfil peptídico nutricionalmente adequado, especialmente no que se refere ao teor de oligopeptídeos (MORATO et al., 2000; MORAIS et al., 2002, 2005; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; DELVIVO et al., 2005, 2006; BIASUTTI et al., 2007; SOARES et al., 2007; SOUZA et al., 2008).

4.1 Importância

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

Alguns trabalhos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG empregaram proteases variadas no estudo de propriedades funcionais de proteínas do leite e do sangue bovino, tendo mostrado que o efeito positivo da hidrólise protéica depende da fonte protéica e das condições hidrolíticas (SILVA et al.,2003a,b; SILVA & SILVESTRE, 2003; BIZZOTO et al.,2005; VIEIRA et al., 2006; BIASUTTI et al., 2007).

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas através do tratamento enzimático. Os hidrolisados enzimáticos são geralmente destinados a três grandes grupos no âmbito da Nutrição Clínica: formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo, como a PKU e a fibrose cística; formulações especiais para adultos com função gastrointestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos; e suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (FRENHANI & BURINI, 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000; TRAHMS, 2002).

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (GRIMBLE et al.,1986; VIJAYALAKSHIMI et al.,1986).

Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são absorvidas e metabolizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE et. al., 1985, GRIMBLE et al.,1986; RÉRAT, 1993; FRENHANI & BURINI, 1999; BOZA et al., 2000).

O valor nutricional dos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional e ao método de hidrólise que possibilite a obtenção de peptídeos de pesos moleculares diferentes (GRIMBLE et al.,1986; ANANTHARAMAN & FINOT, 1993).

4.2 Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise total das proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em endopeptidases

ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (RAO et al.,1998; CLEMENTE, 2000).

As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal sendo que a presença de grupos amino ou carboxila livres tem um efeito negativo na atividade da enzima. Já as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, região N ou C terminal, são classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. Estas enzimas são divididas em quatro subgrupos de acordo com seu mecanismo catalítico: serina proteases, aspártico proteases, cisteína proteases, e metaloproteases (RAO et al.,1998).

Uma vez que são fisiologicamente necessárias para organismos vivos, as proteases são encontradas numa ampla diversidade de fontes como plantas, animais e microrganismos, dentre eles são comuns os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Rhizopus* (RAO et al.,1998; DINIZ & MARTIN, 1999).

A hidrólise seletiva de algumas ligações peptídicas é uma ferramenta importante para a obtenção de poli- e oligopeptídeos (SGARBIERI et al.,1996). Aproximadamente 60% do total das enzimas industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Nesta última, as proteases são utilizadas como coadjuvantes no processamento de cerveja, vinho, cereais, produtos lácteos, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteína hidrolisada e flavorizantes (FURLAN & OETTERER, 2002).

4.3 Fatores interferentes

A fim de se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor, é importante controlar as condições hidrolíticas na digestão enzimática das proteínas (FREITAS et al. 1993; SVENNING et al.,1993).

De acordo com CÂNDIDO (1998), as reações enzimáticas devem ser controladas para se alcançar resultados confiáveis. Dentre as variáveis temos: pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima:substrato (E:S), inativação enzimática ao final do processo. Outro fator a ser

considerado é a escolha de um bom método para determinação do grau de hidrólise (SILVESTRE et al.,1993).

A escolha da enzima proteolítica é de extrema importância, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e os aminoácidos que se quer deixar na forma livre (HAQUE & MOZAFFAR, 1992).

Como citado acima, diversos trabalhos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG têm comprovado que, além da escolha da enzima, o controle dos demais parâmetros hidrolíticos, é importante, pois interferem na obtenção dos produtos finais da reação (SILVA et al., 2003a,b; SILVA & SILVESTRE, 2003; BIZZOTO et al., 2005; VIEIRA et al., 2006; BIASUTTI et al., 2007).

A associação de enzimas, introduzidas na reação, simultânea ou sucessivamente, pode conduzir a um grau de hidrólise superior àquele obtido com uma única enzima, demonstrando um caráter de ação sinérgica ou complementar. Assim, na produção de hidrolisados, enzimas de ampla especificidade têm sido utilizadas, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, em associações, levando a uma hidrólise extensa, com a obtenção de pequenos peptídeos e aminoácidos livres (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2007).

Como as enzimas são termolábeis, o calor de desnaturação resulta em uma perda gradual de suas propriedades catalíticas, sendo crescente a taxa de inativação com o aumento da temperatura. Deste modo, se por um lado as temperaturas mais elevadas aumentam o rendimento das reações enzimáticas, por outro, podem provocar a inativação da enzima, dependendo do calor aplicado (REED, 1975). Assim a ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, visando a interrupção da reação hidrolítica, empregando-se temperaturas na faixa de 80°C a 90°C, por 10 a 20 min (SILVESTRE et al.,1993; MORATO et al., 2000; SILVA et al., 2003a,b; SILVA & SILVESTRE, 2003; BIZZOTO et al., 2005; CAPOBIANGO et al., 2006; VIEIRA et al., 2006; BIASUTTI et al., 2007).

5 REMOÇÃO DE FENILALANINA

Nos anos 70, iniciou-se no Japão a investigação sobre a possibilidade de produção e utilização de proteínas hidrolisadas com baixo teor de Phe. Procurou-se obter concentrados protéicos inodoros, sem cor e sem sabor indesejáveis, a partir de proteínas de soja e peixe, através da proteólise enzimática (MIRA & MARQUEZ, 2000).

As proteínas hidrolisadas, com baixo teor de Phe, são alternativas que apresentam diversas vantagens no tratamento de pacientes fenilcetonúricos, uma vez que podem fornecer proteínas de alto valor biológico e, segundo ARAI et al. (1988), os hidrolisados diminuem em 50% a pressão osmótica causada por misturas de aminoácidos, solucionando em grande parte o problema da hipertonicidade.

5.1 Métodos de remoção

A Phe é um aminoácido presente em todas as proteínas animais e vegetais na proporção de 4 a 6% (OUTINEN et al.,1996). Assim, a dieta do fenilcetonúrico obriga a uma baixa ingestão de proteínas naturais. Por isso, vários métodos foram desenvolvidos para remover esse aminoácido de hidrolisados protéicos (MIRA & MARQUEZ, 2000).

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

Vários autores utilizaram com sucesso o carvão ativado para remover Phe de hidrolisados protéicos. KITAGAWA et al. (1987), obtiveram 97% de remoção de Phe de hidrolisado de soro de leite. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991), removeram de hidrolisados de caseína comercial e de leite em pó desnatado, 92% de Phe. Segundo SHIMAMURA et al. (1999), a passagem de hidrolisado protéico de soro de leite em coluna contendo carvão ativado, remove aminoácidos aromáticos, principalmente a Phe, com uma eficiência na faixa de 85 a 95%.

Em outros estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, o carvão ativado foi, também, utilizado com eficiência na remoção de Phe de proteínas hidrolisadas de leite em pó desnatado (94 a 99%) (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), de soro de leite em pó (75 a 99%) (DE MARCO et al., 2004; DELVIVO et al., 2006; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007) de arroz (85 a 100%) (LOPES et al., 2008), de farinha de arroz (26 a 94%) (SILVESTRE et al., 2009), de fubá de milho (69 a 98%) (CAPOBIANGO et al., 2006, 2007) e de feijão (25 a 88%) (LOPES Jr., 2008).

Como pode ser visto acima, o leite já foi empregado em dois estudos anteriormente realizados no mesmo Laboratório. Entretanto, o presente trabalho diferencia-se dos anteriores em diversos aspectos. Assim, a matéria prima a ser utilizada será o leite fluido e os parâmetros hidrolíticos (tipo de enzima, relação enzima:substrato, tempo e temperatura de reação) e de remoção de Phe (relação proteína:carvão) foram diferentes dos anteriormente utilizados, pois neste trabalho buscou-se a otimização de todas as etapas para a sua posterior adaptação em larga escala.

5.2 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 gasosa (MAYADUNNE et al., 2005); cromatografia gasosa-espectrometria de massas (DENG et al., 2002), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de troca iônica (CABRERA-PADILLA et al., 2009; GALVÃO et al., 2009) e sensor enzimático de membrana (SHIMAMURA et al., 1999)

Outro método cromatográfico foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa 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 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 (O'HAVER & GREEN, 1976; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988).

Vários autores utilizaram esta técnica. Assim, ICHIKAWA & TERADA (1977, 1979, 1981a,b) 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 (ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 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).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. *In: IDF (Inter. Dairy Fed.) Seminar on Protein & Fat globule modifications.*, p.97-105, 1993.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI S. Protocolo 1 – *Phenylketonuria* (PKU). In: Ross Products Division, Abbott Laboratories. The ross metabolic formula system - Nutricion support protocol. 3.ed. Columbia: Keziaz Strvat, 1997.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29-33, 1981.
- AGUIAR, M. J. B. Genetic services and research in the state of Minas Gerais. *Brazil. Comm Genet*, v. 7, n. 4, p. 117-120, 2004.
- ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P.A. Nutritional aspects of food protein in relation to technology. *Food Rev. Int.*, v. 9, p. 629-655, 1993.
- ARAI, S.; MAEDA A.; WATANABE, M; Physicochemical properties of a low phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agric Biol Chem.*, v. 52, p. 287-288, 1988
- BARBOSA, C.M.S; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA. M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BEASLEY, M.G.; COSTELLO, P.M.; SMTH, I. Outcome of treatment in young adults with phenylketonuria detected by routine neonatal screenig between 1964 and 1971. *Q. J. Med.*, v. 87, p. 155-160, 1994.
- BIASUTTI, E.A.R.; VIEIRA, C.R., CAPOBIANGO, M, SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; JUNQUEIRA, R.G. SILVESTRE, M.P.C. Study of some functional properties of

casein: effect of pH and tryptic hydrolysis. *Inter. J. Food Proper.*, v. 10, n. 1, p.173-183, 2007.

BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M. P. C. Evaluation of functional properties of a blood protein.. *Pakistan 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 processo de preparo de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. *Tecnológ.*, v. 10, p. 9-30, 2006a.

BIZZOTTO. C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G. SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Ciên. Agrotec.*, v. 30, p. 308-316, 2006b.

BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.O.B. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 822 de 06 de junho de 2001. Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal/PNTN. *Diário Oficial*, Brasília, 10 de junho de 2001.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz - Fundamentos de química clínica*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 836p.

CABRERA-PADILLA, R.Y.; PINTO, G.A.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates wuth low contents of phenylalanine. *Process Biochem.*, v. 44, p. 269-276, 2009.

CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998. 207 p. (Tese de Doutorado).

CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; MACHADO, M.A.A.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da corolase pp e uso do carvão ativado na obtenção de

hidrolisados protéicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v.21, n.4, p.259-266, 2006.

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. *Inter. J. Food Engineer.*, v. 3, p. 1-19, 2007.

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 Farmac. Bonaer*, v. 23, n. 1, p.17-25, 2004.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones químicas*. Zaragoza: Acribia, 1989. 346 p.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Tech.*, v. 11, p. 254-262, 2000.

DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V. SILVESTRE, M.P.C. Imobilização da papaína em carvão ativado e em alumina, visando sua utilização no preparo de formulações dietéticas. *Tecno-Lóg.*, v. 8, p. 83-89, 2004.

DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v.8, n.3, p.210-219, 2005.

DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, A.H.; FIGUEIREDO, A.F.S.; DE AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V. SILVESTRE, M.P.C. Desenvolvimento de formulação dietética à base de hidrolisado de soro de leite. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v. 20, p. 117-126, 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. *Amer. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- DENG, C.; DENG, Y.; WANG, B; YAHG, X. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots. *J. Chromatog. B*, v. 780, p. 407-413, 2002
- DINIZ, F.M. & MARTIN, A.M. *Hidrolisado protéico de pescado* In: OGAWA, M. & MAIA, E.L. Manual de Pesca. São Paulo: Varela, 1999.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Leite. Disponível em: < <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>> Acesso em: 07 nov. 2008.
- FISBERG. R.M.; SILVA-FERNANDES, M.E.; SCHIMIDT, B.J.; FISBERG, M. Nutritional evaluation of children with phenylketonuria. *São Paulo Medical Journal/Rev. Paulista de Medicina*, v. 117, n. 5, p. 185-191 , 1999.
- FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; DOS SANTOS, J.E.; DE OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates for enteral nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1432-1438, 1993.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arq Gastroenterol*, v. 36, n. 4, p. 227-236, 1999
- FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado Protéico de Pescado. *Rev. Ciên. Tecnol.*, v. 10, n 19, p. 79-89, 2002.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, p. 343-359, 1990.
- GALVÃO, C.M.A.; PINTO, G.A.; JESUS, C.D.F.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolysates of cheese whey. *J. Food Engineer.*, v. 91, n. 1, p. 109-117, 2009.

- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hidrolisis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, p. 529-532, 1994.
- 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.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSK Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65-69, 1986.
- HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *J. Nutr. Biochem.*, v.14, p. 251-258, 2003.
- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v. 5, p. 559-571, 1992.
- HENDRIKSZ, C.J.; WALTER, J.H. Update on phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 14, p. 400-406, 2004.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v.494, n.1, p.267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.580, n.1, p.120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.2, p.438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.671, n.1, p.33-37, 1981b.

ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) – TecnoLat – Estatísticas. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br>. Acesso em: 16 de ago. 2007.

KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S.; SOARES, R.D.L.; STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B. Abordagem dietética para fenilcetonúria. *Rev. Med. Minas Gerais*, v. 11, n. 2, p. 129-134, 2001.

KANUFRE, V. C. *A Utilização do aleitamento materno no tratamento da fenilcetonúria*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG. 2006. 122 f. (Dissertação, Mestrado em Ciências da Saúde da Criança e do adolescente).

KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut*, v. 26, p. 907-913, 1985.

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.

LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZENNEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and massa spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chrom. A*, v. 881, p. 1-21, 2000.

LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Tech.*, v. 38, p. 447-453, 2004.

LOPES, D. C. F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *British Food J.*, v. 107, n.1, p. 42-53, 2005.

LOPES, D. C. F. ; DELVIVO, F. M. ; SILVESTRE, M. P. C. . Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr. Food Sci.*, v. 36, n. Nº 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. *J. Food Technol.*, 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.. *J. Food Technol*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- 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. 81 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- 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.
- MaCDONALD, A.; FERGUSON, C.; RYLANCE, G.; MORRIS, A.A.M.; ASPLIN, D.; HALL, S.K.; BOOTH, I.W. Are tablets a practical source of protein substitute in phenylketonuria? *Arch. Dis. Child.*, v. 88, p. 327-329, 2003.
- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p. 1163-1169, 1992.
- MARCO, D.; WAITZBERG, D.L.. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: WAITZBERG, D.L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 449-457.
- MARTINS, A.M.; FISBERG, R.M.; SCHMIDT, B.J. *Fenilcetonúria: abordagem terapêutica*. NESTLÉ, São Paulo, n.54, 1993.
- MARTINS, S. R. R. *Incidência de fenilcetonúria e outras hiperfenilalaninemias no estado de Minas Gerais: dados do Programa Estadual de Triagem Neonatal*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG. 2005. 98 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências da Saúde da Criança e do adolescente).

- MAYADUNNE, R.; NGUYEN, T.; MARRIOTT, P.J. Amino acid analysis by using comprehensive two-dimensional gás chromatography. *Anal. Bioanal. Chem*, v. 382, p. 836-847, 2005.
- MILUPA. Protein substitutes for the dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia, 1995.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Públ.*, v. 34, p. 86-96, 2000.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.*, v. 19, p. 381-387, 2006.
- MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; LOPES, D.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Arq. Latino Americanos Nutr.*, v. 52, n.1, p. 77-83, 2002
- MORAIS, H.A.; MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria*, v. 34, p. 59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, v. 13, p. 843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hidrolizates of casein depleted in phenilalanine. *App. Biochem.Microbiol.*, v. 29, n. 3, p. 302-306, 1993.
- NUPAD – Núcleo de ações e pesquisas em apoio diagnóstico. Disponível em: < <http://www.nupad.medicina.ufmg.br/>>. Acesso em: 15 de outubro de 2008.
- O’HAVER, T.C.; GREEN, G.L. Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. *Anal. Chem.*, v. 48, n. 2, 1976.
- ORNELLAS, L.H. *Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos*. 7 ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 330 p.

- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. Valio Oy, Helsinki, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, p. 15-23, 1995.
- RAMASWAMI, U.; SMITH, I. Phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 7, p. 251-255, 1997.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol.*, p. 597-635, 1998.
- REED, G. *Food Science and Technology*. 2 ed. New York: Academic Press, 1975. 573p.
- RERAT, A. A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism, *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- ROBINSON, D. S. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1991. 516 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.
- SANTOS, M.F.; SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H. Hidrolisado enzimático para dietoterapia de fenilcetonúricos. *Biotecnol. Ciên. Desenv.*, v. 29, p.152-157, 2003.
- SCRIVER C.R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH R.C.; WOO, S.L.C. The hyperphenylalaninemias. In: SCRIVER C.R.; BEAUDET A.L.; SLY, W.S., VALLE D. eds. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1997. p.1015-1075.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação*. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVA, J. G. ; MORAIS, H. A. ; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. *Food Resear.Inter.*, Inglaterra, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2003^a.
- SILVA, J.G. ; MORAIS, H.A.; OLIVEIRA, A.L. ; SILVESTRE, M.P.C. . Evaluating the incorporation of globin bovine and sodium caseinate on the raw batter quality and on the stability of ham pâté. *Meat Sci.*, Fort collins, CO, USA, v. 63, n. 2, p. 177-184, 2003b.
- SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Sci. Technol.*, v. 37, n. 6, p. 709-718, 2003.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O., LOPES, D.C.F, JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING. A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am.J. Food Technol.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M.P.C., DAUPHIN, C., HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta.*, v. 282, p. 603-612, 1993.
- SILVESTRE, M.P.C. ; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R. ; SILVA, M.C; LOPES Jr, C.O.; SILVA, V.D.M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Engineer.*, v. 5, n. 1, art. 2, 2009.
- SMITHERS, G.W.; BRADFORD, R. S. New casein products: fresh opportunities for the dairy industry., *Food Res. Quart.*, Stanford, v. 51, n. 1, p. 92-98, 1991.
- SOARES, R. D. L.; BIASUTTI, E. A. R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C. R.; SILVA, V. D. M.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M.Jb.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of

- enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac. Bonaer.*, v. 25, p. 325-332, 2006.
- SOARES, R. D. L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVESTRE, M. P. C. Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol.*, v. 21, n. 1, p. 45-56, 2007.
- SOUZA, C.F.M, SCHWARTZ, I.V., GIUGLIANI, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciê. Saúd. Colet.*, v. 7, p. 129-137, 2002.
- 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 pancreatic. *Am. J. Food Technol.*, v. 3, p. 315-324, 2008.
- STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. *Rev. Méd. Minas Gerais*, v. 9, p. 106 - 110, 1999.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1988. 1089 p.
- SVENNING, C.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: IDF (International Dairy Federation) *Sem. Protein Fat glob. Mod.*, p. 96-106, 1993.
- SWAISGOOD, H.E. Características de los fluidos nutritivos de origem animal: leche. In: FENNEMA, O.R. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 889-930.
- TESMER, E.; VETTER, M.; RAFFLER, G.; SCHWEIKHARDT, F. Process of making phenilalanine-free food for infants and small children. Milupa GmbH & Co. KG, Friedrichsdorf, Germany, Patents US 1996000682627, A23L 1/305, A23L 1/304; 09/10/1996; 07/04/1998.
- TRAHMS, C.M. Cuidado nutricional nos distúrbios metabólicos. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 745-775.
- VAN RIJN, M., HOEKSMAN, M., SAUER, P., SZCZERBAK, B., GROSS, M., REIJNGOUD, D., VAN SPRONSEN, F. Protein metabolism in adult patients with phenylketonuria. *Nutrition*, v. 23, p. 445-453, 2007.

- VIEIRA, C. R., BIASUTTI, E.A.R, CAPOBIANGO, M., AFONSO, W.O., SILVESTRE, M. P. C. Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its triptic hydrolysates. *Ars Pharmaceutica*, v. 47, n. 3, p. 281-292, 2006.
- 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.
- WALSH, M. K.; BROWN, R. J. Use of amino acid analysis for estimating the individual concentrations of proteins in mixtures. *J. Chrom. A.*, v. 891, p. 355-360, 2000.
- WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: What We Know and What We May Be Overlooking. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.42, n. 4, p. 353-375, 2002.
- WIT J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 597-608, 1998.
- ZHANG, Y.; DORJPALAM, B; HO, C. T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose. *J. Agric. Food Chem.*, v. 40, p. 2467-2471, 1992.
- ZIEGLER, F.; OLLIVIER, J.M.; CYNOBER, L. MASINI, J.P.; COUDRAYLUCAS, C.; LEVIS, E.; GIBOUDEAU, J. Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides vs. non-degraded proteins. *Gut.*, v. 31, p. 1277-1283, 1990.

110 REFERÊNCIAS

TRABALHO EXPERIMENTAL

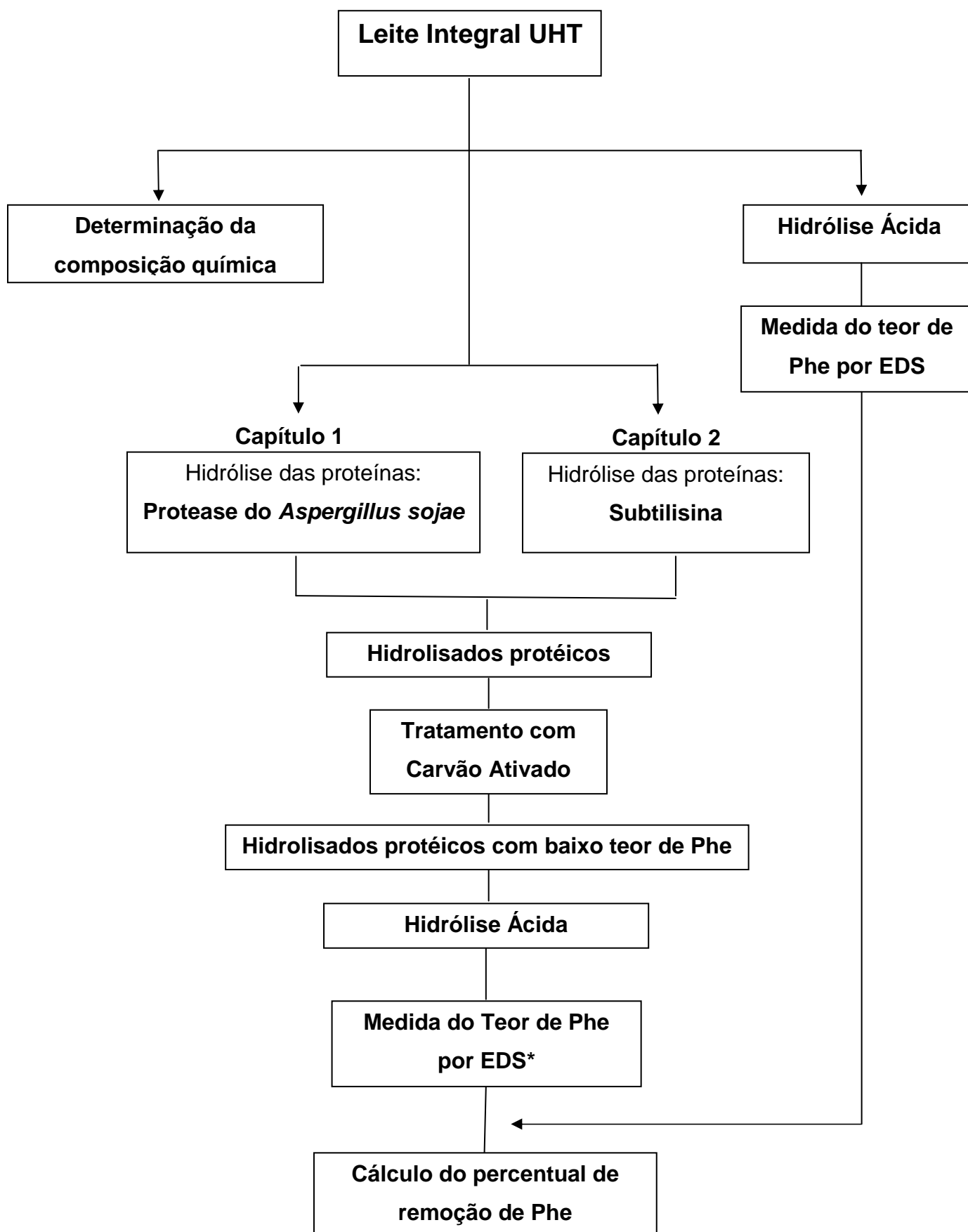
APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho foi redigida na forma de artigos científicos e dividida em dois capítulos (I e II), estando apresentada na forma de fluxograma, na Figura 2.

O primeiro capítulo refere-se à utilização da protease do *Aspergillus sojæ* e uso do carvão ativado (CA) na obtenção de leite com teor reduzido de fenilalanina (Phe). Algumas variáveis, como a relação enzima:substrato, a relação proteína:carvão ativado, o tempo e a temperatura de reação foram testadas, correspondendo a um total estudado de 16 condições, de hidrólise protéica e de remoção de Phe. A eficiência desta remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor de Phe livre no leite, assim como nas suas proteínas hidrolisadas antes e após o tratamento com CA.

No capítulo II, a protease do *Bacillus subtilis* (subtilisina) foi empregada na hidrólise das proteínas do leite, e o CA foi utilizado como meio adsorvente para a remoção de Phe, com o objetivo de se obter um leite com teor reduzido deste aminoácido. Para isto, as mesmas condições de reação avaliadas no capítulo anterior foram aqui testadas. A eficiência da remoção foi avaliada pelo mesmo procedimento empregado no capítulo anterior.

As conclusões gerais estão descritas no capítulo III, onde foram comparados os resultados obtidos empregando-se as duas enzimas.



*EDS: Espectrofotometria derivada segunda

Figura 2. Principais etapas do trabalho experimental

OBTENÇÃO DE LEITE COM TEOR REDUZIDO DE FENILALANINA PELA AÇÃO DA PROTEASE DO *Aspergillus sojae* E USO DO CARVÃO ATIVADO

RESUMO

Visando o preparo de leite com baixo teor de fenilalanina (Phe), para ser introduzido na dieta de fenilcetonúricos, inicialmente as proteínas foram hidrolisadas pela ação de uma protease do *Aspergillus sojae*, tendo sido testados o efeito da relação E:S, da temperatura e do tempo de reação. Posteriormente, os hidrolisados protéicos foram tratados com carvão ativado (CA) para remoção de Phe, empregando-se as relações proteína:CA de 1:22, 1:44 e 1:88. A eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda, determinando-se o teor de Phe livre no leite e em seus hidrolisados, após tratamento com CA. Dentre todos os parâmetros estudados, o melhor resultado foi obtido ao se empregar o tempo de 3h, a temperatura de 50°C, a relação E:S de 4:100 e a relação proteína:CA de 1:22, tendo atingido 64,6% de remoção e o teor final de Phe de 54,2mg de Phe/100ml de leite, permitindo assim a utilização sem restrições deste alimento por pacientes fenilcetonúricos.

Palavras-chave: leite; hidrólise enzimática; carvão ativado; fenilalanina; fenilcetonúria.

ABSTRACT

PREPARATION OF MILK WITH LOW PHENYLALANINE CONTENT BY THE ACTION OF A PROTEASE FROM *Aspergillus sojae* AND THE USE OF ACTIVATED CARBON. Aiming the preparation of milk with low phenylalanine (Phe) content to be introduced in the phenylketonurics' diet, its proteins were initially hydrolyzed by the action of a protease from *Aspergillus sojae*, and the effect of the E:S ratio, temperature and reaction time was tested. Then, the protein hydrolysates were treated with activated carbon (AC) for removing Phe, using protein:AC ratios of 1:22, 1:44 and 1:88. The efficiency of Phe removal was evaluated by second derivative spectrophotometry, determining the Phe content in milk and in its hydrolysates, after treatment with AC. Among all the parameters studied, the best result was obtained when using a reaction time of 3h, a temperature of 50°C, an E: S ratio of 4:100 and a protein:AC ratio of 1:22, reaching 64.6% of Phe removal and a final content of 54.2mg/100ml of milk, which allows the unrestricted use of this food by phenylketonurics patients.

Keywords: milk; enzymatic hydrolysis; activated carbon; phenylalanine; phenylketonuria.

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria é uma doença genética, causada por uma mutação no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase, ativa no fígado e responsável pela transformação de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). O tratamento da fenilcetonúria é realizado, principalmente, através de uma alimentação restrita em alimentos protéicos naturais, e no controle na ingestão de Phe, utilizando-se fórmulas constituídas de misturas de aminoácidos livres, isentas de Phe. Entretanto, por serem importadas, essas formulações são de alto custo, além de resultarem em uma dieta monótona e pouco palatável (MIRA & MARQUEZ, 2000; MALLOY-DINIZ et al., 2004, HAMMAN et al., 2005; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; WASSERSTEIN et al., 2006).

O leite ocupa um lugar relevante na alimentação do brasileiro, especialmente devido às suas propriedades nutritivas, no entanto, sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos é proibida. Neste sentido, seria de grande interesse desenvolver um leite contendo teor reduzido de fenilalanina, para que pudesse ser incorporado na dieta de fenilcetonúricos, atendendo, assim, a grande demanda que vai desde a infância até a fase adulta (KANUFRE et al, 2001).

O processo de remoção de fenilalanina consiste, basicamente, de duas etapas: a liberação da Phe do material protéico e sua posterior remoção. A liberação da Phe se dá através da hidrólise química ou enzimática, e a remoção é feita por tratamentos diferenciados, empregando-se diversos métodos, como adsorção em carvão ativado (CA) ou resinas de adsorção (LOPES et al. 2004, 2006; DE MARCO et al., 2005; CAPOBIANGO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SILVA et al., 2007; LOPES Jr, 2008; SILVESTRE et al., 2009), cromatografia de troca iônica, peneira molecular, filtração em gel, além de desaminação deste aminoácido pela enzima fenilalanina amônia liase. A escolha do método deve considerar a relação custo/eficiência, a praticidade e a reprodutibilidade (MIRA & MARQUEZ, 2000).

O laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG tem realizado estudos de remoção de Phe do soro de leite e do leite, que diferentemente do presente trabalho, foi empregado na forma de pó e desnatado e sob condições de hidrólise e remoção de Phe diferenciadas (menores concentrações de matéria-prima, maiores relações enzima:substrato e maiores quantidades de CA), usando carvão ativado ou resinas como meio adsorvente (LOPES et al., 2004; DELVIVO et al., 2006; SOARES et al., 2006; LOPES et al., 2007). Nos trabalhos de remoção de Phe de cereais, realiza-se a

extração prévia da proteína por métodos químicos ou enzimáticos (BIZZOTTO et al., 2006a,b; CAPOBIANGO et al., 2006; VIEIRA, et al., 2008). O CA e uma resina de adsorção foram testados, anteriormente, no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG, tendo sido eficientes na remoção de Phe de hidrolisados protéicos de fontes diversas e empregando condições de hidrólise variadas (DE MARCO et al., 2004; LOPES et al., 2004; BIZZOTTO et al., 2006a; CAPOBIANGO et al., 2006; DELVIVO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SILVA et al., 2007; SILVESTRE et al., 2009).

A avaliação da remoção de Phe é feita pela quantificação deste aminoácido na matéria-prima e nos seus hidrolisados protéicos, após o tratamento com CA. A quantificação do teor de Phe final pode ser feita por diferentes métodos, destacando-se a espectrofotometria derivada segunda (EDS) (GRANT & BATTACHARYYA, 1985; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a, b; ROJAS et al., 1988). A EDS tem sido utilizada em diversos estudos realizados no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, para a quantificação de Phe em hidrolisados protéicos obtidos pela ação de várias proteases e fontes protéicas (SILVESTRE et al., 1993; DELVIVO et al., 2005; DE MARCO et al., 2005; LOPES et al., 2005; SILVA et al., 2005a,b; BIZZOTTO et al., 2006a,b; CAPOBIANGO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SILVESTRE et al., 2009).

O presente trabalho representa um passo relevante no processo de obtenção de leite com teor reduzido de Phe para ser introduzido na alimentação de fenilcetonúricos. Neste sentido, este estudo teve como objetivos otimizar a remoção de Phe do leite, empregando-se na hidrólise de suas proteínas uma protease do *Aspergillus sojae*, e verificando-se o efeito de diversos parâmetros neste processo, tais como relação enzima:substrato, tempo e temperatura de reação. Além disso, estudou-se a influência da relação proteína:CA no processo de remoção de Phe pelo carvão ativado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O leite integral UHT (Itambé, Pará de Minas, Minas Gerais) foi adquirido no comércio de Belo Horizonte, MG, Brasil. A protease de *Aspergillus sojae* (Corolase® LAP, amino-exopeptidase – EC 3.4.11.1, atividade 63,9 U/mL, pH ótimo entre 6 e 9, temperatura ótima entre 55 e 70 °C), foi cedida pela AB Enzymes Brasil Comércio Ltda

(Barueri, SP, Brasil). O carvão ativado (CA) com três diferentes granulometrias (20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação da composição química do leite

A composição química do leite foi determinada segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), sendo todas as análises realizadas em triplicatas. O teor de umidade foi determinado por dessecação em estufa ventilada (Quimis Q-314M242 série 020, Diadema, SP) a 105 °C até peso constante; o teor de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl utilizando 6,38 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína total (GREENFIELD & SOUTHGATE, 1992); os minerais, por incineração em mufla a 550 °C e os lipídeos foram determinados pelo método de BLIGH & DYER (1959). O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteínas, lipídeos totais e cinzas totais.

2.2.2 Hidrólise enzimática das proteínas do leite

Empregando-se a enzima de *Aspergillus sojae* para hidrolisar as proteínas do leite, foram obtidos 16 hidrolisados, tendo sido variados os seguintes parâmetros: temperatura, tempo de reação e relação enzima:substrato (Tabela I.1). Inicialmente, 50 mL de leite foram colocados em erlenmeyer e o pH medido (6,7). Em seguida, levou-se ao banho de vaselina líquida, sobre agitador magnético, com agitação constante, para que fosse atingida a temperatura a ser avaliada. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se a enzima na quantidade suficiente para atingir 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, confirmado pela medida da atividade enzimática antes e após o tratamento térmico, pelo método de DIAS et al. (2008).

Tabela I.1: Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de leite e na remoção de fenilalanina

Hidrolisados	Hidrólise enzimática			Remoção de Phe
	Temperatura	Tempo	E:S	Relação proteína:CA
H1	30 °C	1h30min	1	1:22
H2	30 °C	3h	1	1:22
H3	30 °C	5h	1	1:22
H4	50 °C	1h30min	1	1:22
H5	50 °C	3h	1	1:22
H6	50 °C	5h	1	1:22
H7	30 °C	1h30min	2	1:22
H8	30 °C	3h	2	1:22
H9	30 °C	5h	2	1:22
H10	50 °C	1h30min	2	1:22
H11	50 °C	3h	2	1:22
H12	50 °C	5h	2	1:22
H13	30 °C	5h	4	1:22
H14	50 °C	3h	4	1:22
H15	50 °C	3h	4	1:44
H16	50 °C	3h	4	1:88

E:S = Relação enzima substrato; CA = carvão ativado

2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite

A Phe foi removida dos hidrolisados protéicos de leite pela utilização do CA 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 primeiro o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por último o de maior granulometria. Em sequência, 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 BE11778, 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

O efeito da temperatura foi avaliado testando-se os valores de 30 °C e 50 °C. O efeito do tempo de reação foi testado utilizando-se os valores de 1h30min, 3h e 5h. Para o estudo da influência da relação enzima:substrato foram utilizadas as relações de 1:100, 2:100 e 4:100. Finalmente, o efeito da relação proteína:CA, foi estudado nas seguintes proporções 1:22, 1:44 e 1:88 (Tabela I.1).

2.2.5 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina

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

Para a curva padrão, soluções estoques de Phe ($6,05 \times 10^{-4}$ mol/L), Tyr ($5,52 \times 10^{-4}$ mol/L) e Trp ($4,90 \times 10^{-4}$ mol/L) foram preparadas em tampão fosfato de sódio a 0,01 mol/L (pH 6,0). Em seguida, 10 mL de cada uma destas soluções foram misturados e a solução obtida foi diluída, sucessivamente, de maneira a se obter concentrações de Phe variando de 0,067 a $2,018 \times 10^{-4}$ mol/L. A eficiência da remoção de Phe foi calculada de acordo com a equação (1)

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

sendo,

Teor de Phe inicial = teor de Phe no leite

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

2.2.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em três repetições e as análises foram 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 LEITE

Os dados referentes à composição química do leite estão apresentados na Tabela I.2.

Tabela I.2: Composição química do leite

Componentes	Resultados ¹	Rótulo ²	TBCA ³	NOGUEIRA ⁴
Umidade (g/100g)	88,58	-	86,68	88,26
Proteínas (g/100g)	2,99	3,10	2,97	2,87
Lipídeos (g/100g)	2,72	3,00	3,04	2,81
Cinzas (g/100g)	0,67	-	0,79	0,76
Carboidratos (g/100g)	5,04	4,4	6,52	5,30

Fonte: ¹Resultados obtidos no presente trabalho. ²Dados disponíveis no rótulo do produto. ³ TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, USP (2008). ⁴ NOGUEIRA (2007).

Observa-se que, embora o emprego de diferentes métodos de análise, assim como o fato de que diversos fatores são capazes de influenciar a composição química do leite (SGARBIERI et al., 1996; ORNELLAS, 2001), os resultados obtidos estão muito próximos dos descritos na literatura e dos citados no rótulo do produto. Os dados da literatura utilizados para comparação de resultados referem-se a trabalhos realizados com leite integral UHT, sendo que no de NOGUEIRA (2007) foram utilizadas as mesmas metodologias do presente trabalho.

3.2 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Os resultados obtidos para a remoção de Phe dos diferentes hidrolisados protéicos de leite estão expostos na Tabela I.3, onde os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg de Phe/100 mL de leite), sendo esta última, a forma mais apropriada para os cálculos de adequação das prescrições dietéticas de substitutos protéicos destinados a fenilcetonúricos, além de atender a regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos (BRASIL, 2002, 2003). O teor de Phe encontrado no leite foi de 153 mg/100 mL, resultado bastante semelhante aos encontrados na literatura que foram de 157 mg/100 mL e 173 mg/100 mL, relatados por VERRUMA e SALGADO (1994) e LAURINDO et al. (1992), respectivamente, para leite de vaca integral.

Como pode ser observado, o carvão ativado se mostrou eficaz na remoção de fenilalanina de leite hidrolisado pela ação da protease do *Aspergillus sojae*, sendo que o percentual de remoção variou entre 16,3% e 64,6%, obtendo um teor final de Phe entre 54,2mg e 128,1mg de Phe por 100mL de leite. Dentre todas as condições de hidrólise testadas, 11 delas (H2, H4, de H7 a H9 e de H11 a H17) deram origem a um leite com baixo teor de Phe que poderia ser utilizado na dieta de pacientes fenilcetonúricos, pois, segundo a legislação brasileira, o limite máximo de Phe permitido em formulações dietéticas destinadas a estes pacientes é de 100 mg de Phe/100 mL de produto. Vale, ainda, ressaltar que as proteínas deste leite estão hidrolisadas, sendo esta a forma em que estes nutrientes são mais rapidamente absorvidos pelo organismo, por apresentarem menor osmolaridade, melhor tolerância e aceitação, em relação às misturas de aminoácidos livres que são comumente utilizadas na dieta destes pacientes (FRENHANI & BURINI, 1999).

Tabela I.3: Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg/100 mL de leite)
H1	31,8 ^{gh}	104,5
H2	35,4 ^{efg}	99,0
H3	30,1 ^h	107,1
H4	51,8 ^c	73,8
H5	33,5 ^{fgh}	101,9
H6	16,3 ⁱ	128,1
H7	42,7 ^d	87,8
H8	39,3 ^{de}	93,0
H9	48,3 ^c	79,2
H10	31,2 ^{gh}	105,4
H11	56,4 ^b	66,7
H12	42,4 ^d	88,2
H13	52,0 ^c	73,5
H14	64,6 ^a	54,2
H15	36,8 ^{ef}	96,7
H16	39,1 ^{de}	93,3

Phe=fenilalanina. Teor final de Phe = teor de Phe dos hidrolisados após tratamento com carvão ativado. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Em estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, a Phe foi removida do leite, sendo nestes casos, utilizado como matéria-prima na forma de pó e desnatado (LOPES et al., 2006 e SOARES et al., 2006). Além disso, as condições experimentais utilizadas foram diferentes, principalmente as relacionadas à concentração da matéria-prima (0,35g/100 ml), tipo e modo de emprego das enzimas (protease de *Aspergillus oryzae* – AO, associada com papaína - PA) , relação E:S (1:100 AO + 2:100 PA, 10:100 AO + 20:100 PA, para LOPES et al., 2006 e SOARES et al., 2006, respectivamente) e relação proteína:CA (1:118 e 1:90, para LOPES et al.,

2006 e SOARES et al., 2006, respectivamente). Acrescenta-se, ainda, que no estudo de LOPES et al. (2006), o CA foi utilizado em solução. Assim, neste último trabalho foi possível obter até 99% de remoção de Phe, enquanto que no estudo de SOARES et al. (2006) o maior valor obtido foi de 98%, resultados estes bem superiores ao máximo obtido no presente trabalho. Ressalta-se, entretanto, que o emprego de uma solução muito diluída de matéria-prima (24 vezes menos concentrada do que a do presente trabalho), assim como de uma quantidade de CA muito elevada (até 5 vezes maior do que a do presente trabalho) tornariam o processo economicamente inviável para ser adaptado em larga escala. Acrescenta-se, ainda, as desvantagens econômicas e tecnológicas de se utilizar, como no estudo de SOARES et al., 2006, valores muito elevados de relação E:S (10:100 AO + 20:100 PA).

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre a remoção de Phe de leite. Apenas dois trabalhos estudaram a remoção de Phe da principal proteína do leite. Assim, LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) removeram 92% de Phe de hidrolisados protéicos de caseína, obtidos pela ação de uma protease do *Aspergillus oryzae* (E:S = 1:100, 5h de reação), seguida da papaína (E:S = 2:100, 21 h de reação), tratados com CA (em uma relação de 3g de CA por g de caseína). Já MOSZCZYNSKI & IDZIAK (1993), utilizando um sistema de três enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase), todas empregadas em uma relação E:S de 1:100, a uma temperatura de 40 °C, durante 72h de reação e a um pH de 8,6, também removeram, através do CA (375mg de CA para 10 mL de hidrolisado), 89,5% de Phe de hidrolisados de caseína. Cabe ressaltar que em ambos os trabalhos foram utilizados tempos extremamente longos de reação (26h e 72h, respectivamente), tornando tais métodos inviáveis para aplicação em larga escala, além de elevar a possibilidade de uma contaminação microbiana.

3.3 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

Todos os parâmetros foram analisados levando-se 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 a hidrólise; o de uma menor temperatura e tempo de reação está associado à redução de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia; o de uma menor quantidade de carvão ativado (maior relação

proteína:CA), implica em menores gastos, por ser o insumo de maior custo utilizado no processo.

3.3.1 Efeito do tempo de reação

Para se avaliar o tempo de reação sobre a remoção de Phe, os hidrolisados foram divididos em quatro grupos (Figura I.1), visando manter constantes a temperatura e a relação enzima:substrato (E:S): grupo 1 = 30 °C e 1:100; grupo 2 = 50 °C e 1:100; grupo 3 = 30 °C e 2:100 e grupo 4 = 50 °C e 2:100.

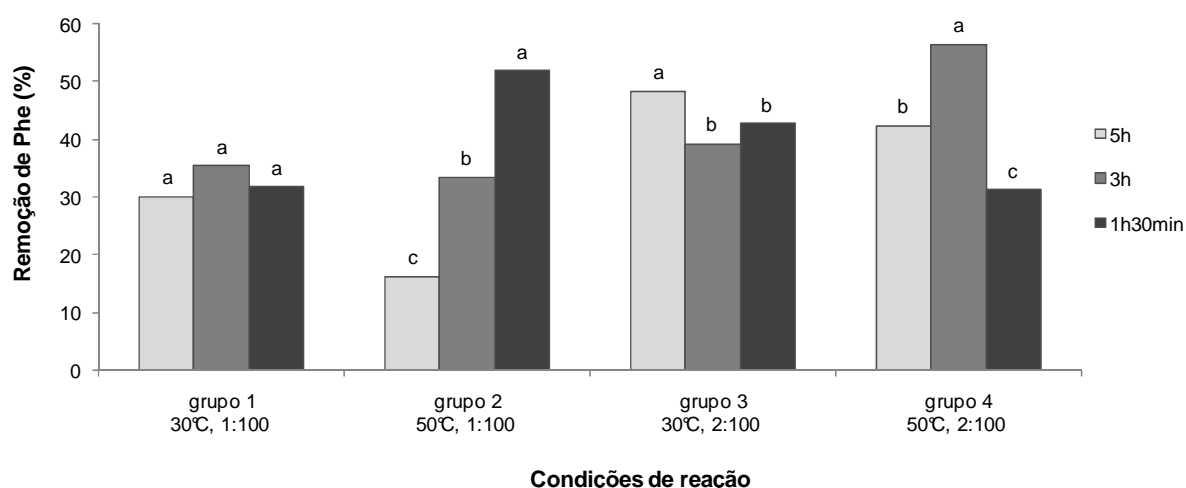


Figura I.1: Efeito do tempo de reação sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. 1:100 e 2:100 = valores para relação E:S. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Observa-se na Figura I.1 que a vantagem da utilização de um menor tempo de reação ocorreu em todos os casos do grupo 2 (5h para 3h e 3h para 1h30min) e em um caso do grupo 4 (5h para 3h), pois obteve-se maior remoção de Phe. Para o grupo 1, a redução do tempo de reação não apresentou diferença significativa entre os resultados obtidos e, apenas ao se trabalhar à temperatura de 30 °C e E:S de 2:100 (grupo 3), o emprego do tempo de reação mais elevado (5h) foi necessário para se obter a maior remoção de Phe.

Teoricamente, não seria esperado que o emprego de um menor tempo de reação não alterasse ou levasse a uma maior remoção de Phe. Entretanto, os resultados aqui obtidos demonstraram que, pelo menos, em algumas situações isto pode ocorrer. Assim, no grupo 1 observou-se esta manutenção nos resultados de remoção de Phe com a utilização de um menor tempo de reação. Uma provável explicação para isto estaria associada ao fato de que alguns fatores poderiam estar contribuindo para a redução da taxa de hidrólise, com o passar do tempo. Assim, de acordo com GUAN et al. (2007), dentre estes fatores encontram-se a redução das ligações peptídicas específicas para ação da enzima, a inativação enzimática e a competição entre a proteína nativa e os peptídeos formados constantemente durante a hidrólise. Já nos dois casos do grupo 2 (5h para 3h e para 1h30min) e em um caso do grupo 4 (3h para 1h30min), ocorreu uma elevação da remoção de Phe. Nestes casos, ao se utilizar um maior tempo de reação pode ter havido uma maior desnaturação protéica impedindo a ação enzimática, e complexação das proteínas já hidrolisadas com a lactose e o cálcio, impedindo uma remoção mais eficiente de Phe (GUAN et al., 2007).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem o efeito do tempo de hidrólise sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos.

3.3.2 Efeito da temperatura de reação

Para esta avaliação, os hidrolisados foram divididos em seis grupos (Figura I.2), visando manter constantes a relação E:S e o tempo de reação: grupo 1 = 1:100 e 1h30min; grupo 2 = 1:100 e 3h; grupo 3 = 1:100 e 5h; grupo 4 = 2:100 e 1h30min; grupo 5 = 2:100 e 3h e grupo 6 = 2:100 e 5h.

Observa-se na Figura I.2 que a vantagem do emprego da menor temperatura de reação (30°C) ocorreu para os grupos 3, 4 e 6, pois obteve-se maior remoção de Phe. Para o grupo 2, não se encontrou diferença significativa entre os resultados obtidos para as duas temperaturas testadas. Por outro lado, a utilização da temperatura de 50 °C foi benéfica para os grupos 1 e 5, levando a uma maior remoção de Phe que a de 30 °C.

Era de se esperar que, trabalhando com valores de temperatura dentro ou próximo da faixa ótima de atuação da enzima, como é o caso de 50 °C, poderia favorecer a hidrólise protéica e, conseqüentemente, a liberação e a remoção de Phe. Entretanto, para a maioria dos casos estudados isto não foi observado (grupos 2, 3, 4 e

6) e o emprego da temperatura de 30 °C foi mais vantajoso, o que é interessante do ponto de vista econômico. Estes resultados indicam que fatores, tais como o grau de desnaturação protéica, associado à quantidade de enzima e tempo de reação, podem interferir nos resultados.

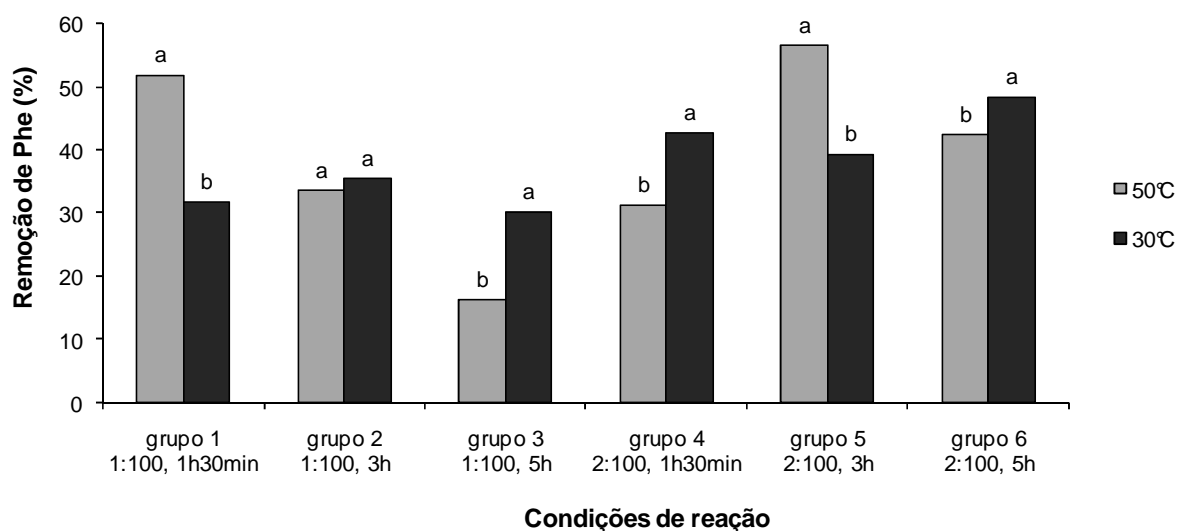


Figura I.2: Efeito da temperatura sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. 1:100 e 2:100 = valores para relação E:S. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre a influência da temperatura de hidrólise sobre a remoção de Phe de leite. No entanto, este parâmetro foi, anteriormente, avaliado no mesmo laboratório do presente trabalho, ao se utilizar a papaína no preparo de feijão com baixo teor de Phe. Assim, LOPES Jr. (2008), observou que o emprego de maior temperatura (25 °C e 50 °C) influenciou positivamente a remoção de Phe, obtendo resultados de 69,9% e 81,5%, respectivamente, ao se empregar a protease de *Papaya carica*, na relação E:S de 10:100, por 5 horas.

3.3.3 Efeito da relação enzima:substrato

Para esta avaliação, os hidrolisados foram divididos em seis grupos (Figura I.3), mantendo-se constantes os valores de temperatura e tempo de reação: grupo 1 = 30 °C e 1h30min; grupo 2 = 30 °C e 3h; grupo 3 = 30 °C e 5h; grupo 4 = 50 °C e 1h30min; grupo 5 = 50 °C e 3h e grupo 6 = 50 °C e 5h.

Foram testadas as relações E:S de 1:100 e 2:100 em todos os grupos, enquanto que a relação E:S de 4:100 somente foi testada nos grupos 3 e 5, a fim de avaliar a influência do emprego de uma maior quantidade de enzima, apenas nas condições em que se obteve os maiores teores de remoção, a 30 °C e a 50 °C, respectivamente.

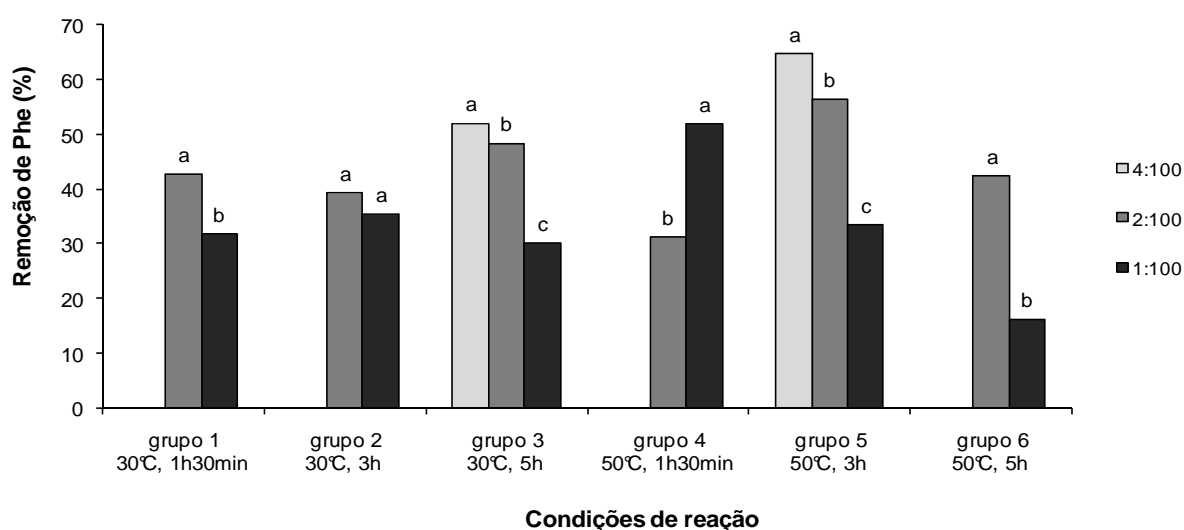


Figura I.3: Efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Como pode ser observado na Figura I.3, a vantagem da utilização de uma menor quantidade de enzima (menor relação E:S) ocorreu apenas para o grupo 4 (de 2:100 para 1:100), e não apresentou diferença significativa para o grupo 2. Já para os grupos 1, 3, 5 e 6, o emprego de uma maior relação E:S (2:100 ou 4:100) foi necessário para se obter uma maior remoção de Phe.

Em outros estudos realizados anteriormente no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, utilizando-se como matéria-prima leite em pó desnatado, diversas enzimas e condições de hidrólise protéica foram testadas, e os valores reportados apresentaram a mesma variação do presente trabalho, ou seja, em alguns casos, o emprego de uma maior relação E:S foi vantajoso, em outros não afetou ou foi prejudicial para a remoção de Phe (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006).

O conjunto destes resultados demonstra que, apesar de se esperar, teoricamente, que o emprego de uma maior relação E:S, uma maior temperatura e maior tempo de reação, 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.

3.3.4 Efeito da relação proteína:carvão ativado

A avaliação do efeito da relação proteína:carvão sobre a remoção de Phe foi realizada comparando-se os resultados obtidos para os hidrolisados H14 (relação proteína:CA = 1:22), H15 (relação proteína:CA = 1:44) e H16 (relação proteína:CA = 1:88).

Observa-se na Figura I.4 que a vantagem da utilização de uma menor quantidade de CA (maior relação proteína:CA) foi encontrada, uma vez que a maior remoção de Phe (64,6%) foi obtida com uma relação proteína:CA de 1:22, a qual foi bem superior às encontradas ao se utilizar maiores quantidades de carvão (1:44, 36,8% e 1:88, 39,1%).

Em estudo do mesmo Laboratório do presente trabalho que avaliou o efeito da relação proteína:CA na remoção de Phe de leite, na forma em pó e desnatado, foi mostrado que, ao contrário do presente trabalho, o emprego de diferentes quantidades de carvão ativado (relações proteína C:A de 1:118, 1:90 e 1:60) não afetou a remoção de Phe (média de 97%) (SOARES et al., 2006).

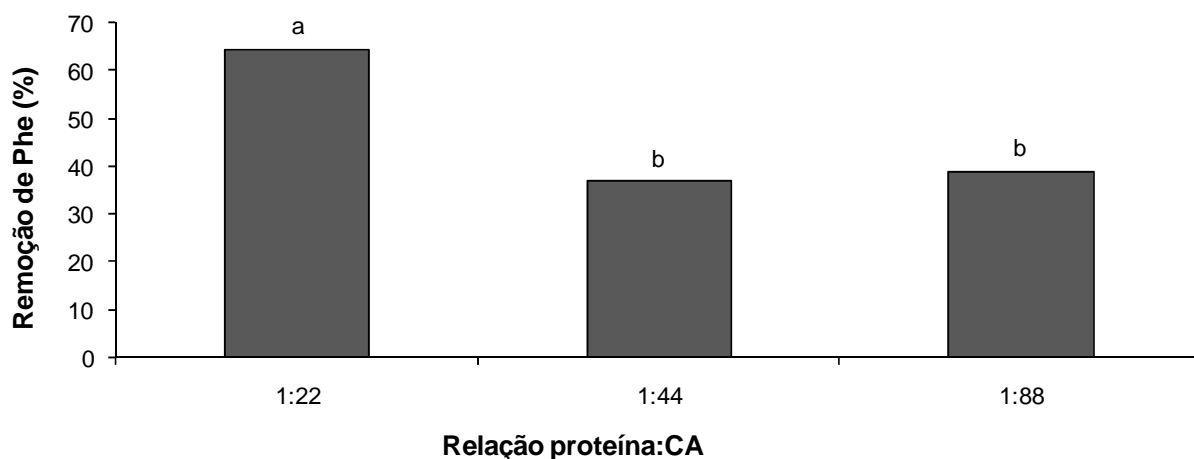


Figura I.4: Efeito da relação proteína:CA sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÃO

Empregando-se diversas condições de hidrólise das proteínas e quantidades variadas de CA como meio adsorvente, foi possível obter um leite com baixo teor de Phe (54,2mg/100 mL) que poderia ser utilizado na dieta de pacientes fenilcetonúricos. O melhor resultado obtido foi aquele em que se utilizou o tempo de reação de 3h, a temperatura de 50 °C, relação E:S de 4:100 e relação proteína:CA de 1:22, tendo atingido 64,6% de remoção de Phe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*. 16. ed. 3. rev. Arlington: AOAC International, 1995. 1141p.
- BIZZOTTO. C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; JUNQUEIRA, R.G. SILVESTRE, M.P.C. Uso da pancreatina e do carvão ativado no processo de preparo de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina. *Tecnol.óg.*, v. 10, p. 9-30, 2006a.
- BIZZOTTO. C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G. SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Ciên. Agrotec.*, v. 30, p. 308-316, 2006b.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isenta de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 novembro 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 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 dezembro 2003.
- CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; MACHADO, M.A.A.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da corolase pp e uso do carvão ativado na obtenção de hidrolisados protéicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina. *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, v.21, n.4, p.259-266, 2006.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V. SILVESTRE, M.P.C. Imobilização da papaína em carvão ativado e em alumina, visando sua utilização no preparo de formulações dietéticas. *Tecno-Lóg.*, v. 8, p. 83-89, 2004.

- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v.8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; FIGUEIREDO, A.F.S.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE M.P.C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v.20, n.3, p.117-126, 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. *Amer. J. Food Technol.*, 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.*, v. 24, p. 2027-2034, 2008.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arq Gastroenterol*, v. 36, n. 4, p. 227-236, 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.
- GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D.A.T. *Food composition data: production, management and use*. London: Chapman & Hal, 1992. 243p. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela/qual.asp>. Acesso em: 31/10/2007.
- GUAN, X.; YAO, H.; CHEN, Z; SHAN, L.; ZHANG, M. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by tripsin. *Food Chem.*, v. 101, p. 163-170, 2007.
- HAMMAN, K.; CLARK, H.; MONTINI, E.; AL-DHALIMY, M.; GROMPE, M.; FINEGOLD, M.; HARDING, C.O. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol. Therapy*, v.12, n.2, p.337-344, 2005.

- 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. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.2, p.438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v.671, n.1, p.33-37, 1981b.
- KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S.; SOARES, R.D.L.; STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B. Abordagem dietética para fenilcetonúria. *Rev. Med. Minas Gerais*, v. 11, n. 2, p. 129-134, 2001.
- LAURINDO, V.M; CALIL, T.; LEONE, C.R.; RAMOS, J.L.A. Composição nutricional de colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. *Pediatria (São Paulo)*, v. 14, p. 14-23, 1992
- LOPES, D.C.F; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Tech.*, v. 38, p. 447-453, 2004.
- LOPES, D.C.F; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Technol.*, v. 38, n. 5, p. 447-453, 2005.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Dietary Supplements for Phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr. Food Sci.*, 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. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, 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. 81 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- 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.
- MALLOY-DINIZ, L.F.; CARDOSO-MARTINS, C.; CARNEIRO, K.C.; CERQUEIRA, M.M.M.; FERREIRA, A.P.A.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L. Funções executivas em crianças fenilcetonúricas. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 62, n. 2-B, p.473-479, 2004.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Públ.*, v. 34, p. 86-96, 2000.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.*, v. 19, p. 381-387, 2006.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDIZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *App. Biochem. Microbiol.*, v. 29, p. 302-306, 1993.
- NOGUEIRA, F.A.G. *Disponibilidade de cálcio em leite adicionado de outros alimentos*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2007. 118 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- ORNELLAS, L.H. *Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos*. 7 ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 330 p.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.

- 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.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação*. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. *Alim. Nutr.*, v.16, n.1, p.21-31, 2005a.
- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Imobilização da pancreatina em carvão ativado e em alumina, visando sua utilização no preparo de formulações dietéticas. *Acta Sci. Health Sci.*, v.27, n.2, 2005b.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Amer. J. Food Technol.*, 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. 282, p. 603-612, 1993.
- SILVESTRE, M.P.C. ; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R. ; SILVA, M.C; LOPES Jr, C.O.; SILVA, V.D.M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Engineer.*, v. 5, n. 1, art. 2, 2009.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac. Bonaer.*, v. 25, p. 325-332, 2006.
- TBCA – USP – Tabela brasileira de composição de alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, versão 5.0. 2008. Disponível em < <http://www.fcf.usp.br/tabela/>> Acesso em: 24 de outubro de 2008.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci. Agric*, v. 51, n. 1, p. 131-137, 1994.

VIEIRA, C. R., LOPES Jr., C.O., RAMOS, C.S., CAPOBIANGO, M., SILVESTRE, M. P. C. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. *Ciênc. Tecnol. Alimen.*, v. 28, p. 599-606, 2008.

WASSERSTEIN, M.P.; SNYDERMAN, S.E.; SANSARICQ, C.; BUCHSBAUM, M.S. Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria. *Mol. Genet. Metabol.*, v.87, n.3, p.272–277, 2006.

CAPÍTULO II

EMPREGO DA PROTEASE DO *Bacillus subtilis* E DO CARVÃO ATIVADO NA OBTENÇÃO DE LEITE PARA PACIENTES FENILCETONÚRICOS

RESUMO

Considerando a importância do leite na dieta do brasileiro e a sua proibição para pacientes fenilcetonúricos, este trabalho teve como objetivo reduzir o teor de fenilalanina (Phe) deste alimento. Para isso, vários hidrolisados enzimáticos foram preparados, empregando-se uma protease do *Bacillus subtilis* e testando-se diversos parâmetros de reação, como o efeito do tempo, da temperatura e da relação E:S. A remoção da Phe foi realizada empregando-se o carvão ativado (CA) como meio adsorvente, e avaliou-se as relações proteína:CA de 1:22, 1:44 e 1:88. A eficiência da remoção foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda, determinando-se o teor de Phe livre no leite e em seus hidrolisados, após tratamento com CA. A maior remoção de Phe (75,9%) foi obtida empregando-se o tempo de 5h, a temperatura de 50 °C, a relação E:S de 4:100 e a relação proteína:CA de 1:22. Este ensaio originou um leite com teor final de 36,9mg de Phe/100 ml, o que permitiria a sua utilização por pacientes fenilcetonúricos.

Palavras-chave: fenilcetonúria; leite; proteínas, hidrólise protéica; remoção de fenilalanina.

ABSTRACT

USE OF A PROTEASE FROM *Bacillus subtilis* AND ACTIVATED CARBON FOR OBTAINING MILK FOR PHENYLKETONURIC'S PATIENTS. Considering the importance of milk in the diet of Brazilian people and its restriction to patients with phenylketonuria, this study aimed to reduce the phenylalanine (Phe) content of this food. Thus, several enzymatic hydrolysates were prepared, using a protease from *Bacillus subtilis* and the effect of some parameters were tested, such as E:S ratio, time and temperature of the reaction. Phe removal was performed using activated carbon (AC) as adsorbent support, and the protein:CA ratios of 1:22, 1:44 and 1:88 were evaluated. The efficiency of Phe removal was estimated by second derivative spectrophotometry, determining the Phe content in milk and in its hydrolysates, after treatment with AC. The highest Phe removal (75.9%) was achieved using a reaction time of 5h, a temperature of 50°C, an E:S ratio of 4:100 and a protein:AC ratio of 1:22. This assay resulted in a milk with a final Phe content of 36.9 mg /100 ml, which would allow its use by patients with phenylketonuria.

Keywords: phenylketonuria; milk; proteins; protein hydrolysis; phenylalanine removal.

1 INTRODUÇÃO

O leite é o produto da secreção das glândulas mamárias dos mamíferos, e ocupa um lugar relevante na alimentação de humanos de todas as idades, em especial devido às suas importantes propriedades nutricionais. No entanto, sua utilização na dieta de pacientes fenilcetonúricos é proibida. A fenilcetonúria (PKU) é um dos mais comuns erros inatos do metabolismo, causada pela deficiência parcial ou total da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), responsável pela catalisação da oxidação da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). A deficiência parcial ou total da atividade desta enzima leva a um acúmulo de Phe e de outros metabólitos que ocasionam um grave dano cerebral e, conseqüentemente, retardo mental (RAMASWAMI & SMITH, 1997; HENDRIKSZ & WALTER, 2004; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006; GIOVANNINI et al., 2007).

O tratamento da PKU, que deve ser iniciado até o 21º dia de vida, preconiza um rigoroso controle da ingestão protéica natural, de forma a manter os níveis de fenilalanina dentro de limites que previnam o dano cerebral (STARLING et al., 1999; HENDRIKSZ & WALTER, 2004). Devido à severa restrição a proteínas naturais, os fenilcetonúricos necessitam de uma fonte complementar de aminoácidos para garantir crescimento e desenvolvimento normais.

No Brasil, são utilizadas misturas de aminoácidos livres, importadas e de elevado custo. Além disso, a limitada oferta de alimentos com teores reduzidos de Phe, no mercado brasileiro, torna a dieta monótona, pouco atrativa e de difícil adesão (MIRA & MARQUEZ, 2000). Dessa forma, as proteínas hidrolisadas, isentas ou com baixo teor de fenilalanina, e com elevados teores de oligopeptídeos, constituem uma boa alternativa, uma vez que são mais efetivamente absorvidas e utilizadas pelo organismo do que proteínas intactas e misturas de aminoácidos livres (KEOHANE et al., 1985, GRIMBLE et al., 1986; RÉRAT, 1993; BOZA et al., 2000).

Considerando a importância do leite na alimentação, e o valor nutricional superior de suas proteínas hidrolisadas frente às misturas de aminoácidos, seria de grande interesse desenvolver tal alimento contendo teor reduzido de fenilalanina, destinado à alimentação de fenilcetonúricos.

Os métodos utilizados para a remoção da Phe baseiam-se em duas etapas principais: a liberação deste aminoácido por hidrólise química ou enzimática, e posterior remoção por meios adsorventes diferenciados. No mesmo laboratório do

presente trabalho, o tratamento enzimático vem sendo empregado, e diversas proteases e condições de hidrólise já foram avaliadas (MORATO et al., 2000; CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2007). Posteriormente, a remoção de Phe é realizada empregando-se meios adsorventes variados. Dentre eles, o carvão ativado foi utilizado com eficiência por este mesmo grupo de pesquisa para remover a Phe de leite em pó desnatado (LOPES et al., 2006 e SOARES et al., 2006), soro de leite (DE MARCO, et al., 2005; DELVIVO et al., 2005, 2006; SILVA et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), arroz (LOPES et al., 2008; SILVESTRE et al., 2009) e feijão (LOPES Jr., 2008).

A eficiência da remoção de Phe é efetuada por meio de sua quantificação na matéria-prima, assim como em suas proteínas hidrolisadas, após tratamento por um meio adsorvente. Para quantificar o teor de Phe em proteínas intactas ou hidrolisadas, a espectrofotometria derivada segunda (EDS) tem sido utilizada por diversos autores, mostrando ser uma técnica rápida, útil e confiável (ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a,b; O'HARVER, 1979; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1988). Esta técnica foi, igualmente, utilizada no mesmo laboratório do presente trabalho para a avaliação da remoção de Phe em diversos tipos de matéria-prima, tais como leite, na forma em pó e desnatado (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006), soro de leite em pó (LOPES et al., 2007), fubá de milho (CAPOBIANGO et al., 2007), arroz (LOPES et al., 2008; SILVESTRE et al., 2009) e feijão (LOPES Jr, 2008).

Assim, a partir da necessidade do desenvolvimento de alimentos que sirvam, primordialmente, como fonte protéica de alta qualidade para fenilcetonúricos, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de leite com teor reduzido de Phe. Neste sentido, empregou-se na hidrólise de suas proteínas uma protease do *Bacillus subtilis* (subtilisina), e verificou-se o efeito de diversos parâmetros neste processo, tais como relação enzima:substrato, tempo e temperatura de reação. Além disso, estudou-se a influência da relação proteína:CA no processo de remoção de Phe pelo carvão ativado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O leite integral UHT (Itambé, Pará de Minas, Minas Gerais) foi adquirido no comércio de Belo Horizonte, MG, Brasil. A protease de *Bacillus subtilis* (Corolase® N, metalo-protease – EC 3.4.24.28, atividade 3,6 U/mL, pH ótimo entre 6,5 e 7,5, temperatura ótima entre 45 e 55°C), foi cedida pela AB Enzymes Brasil Comércio Ltda (Barueri, SP, Brasil). O carvão ativado (CA) com três diferentes granulometrias (20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh série Tyler) foi adquirido da Carbomafra S.A. (Curitiba, PR, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação da composição química do leite

A composição química do leite foi determinada segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), sendo todas as análises realizadas em triplicatas. O método dessecação em estufa ventilada (Quimis Q-314M242 série 020, Diadema, SP) a 105 °C até peso constante, foi utilizado para determinar o teor de umidade; o teor de proteína foi obtido pelo método de micro-Kjeldahl utilizando 6,38 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína total (GREENFIELD & SOUTHGATE, 1992); o teor de minerais obtido por incineração em mufla a 550 °C e os lipídeos foram determinados pelo método de BLIGH & DYER (1959). O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteínas, lipídeos totais e cinzas totais.

2.2.2 Hidrólise enzimática das proteínas do leite

A protease de *Bacillus subtilis* (subtilisina) foi empregada para hidrolisar as proteínas do leite, obtendo-se 16 hidrolisados, tendo sido variados os seguintes parâmetros: relação enzima:substrato, temperatura e tempo de reação (Tabela II.1).

Inicialmente, 50 mL de leite foram colocados em erlenmeyer e o pH medido (6,7). Em seguida, levou-se ao banho de vaselina líquida, sobre agitador magnético, com agitação constante, para que fosse atingida a temperatura a ser avaliada. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se a enzima na quantidade suficiente para atingir 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, confirmado pela medida da atividade enzimática antes e após o tratamento térmico, pelo método de DIAS et al. (2008).

Tabela II.1: Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados protéicos de leite e na remoção de fenilalanina

Hidrolisados	Hidrólise enzimática			Remoção de Phe
	Temperatura	Tempo	E:S	Relação Proteína:CA
H1	30°C	1h30min	1	1:22
H2	30°C	3h	1	1:22
H3	30°C	5h	1	1:22
H4	50°C	1h30min	1	1:22
H5	50°C	3h	1	1:22
H6	50°C	5h	1	1:22
H7	30°C	1h30min	2	1:22
H8	30°C	3h	2	1:22
H9	30°C	5h	2	1:22
H10	50°C	1h30min	2	1:22
H11	50°C	3h	2	1:22
H12	50°C	5h	2	1:22
H13	30°C	5h	4	1:22
H14	50°C	5h	4	1:22
H15	50°C	5h	4	1:44
H16	50°C	5h	4	1:88

E:S = Relação enzima substrato; CA = carvão ativado

2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite

A remoção da Phe foi realizada pela utilização do CA como meio adsorvente, empregando-se 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 primeiro o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por último o de maior granulometria. Em sequência, 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 BE11778, São Paulo, SP, Brasil), tendo sido recolhidos os eluatos.

2.2.4 Efeito de alguns parâmetros sobre o preparo dos hidrolisados protéicos isentos de fenilalanina

O efeito da temperatura foi avaliado testando-se os valores de 30°C e 50°C. O efeito do tempo de reação foi testado utilizando-se os valores de 1h30min, 3h e 5h. Para o estudo da influência da relação enzima:substrato foram utilizadas as relações de 1:100, 2:100 e 4:100. Finalmente, o efeito da relação proteína:CA, foi estudado nas seguintes proporções 1:22, 1:44 e 1:88 (Tabela II.1).

2.2.5 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina

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

O software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, EUA) foi utilizado para traçar os espectros da derivada segunda.

Para a curva padrão, soluções estoques de Phe ($6,05 \times 10^{-4}$ mol/L), Tyr ($5,52 \times 10^{-4}$ mol/L) e Trp ($4,90 \times 10^{-4}$ mol/L) foram preparadas em tampão fosfato de sódio a 0,01 mol/L (pH 6,0). Em seguida, 10 mL de cada uma destas soluções foram misturados e a solução obtida foi diluída, sucessivamente, de maneira a se obter concentrações de Phe variando de 0,067 a $2,018 \times 10^{-4}$ mol/L. A eficiência da remoção de Phe foi calculada de acordo com a equação (1)

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

sendo,

Teor de Phe inicial = teor de Phe no leite

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

2.2.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em três repetições e as análises foram 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 LEITE

Na Tabela II.2 estão apresentados os resultados obtidos para a composição química do leite empregado como matéria-prima no presente trabalho, assim como os dados da literatura e do rótulo utilizados a título de comparação. Observa-se que, embora diversos fatores sejam capazes de influenciar a composição química do leite, assim como o emprego de diferentes métodos de análise (SGARBIERI et al., 1996; ORNELLAS, 2001), os resultados obtidos estão muito próximos dos descritos na literatura e dos citados no rótulo do produto. Os dados da literatura utilizados para comparação de resultados referem-se a trabalhos realizados com leite integral UHT, sendo que no de NOGUEIRA (2007) foram utilizadas as mesmas metodologias do presente trabalho.

Tabela II.2: Composição química do leite

Componentes	Resultados ¹	Rótulo ²	TBCA ³	NOGUEIRA ⁴
Umidade (g/100g)	88,58	-	86,68	88,26
Proteínas (g/100g)	2,99	3,10	2,97	2,87
Lipídeos (g/100g)	2,72	3,00	3,04	2,81
Cinzas (g/100g)	0,67	-	0,79	0,76
Carboidratos (g/100g)	5,04	4,40	6,52	5,30

Fonte: ¹Resultados obtidos no presente trabalho. ²Dados disponíveis no rótulo do produto. ³TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, USP (2008). ⁴NOGUEIRA (2007).

3.2 EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Na Tabela II.3 estão apresentados os resultados obtidos para a remoção de Phe dos diferentes hidrolisados protéicos de leite, onde os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg de Phe/100g de hidrolisado), sendo esta última, a forma mais apropriada para os cálculos de

adequação das prescrições dietéticas de substitutos protéicos destinados a fenilcetonúricos, além de atender a regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos (BRASIL, 2003). O teor de Phe encontrado no leite foi de 153mg/100 mL, resultado bastante semelhante aos encontrados na literatura que foram de 157mg/100 ml e 173mg/100 mL, relatados por VERRUMA e SALGADO (1994) e LAURINDO et al. (1992), respectivamente, para leite de vaca integral.

Tabela II.3: Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados protéicos de leite

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg/100 mL de leite)
H1	38,2 ^{fg}	94,6
H2	43,0 ^{ef}	87,3
H3	34,7 ^{gh}	100,1
H4	32,7 ^h	103,1
H5	51,9 ^c	73,7
H6	58,8 ^b	63,1
H7	42,0 ^{ef}	88,7
H8	34,5 ^{gh}	100,3
H9	48,0 ^{cd}	79,6
H10	46,0 ^{de}	82,7
H11	49,2 ^{cd}	77,7
H12	57,7 ^b	64,8
H13	61,7 ^b	58,7
H14	75,9 ^a	36,9
H15	39,7 ^f	92,3
H16	45,4 ^{de}	83,6

Phe=fenilalanina. Teor final de Phe = teor de Phe dos hidrolisados após tratamento com carvão ativado. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Como pode ser observado, o percentual de remoção de Phe do leite variou entre 32,7% e 75,9%, obtendo um teor final de Phe entre 36,9mg e 103,1mg de Phe por 100 mL de leite, demonstrando, assim, a eficácia do carvão ativado como meio adsorvente. Dentre todas as condições de hidrólise testadas, 13 delas (H1 e H2, de H5 a H7 e de H9 a H16) deram origem a um leite que poderia ser utilizado na dieta de pacientes fenilcetonúricos, pois apresentam um baixo teor de Phe, que de acordo com a legislação brasileira, o limite máximo de Phe permitido em formulações dietéticas destinadas a estes pacientes é de 100mg de Phe/100 mL de produto (BRASIL, 2002) Vale, ainda, ressaltar que as proteínas deste leite estão hidrolisadas, e segundo FRENHANI & BURINI (1999), esta é a forma em que estes nutrientes são mais rapidamente absorvidos pelo organismo, por apresentarem menor osmolaridade, melhor tolerância e aceitação, em relação às misturas de aminoácidos livres que são comumente utilizadas na dieta destes pacientes.

Anteriormente, no mesmo laboratório do presente trabalho, foi estudada a remoção de Phe de leite que, no entanto, foi empregado na forma de pó e desnatado (LOPES et al., 2006 e SOARES et al., 2006) e sob condições experimentais diferentes, principalmente as relacionadas à concentração da matéria-prima (0,35g/100 ml), tipo e modo de emprego das enzimas (protease de *Aspergillus oryzae* – AO, associada com papaína - PA) , relação E:S (1:100 AO + 2:100 PA, 10:100 AO + 20:100 PA, para LOPES et al., 2006 e SOARES et al., 2006, respectivamente) e relação proteína:CA (1:118 e 1:90, para LOPES et al., 2006 e SOARES et al., 2006, respectivamente). Acrescenta-se, ainda, que no estudo de LOPES et al. (2006), o CA foi utilizado em solução. Assim, neste último trabalho foi possível obter até 99% de remoção de Phe, enquanto que no estudo de SOARES et al. (2006) o maior valor obtido foi de 98%, resultados estes bem superiores ao máximo obtido no presente trabalho. Ressalta-se, entretanto, que o emprego de uma solução muito diluída de matéria-prima (24 vezes menos concentrada do que a do presente trabalho), assim como de uma quantidade de CA muito elevada (até 5 vezes maior do que a do presente trabalho) tornariam o processo economicamente inviável para ser adaptado em larga escala. Acrescenta-se, ainda, as desvantagens econômicas e tecnológicas de se utilizar, como no estudo de SOARES et al., 2006, valores muito elevados de relação E:S (10:100 AO + 20:100 PA).

Não foram encontrados na literatura trabalhos de outros autores que relatassem a remoção de Phe de leite, entretanto, dois estudos avaliaram a remoção de Phe da principal proteína do leite. Assim, LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) removeram 92% de

Phe de hidrolisados protéicos de caseína, obtidos pela ação de uma protease do *Aspergillus oryzae* (E:S = 1:100, 5h de reação), seguida da papaína (E:S = 2:100, 21h de reação), tratados com CA (em uma relação de 3g de CA por g de caseína). Já MOSZCZYNSKI & IDZIAK (1993), utilizando um sistema de três enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase,), todas empregadas em uma relação E:S de 1:100, a uma temperatura de 40 °C, durante 72h de reação e a um pH de 8,6, também removeram, através do CA (375mg de CA para 10 mL de hidrolisado) , 89,5% de Phe de hidrolisados de caseína. Cabe ressaltar que em ambos os trabalhos foram utilizados tempos extremamente longos de reação (26h e 72h, respectivamente), tornando tais métodos inviáveis para aplicação em larga escala, além de elevar a possibilidade de uma contaminação microbiana.

3.3 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

A análise dos parâmetros de reação e de remoção empregados foi conduzida considerando-se a aplicabilidade do processo em larga escala e a redução dos gastos envolvidos. Assim, o emprego de uma menor relação E:S está associado à utilização de menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise; o de uma menor temperatura e tempo de reação está associado à redução de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia; o de uma menor quantidade de carvão ativado (maior relação proteína:CA), implica em menores gastos, por ser o insumo de maior custo utilizado no processo.

3.3.1 Efeito do tempo de reação

A influência do tempo de reação sobre a remoção de Phe foi avaliada comparando-se os hidrolisados divididos em quatro grupos (grupo 1 = 30 °C e 1:100; grupo 2 = 50 °C e 1:100; grupo 3 = 30 °C e 2:100 e grupo 4 = 50 °C e 2:100) visando manter constantes a temperatura e a relação enzima:substrato (E:S) (Figura II.1).

A vantagem da utilização de um menor tempo de reação pode ser observada na Figura II.1, sendo que esta ocorreu em um caso do grupo 1 (5h para 3h) e um caso do grupo 3 (3h para 1h30min), pois obteve-se maior remoção de Phe. Já, para todas as outras condições testadas foi necessária a utilização de um maior tempo de reação (5h) para se obter a maior remoção de Phe.

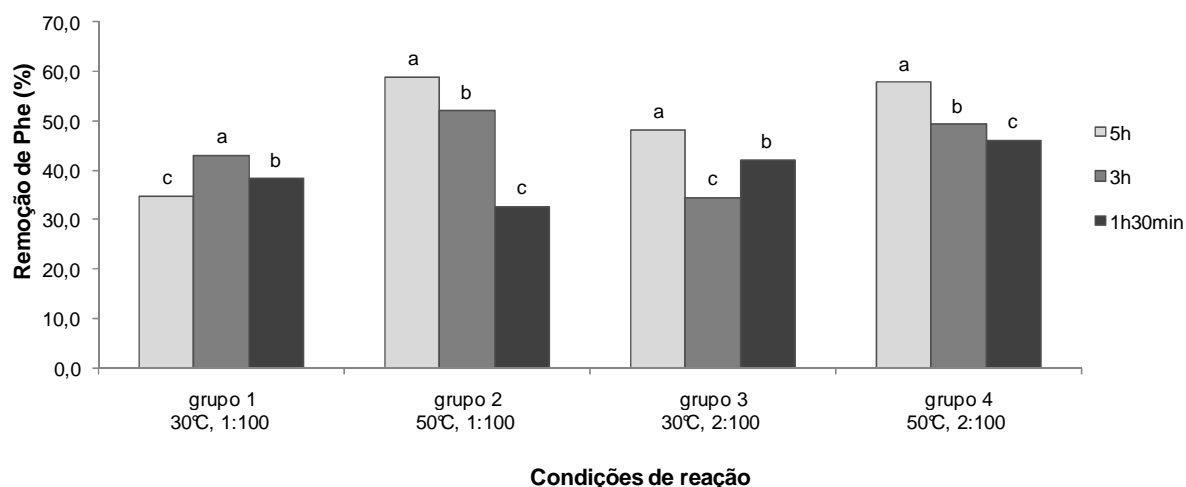


Figura II.1: Efeito do tempo de reação sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. 1:100 e 2:100 = valores para relação E:S. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade

De acordo com a teoria, não é esperado que o emprego de um menor tempo de reação não alterasse ou levasse a uma maior remoção de Phe. No entanto, os resultados alcançados no presente trabalho demonstraram que, pelo menos, em algumas situações isto pode ocorrer. Assim, em um caso do 1 (5h para 3h) e um caso do grupo 3 (3h para 1h30min), ocorreu uma elevação da remoção de Phe com o emprego de uma menor temperatura. Uma provável explicação para isto estaria associada ao fato de que alguns fatores poderiam estar contribuindo para a redução da taxa de hidrólise, com o passar do tempo. Assim, de acordo com GUAN et al. (2007), dentre estes fatores encontram-se a redução das ligações peptídicas específicas para ação da enzima, a inativação enzimática e a competição entre a proteína nativa e os peptídeos formados constantemente durante a hidrólise. Nestes casos, ao se utilizar um maior tempo de reação pode ter havido uma maior desnaturação protéica impedindo a ação enzimática, e complexação das proteínas já hidrolisadas com a lactose e o cálcio, impedindo uma remoção mais eficiente de Phe (GUAN et al., 2007).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem o efeito do tempo de hidrólise sobre a remoção de Phe de hidrolisados protéicos.

3.3.2 Efeito da temperatura de reação

Os hidrolisados foram divididos em seis grupos (Figura II.2), a fim de se avaliar a influência da temperatura de reação na remoção de Phe, mantendo-se constantes a relação E:S e o tempo de reação: grupo 1 = 1:100 e 1h30min; grupo 2 = 1:100 e 3h; grupo 3 = 1:100 e 5h; grupo 4 = 2:100 e 1h30min; grupo 5 = 2:100 e 3h e grupo 6 = 2:100 e 5h.

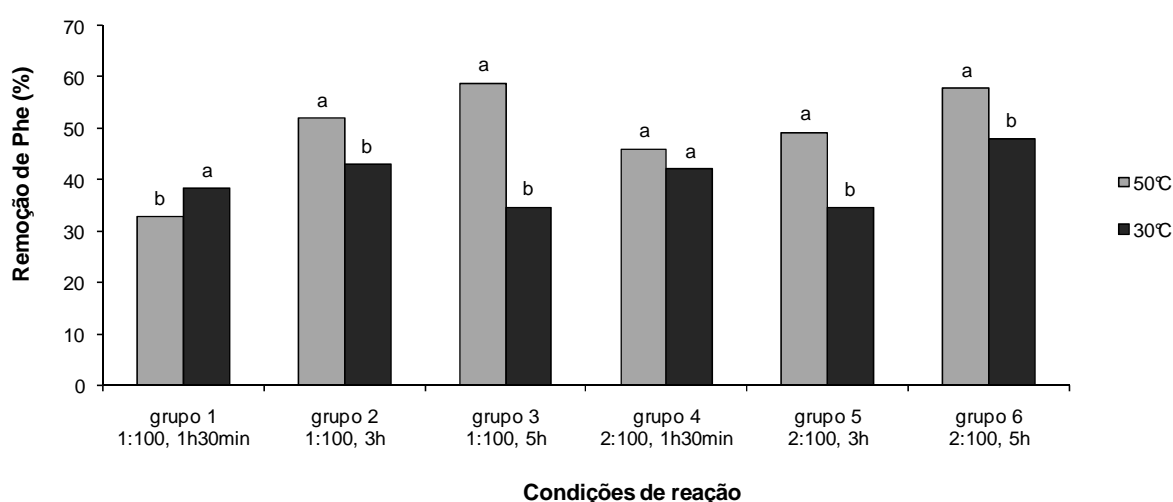


Figura II.2: Efeito da temperatura sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. 1:100 e 2:100 = valores para relação E:S. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Como pode ser observado na Figura II.2, o emprego da menor temperatura de reação (30 °C) originou resultados vantajosos somente para o grupo 1, pois obteve-se maior remoção de Phe. Para o grupo 4, não se encontrou diferença significativa entre os resultados obtidos para as duas temperaturas testadas. Por outro lado, a utilização da temperatura de 50 °C foi benéfica para os grupos 2, 3, 5 e 6, levando a uma menor remoção de Phe que a de 30 °C. Este resultado poderia ser explicado, provavelmente, pelo fato da temperatura de 50 °C estar na faixa ótima de atuação da enzima utilizada que, segundo o fornecedor, está entre 45 e 55 °C, o que provavelmente, favoreceu a

interação da enzima com seu substrato, levando a uma maior exposição da Phe e, conseqüentemente, à maior remoção deste aminoácido pelo carvão ativado.

Resultados semelhantes foram obtidos por LOPES Jr. (2008), em estudo realizado no mesmo laboratório do presente trabalho, ao utilizar a papaína, na relação E:S de 10:100, por 5h, no preparo de feijão com baixo teor de Phe. Foi observado que, o emprego de uma maior temperatura (25 °C e 50 °C), possibilitou uma maior remoção de Phe, 69,9% e 81,5%, respectivamente.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre a influência da temperatura de hidrólise sobre a remoção de Phe de leite.

3.3.3 Efeito da relação enzima:substrato

Visando avaliar o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe, os hidrolisados foram divididos em seis grupos (Figura II.3), mantendo-se constantes os valores de temperatura e tempo de reação: grupo 1 = 30 °C e 1h30min; grupo 2 = 30 °C e 3h; grupo 3 = 30 °C e 5h; grupo 4 = 50 °C e 1h30min; grupo 5 = 50 °C e 3h e grupo 6 = 50 °C e 5h.

A relação E:S de 4:100 somente foi avaliada nos grupos 3 e 6, com objetivo de verificar se a utilização de uma maior quantidade de enzima iria influenciar na remoção de Phe, nas condições em que se obteve os melhores resultados, a 30 °C e a 50 °C, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura II.3, a vantagem da utilização de uma menor quantidade de enzima (menor relação E:S) ocorreu para os grupos 2 e 5 (2:100 para 1:100), e não apresentou diferença significativa para o grupo 1 e para um caso do grupo 6 (2:100 para 1:100). Já para os grupos 3, 4, 6, o emprego de uma maior relação E:S (2:100 ou 4:100) foi necessário para se obter uma maior remoção de Phe.

Outros trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, em que se utilizou o leite em pó desnatado e avaliou-se diversas condições de hidrólise enzimática, também apresentaram a mesma variação do presente trabalho, ou seja, em alguns casos, o emprego de uma maior relação E:S foi vantajoso, em outros não afetou ou foi prejudicial para a remoção de Phe (LOPES et al., 2006; SOARES et al., 2006).

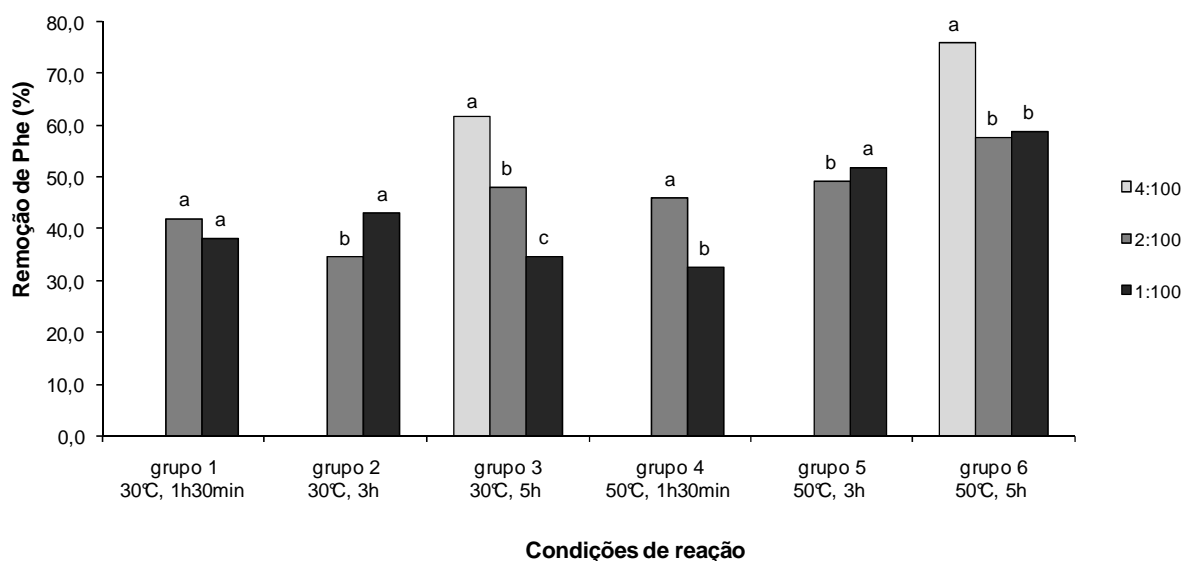


Figura II.3: Efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. Médias indicadas por letras iguais, para um mesmo grupo, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Os resultados acima citados evidenciam que, embora se espere, teoricamente, que o emprego de uma maior relação E:S, uma maior temperatura e maior tempo de reação, 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.

3.3.4 Efeito da relação proteína:carvão ativado

Com o objetivo de avaliar a influência da relação proteína:carvão sobre a remoção de Phe, foram comparados os resultados obtidos para os hidrolisados H14 (relação proteína:CA = 1:22), H15 (relação proteína:CA = 1:44) e H16 (relação proteína:CA = 1:88).

Pode-se observar na Figura II.4 que o emprego de uma menor quantidade de CA (maior relação proteína:CA) foi benéfico, uma vez que a maior remoção de Phe foi obtida com uma relação proteína:CA de 1:22, a qual foi bem superior às encontradas

ao se utilizar maiores quantidades de carvão (1:44 e 1:88), o que é mais vantajoso para aplicação em larga escala.

No estudo de SOARES et al., 2006, realizado no mesmo Laboratório do presente trabalho, foram observados resultados diferentes aos aqui encontrados. Ao se avaliar o efeito da relação proteína:CA na remoção de Phe de leite, na forma em pó e desnatado, o emprego de diferentes quantidades de carvão ativado (relações proteína C:A de 1:118, 1:90 e 1:60) não afetou a remoção de Phe (média de 97%).

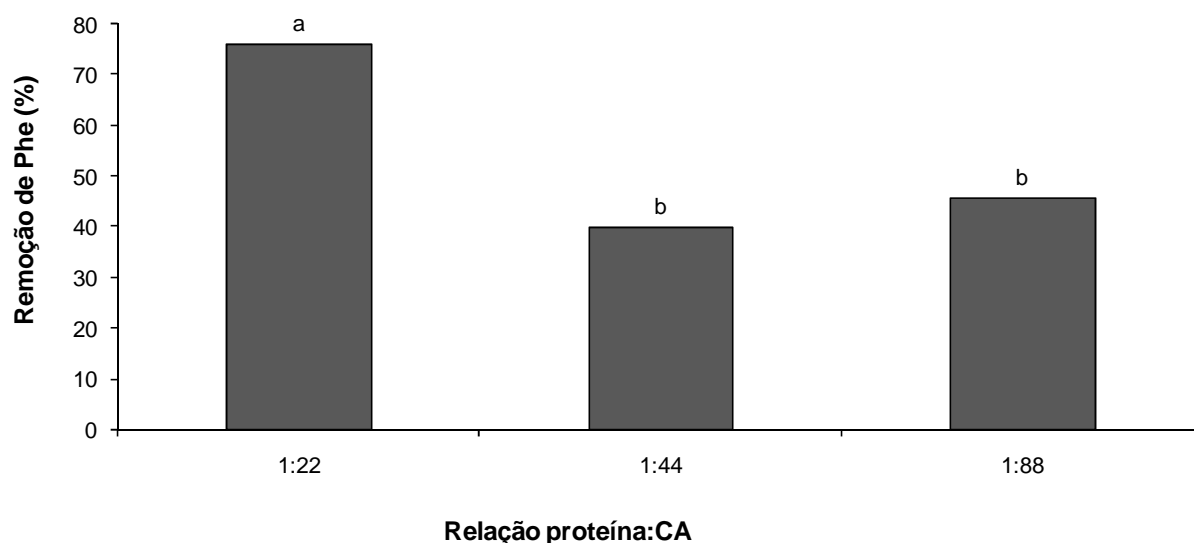


Figura II.4: Efeito da relação proteína:CA sobre a remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÃO

O carvão ativado (CA) mostrou-se eficaz na remoção de Phe de proteínas hidrolisadas de leite, obtidas com o emprego da protease de *Bacillus subtilis*, sob diversas condições hidrolíticas, com porcentagens de remoção que variaram de 32,7% a 75,9%. O melhor resultado obtido foi aquele em que se utilizou o tempo de 5h, a temperatura de 50 °C, a relação E:S de 4:100 e a relação proteína:CA de 1:22, dando origem a um leite com teor final de 36,9mg de Phe/100mL, o que permitiria sua inserção na dieta de fenilcetonúricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*. 16. ed. 3. rev. Arlington: AOAC International, 1995. 1141p.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911-917, 1959
- BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.O.B. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isenta de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 novembro 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 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 dezembro 2003.
- 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. *Inter. J. Food Engineer.*, v. 3, p. 1-19, 2007
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; ORNELLAS, C.B.D.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farmac. Bonaer*, v. 23, n. 1, p.17-25, 2004.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v.8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; FIGUEIREDO, A.F.S.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE M.P.C. Desenvolvimento de formulação

dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v.20, n.3, p.117-126, 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.. *Amer. J. Food Technol.*, 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.*, v. 24, p. 2027-2034, 2008.

FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arq Gastroenterol*, v. 36, n. 4, p. 227-236, 1999

GIOVANNINI, M.; VERDUCI, E.; SALVATICI, E.; FIORI, L.; Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. *J. Inherit Metab. Dis.*, v. 30 p. 145-152, 2007.

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.

GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D.A.T. *Food composition data: production, management and use*. London: Chapman & Hal, 1992. 243p. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela/qual.asp>. Acesso em: 31/10/2007.

GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS,B.E.; KAMINSK Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65-69, 1986.

GUAN, X.; YAO, H.; CHEN, Z; SHAN, L.; ZHANG, M. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by tripsin. *Food Chem.*, v. 101, p. 163-170, 2007

HENDRIKSZ, C.J.; WALTER, J.H. Update on phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 14, p. 400-406, 2004.

- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivate spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 494, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.2, p.438-444, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 671, p. 33-37, 1981b.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut*, v. 26, p. 907-913, 1985.
- LAURINDO, V.M; CALIL, T.; LEONE, C.R.; RAMOS, J.L.A. Composição nutricional de colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. *Pediatria (São Paulo)*, v. 14, p. 14-23, 1992
- LOPES, D.C.F; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Technol.*, v. 38, n. 5, p. 447-453, 2005.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Dietary Supplements for Phenylketonuria: Removing Phe by Activated Carbon. *Nutr. Food Sci.*, 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. *J. Food Techonol.*, 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.. *J. Food Techonol*, v. 6, p. 57-65, 2008.
- 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. 81 p. (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.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Públ.*, v. 34, p. 86-96, 2000.
- MONTEIRO, L.T.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.*, v. 19, p. 381-387, 2006.
- MORAIS, H.A.; MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria*, v. 34, p. 59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, v. 13, p. 843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDIZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *App. Biochem. Microbiol.*, v. 29, p. 302-306, 1993.
- NOGUEIRA, F.A.G. *Disponibilidade de cálcio em leite adicionado de outros alimentos*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2007. 118 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- O'HAVER, T.C.; GREEN, G.L. Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. *Anal. Chem.*, v. 48, n. 2, 1976

- ORNELLAS, L.H. *Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos*. 7 ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 330 p.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477 p.
- RAMASWAMI, U.; SMITH, I. Phenylketonuria. *Curr. Paediatrics*, v. 7, p. 251-255, 1997.
- RÉRAT, A. A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism, *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. v. 35, p. 753-761, 1988.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação*. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Amer. J. Food Technol.*, v. 2, p. 327-341, 2007
- SILVESTRE, M.P.C. ; VIEIRA, C.R.; SILVA, M.R. ; SILVA, M.C; LOPES Jr, C.O.; SILVA, V.D.M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Engineer.*, v. 5, n. 1, art. 2, 2009.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.Jb.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac. Bonaer.*, v. 25, p. 325-332, 2006.
- SOARES, R. D. L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R; SILVESTRE, M. P. C. Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol.*, v. 21, n. 1, p. 45-56, 2007.
- STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. *Rev. Med. Minas Gerais*, v. 9, p. 106 - 110, 1999.

TBCA – USP – Tabela brasileira de composição de alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, versão 5.0. 2008. Disponível em < <http://www.fcf.usp.br/tabela/>> Acesso em: 24 de outubro de 2008

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci. Agric*, v. 51, n. 1, p. 131-137, 1994.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS: COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EMPREGANDO-SE AS DUAS PROTEASES

Ressalta-se, inicialmente, que não foi encontrado na literatura qualquer relato abordando a comparação do efeito de duas proteases sobre a remoção de fenilalanina de alimentos.

1. EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE FENILALANINA

As condições hidrolíticas e de remoção de fenilalanina testadas neste estudo foram eficientes na obtenção de leite com baixo teor de fenilalanina, empregando-se tanto a protease do *Aspergillus sojae* quanto a subtilisina. Os resultados apontam que, dentre as 16 condições, de hidrólise e remoção, testadas para cada enzima, 11 e 13 delas, empregando-se a primeira e segunda enzima, respectivamente, foram suficientes para se obter teores abaixo de 100mg/100 mL de leite, nível máximo permitido pela legislação de alimentos para fenilcetonúricos (BRASIL, 2003). Conclui-se, portanto, que estas duas enzimas foram semelhantes no que diz respeito à eficiência na obtenção de leite com teor reduzido de Phe, considerando-se o número de amostras estudado.

2. EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

2.1 EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO

A vantagem da utilização de um menor tempo de reação, ao se utilizar a protease do *A. sojae*, ocorreu para três condições hidrolíticas (a 50 °C e em uma relação E:S de 1:100, de 5h para 3h e 3h para 1h30min; a 50 °C, E:S de 2:100, de 5h

para 1h30min). No caso da subtilisina, este mesmo resultado foi obtido em 2 casos (a 30 °C, E:S de 1:100, de 5h para 3h, e a 30 °C, E:S de 2:100, de 3h para 1h30min).

Ressalta-se, que a vantagem da utilização de um menor tempo de reação ocorreu sempre a 50 °C para a protease do *A. sojae*, enquanto que para a subtilisina este fato foi observado sempre a 30 °C.

Acrescenta-se, ainda, que, se por um lado, o emprego da protease do *A. sojae* mostrou-se ligeiramente mais vantajoso, pois foi possível obter maior remoção de Phe em menores tempos de reação em um maior número de casos (3), quando comparada à subtilisina (2 casos); por outro lado, foi necessária uma maior temperatura para alcançar tais resultados, 50 °C, enquanto que a subtilisina teve sua melhor atuação em menores tempos de reação a 30 °C.

Assim, para a escolha de uma destas enzimas, especialmente na aplicação em larga escala, deve-se considerar a relação custo/benefício da utilização de um maior tempo ou de uma temperatura mais elevada.

2.2 EFEITO DA TEMPERATURA

A vantagem da utilização de uma menor temperatura (30 °C), para a protease do *A. sojae*, foi obtida em 3 casos: E:S de 1:100 e 5h; E:S de 2:100 e 1h30min e E:S de 2:100 e 5h, e não apresentou diferença significativa para E:S de 1:100 e 3h. Já, para a subtilisina, este benefício do emprego de 30 °C somente foi observado para um caso: a 1:100 e 1h30min.

Considerando, apenas, o parâmetro temperatura, a utilização da protease do *A. sojae*, mostrou-se vantajosa frente à subtilisina, uma vez que com o emprego de 30 °C de reação foi possível obter maiores teores de remoção em metade das condições estudadas (3 em 6).

2.3 EFEITO DA RELAÇÃO E:S

A vantagem da utilização de uma menor relação E:S (de 2:100 para 1:100) foi observada apenas em um caso para a protease do *A. sojae* (50 °C e 1h30min). Já, para a subtilisina, este resultado foi obtido em dois casos, ao se comparar 2:100 com 1:100: ambos a 3h de reação, um a 30 °C e outro a 50 °C. Assim, conclui-se que, no que diz respeito ao efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe, as duas enzimas estudadas apresentaram resultados semelhantes.

No entanto, o conjunto de resultados sobre a avaliação da quantidade de enzima demonstrou que, para ambas as enzimas, a relação E:S de 4:100 (maior quantidade de enzima utilizada) foi necessária para se obter as maiores taxas de remoção de Phe (64,6% e 75,9% para a protease do *A. sojae* e para a subtilisina, respectivamente).

2.4 EFEITO DA RELAÇÃO PROTEÍNA:CARVÃO ATIVADO

No que se refere ao efeito da relação proteína:carvão ativado (CA) necessária para se alcançar os maiores teores de remoção de Phe, foi observado para as duas enzimas o efeito benéfico da utilização de uma menor quantidade de CA, pois os melhores resultados foram obtidos com um valor de 1:22, o que se mostrou muito vantajoso quando comparado aos outros valores testados (1:44 e 1:88). Desta forma, as duas enzimas apresentaram resultados iguais em relação à quantidade de carvão ativado necessária para se obter maiores taxas de remoção de Phe (64,6% e 75,9% para a protease do *A. sojae* e para a subtilisina, respectivamente).

3. COMPARAÇÃO DOS MELHORES RESULTADOS OBTIDOS PARA AS DUAS ENZIMAS

Os melhores resultados obtidos para as duas enzimas estão apresentados na Figura 1. Como pode ser observado, a subtilisina levou a uma taxa de remoção de Phe superior a obtida com a protease do *A. sojae* (75,9% e 64,6%, respectivamente). Os parâmetros utilizados no preparo destes dois hidrolisados protéicos foram quase todos os mesmos para as duas enzimas, ou seja, temperatura de 50 °C e a relação E:S de 4:100. Apenas o tempo de reação foi diferente, sendo de 5h para a subtilisina e de 3h para a protease do *A. sojae*.

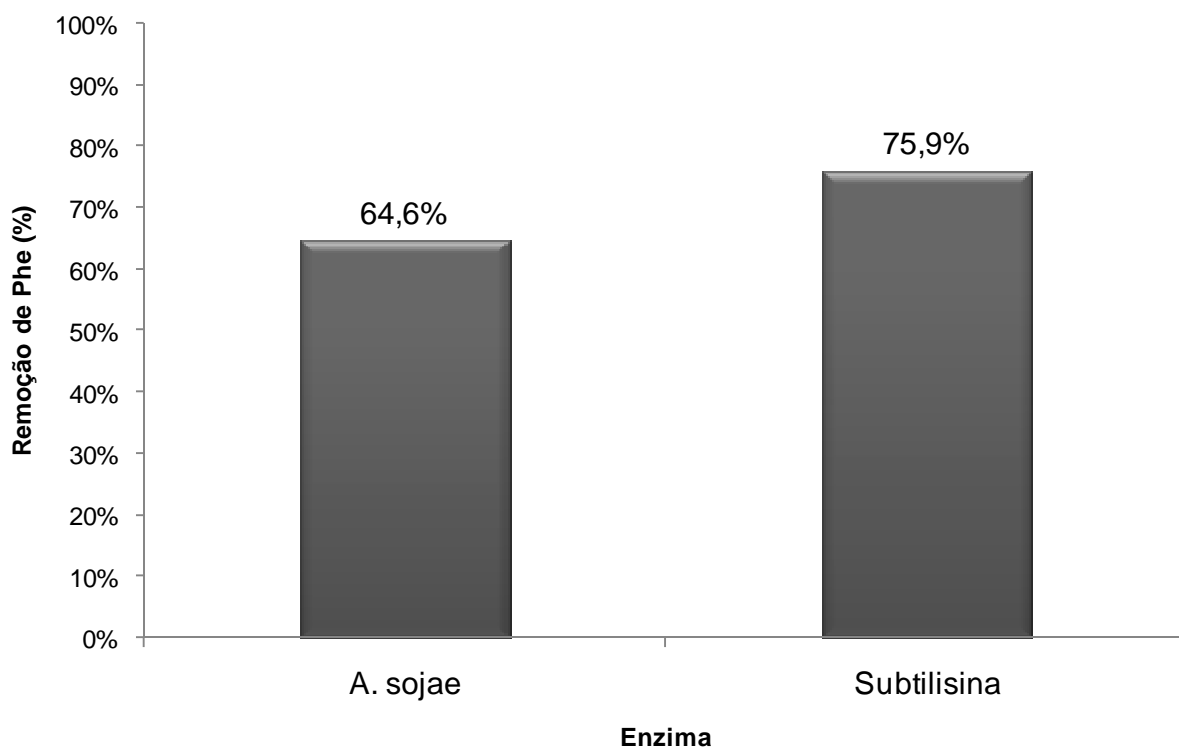


Figura III.1: Melhores resultados obtidos para as duas enzimas.

4. CONCLUSÃO

Ao se comparar os resultados obtidos para remoção de Phe de leite, pelo emprego das duas enzimas testadas, protease do *Aspergillus sojae* e subtilisina, pode-se concluir que a utilização da primeira foi mais vantajosa do ponto de vista econômico, pois se obteve um maior número de casos em que condições hidrolíticas menos dispendiosas foram mais favoráveis, em especial, em menores tempos e temperaturas de reação. No entanto, não se descarta a possibilidade de utilização da subtilisina, uma vez que a mesma apresentou maior número de resultados favoráveis e maiores teores de remoção.

PERSPECTIVAS

Além do aspecto científico, evidenciado na revisão de literatura, este trabalho foi, igualmente, desenvolvido com o intuito de possibilitar a aplicação em larga escala da produção de um leite com teor reduzido de fenilalanina (Phe), tanto do ponto de vista econômico quanto técnico. Os resultados encontrados foram satisfatórios, uma vez que foram obtidas taxas de remoção de Phe adequadas sob condições menos dispendiosas, como menores tempos e temperaturas de reação, assim como menores relações enzima:substrato e proteína:carvão ativado. Desta forma, sugere-se que seja realizado o estudo das condições de reação, aqui testadas, visando sua aplicação em escala piloto e, posteriormente, em escala laboratorial, a fim de viabilizar a produção e comercialização de um produto que será de grande utilidade para pacientes fenilcetonúricos.

Dando continuidade ao estudo de remoção de fenilalanina de leite, novas pesquisas podem, ainda, ser realizadas empregando-se outras proteases de diversas origens (animal, vegetal ou microbiana), utilizadas isoladamente ou em associação. Além disso, diferentes condições hidrolíticas, como relação enzima:substrato, tempo e temperatura de reação, podem, igualmente, ser estudadas com o objetivo de aumentar a remoção de Phe e diminuir os custos do processo.

Embora neste trabalho tenha sido observado o efeito benéfico da utilização de menores quantidades de carvão ativado (CA), este meio adsorvente ainda é empregado em grandes quantidades, o que afeta, significativamente, o custo do processo de remoção. Sendo assim, seria de grande interesse, a realização de um estudo sobre a recuperação e reutilização do CA. Além disso, outros meios adsorventes podem ser testados para a remoção de Phe, visando a redução dos custos do processo.

A hidrólise das proteínas promove a quebra das ligações peptídicas, liberando peptídeos e aminoácidos livres, que são importantes do ponto de vista nutricional. Desta forma, seria importante a análise do perfil péptico do leite hidrolisado, empregando-se os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) e da área corrigida da fração (ACF), desenvolvidos por SILVESTRE et al (1994), para se avaliar a qualidade nutricional do produto.

Durante a remoção de Phe pelo CA, outros aminoácidos aromáticos, como 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 do leite hidrolisado, após a passagem pela coluna de CA, para verificar possíveis perdas de outros aminoácidos, assim como para avaliar, com mais detalhe, o valor nutricional dessas preparações.