

Efeito da remoção de fenilalanina sobre o perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo

Phenylalanine removal effect on the peptide profile of hydrolyzed protein from wheat flour

RIALA6/1302

Raquel Linhares CARREIRA¹, Viviane Dias Medeiros SILVA¹, Mauro Ramalho SILVA¹, Harriman Aley MORAIS², Marialice Pinto Coelho SILVESTRE^{3*}

¹Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG/Brasil

²Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG/Brasil

Endereço para correspondência: ^{3*} Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, sala 4132 - Bloco 4. Endereço: Av. Pres. Antonio Carlos, 6627. CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG/Brasil. E-mail: malice@farmacia.ufmg.br

Recebido: 19.01.2010 – Aceito para publicação: 21.06.2010

RESUMO

Para avaliar o efeito da remoção de fenilalanina no perfil peptídico dos hidrolisados proteicos de farinha de trigo, foram preparados nove hidrolisados empregando-se a associação sucessiva de pancreatina e de extrato enzimático bruto obtido da casca de abacaxi (EB). Foram testados o efeito da ordem de adição das enzimas, da temperatura de reação, da relação enzima: substrato (E:S) e do tratamento físico da amostra. A análise do perfil peptídico dos hidrolisados foi realizada em duas etapas: antes e após a remoção da fenilalanina. A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular foi utilizada para efetuar o fracionamento e a quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pela técnica da Área Corrigida da Fração. O processo de remoção de fenilalanina melhorou o perfil peptídico de três hidrolisados, mas não afetou no de cinco hidrolisados. O efeito benéfico desse processo está associado ao aumento no teor de di- e tripeptídeos ou à redução na quantidade de peptídeos grandes. O melhor perfil peptídico foi obtido após a remoção de fenilalanina, utilizando-se pancreatina E:S de 4:100 a 50°C, durante 210 min, seguida de EB E:S de 10:100 a 70°C durante 90 min.

Palavras-chave. farinha de trigo, hidrolisados proteicos, remoção de fenilalanina, perfil peptídico.

ABSTRACT

The effect of phenylalanine removal on the peptide profile of the protein hydrolysates from wheat flour was investigated. Nine hydrolysates were prepared, using a successive association of a pancreatin and a crude enzymatic extract obtained from pineapple peel (CE), and the effect of the order of enzymes addition, the reaction temperature, the enzyme: substrate (E:S) ratio, and the physical treatment of sample were examined. The analysis of peptide profile of hydrolysates was performed in two stages, that is before and after removing phenylalanine. The size-exclusion high performance liquid chromatography was used for performing the fractionation, followed by Correct Fraction Area technique for quantifying peptides and free amino acids. The process of phenylalanine removal improved the peptide profile of three hydrolyzed samples, but it did not affect the five hydrolysates. The beneficial effect of this process is correlated with the increase of di- and tripeptides contents, or in reducing the amount of large peptides. The best peptide profile was obtained after phenylalanine removal by using pancreatin at E:S ratio of 4:100 at 50°C for 210min, followed by CE at E:S ratio of 10:100 at 70°C for 90 min.

Key words. wheat flour, hydrolysates, phenylalanine removal, peptide profile.

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 essencialmente dietético e, no Brasil, utilizam-se fórmulas importadas e de alto custo, constituídas de misturas de aminoácidos livres, isentas de Phe, resultando em uma dieta monótona e pouco palatável¹⁻⁵. A ingestão de alimentos de alto valor proteico e com teor de Phe de aproximadamente 5 % é controlada na dieta dos fenilcetonúricos, sendo que os cereais, dentre eles o trigo, fazem parte deste grupo de alimentos, cuja ingestão deve ser controlada. Portanto, a inclusão da farinha de trigo na alimentação destes pacientes, sem restrição, deve passar, necessariamente, por uma etapa de remoção de Phe. Assim, vários métodos foram estudados visando à remoção desse aminoácido de hidrolisados proteicos¹, podendo-se citar a adsorção em carvão ativado (CA) ou resinas de adsorção, cromatografia de troca iônica, peneira molecular ou filtração em gel. A escolha do método deve considerar a praticidade, reprodutibilidade e a relação custo/eficiência de cada tratamento⁶. O laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG tem realizado estudos para avaliar a eficiência do CA na remoção de Phe de leite em pó desnatado^{7,8}, soro de leite^{9,10}, fubá de milho¹¹, arroz¹², feijão¹³ e farinha de arroz¹⁴.

Esta etapa de remoção de Phe deve ser precedida da extração proteica e do tratamento enzimático, originando os hidrolisados proteicos. Entretanto, as proteases comerciais são, em sua maioria, importadas e de custo elevado. Assim, com o objetivo de reduzir os custos operacionais, foi testada, neste trabalho, a associação de uma enzima comercial com um extrato enzimático bruto, obtido de um resíduo agroindustrial (casca de abacaxi), preparado no laboratório.

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado proteico para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, sendo utilizados mais efetivamente pelo organismo aqueles contendo um elevado teor de oligopeptídios, especialmente di- e tripeptídeos, do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta. Desta forma, a introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar uma melhor utilização das proteínas^{15,16}.

Visando caracterizar o perfil peptídico de hidrolisados proteicos, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas, como por exemplo, eletroforese em gel de poli(acrilamida

dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)¹⁷, cromatografia de exclusão molecular (SEC), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa¹⁸, HPLC capilar¹⁹, HPLC de fase reversa²⁰, HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm)²¹ e coluna Superose -12HR 10/30^{22,23}. O método desenvolvido por Silvestre et al²⁴ foi empregado na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes proteicas por este mesmo grupo de pesquisa^{9,12,25-30}. Dessa forma, este método, que permite fracionar e quantificar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, foi aplicado, de forma análoga no presente trabalho, utilizando-se a mesma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxi-etil-aspartamida)-sílica (PHEA).

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da remoção de fenilalanina sobre o perfil peptídico de hidrolisados proteicos de farinha de trigo, estudando-se a influência do tratamento físico da amostra, assim como do emprego da associação sucessiva de uma pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi (EB), preparado no laboratório. Além disso, foi estudada a ação de diversos parâmetros hidrolíticos, tais como a ordem de adição das enzimas, a relação E:S e a temperatura de reação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A farinha de trigo tipo I foi adquirida no comércio de Belo Horizonte, MG. A protease Protemax[®] 580 L (EC 3.4.21.14), uma serino-endopeptidase de origem bacteriana (cepa do *Bacillus licheniformis*, atividade 580 KDU/g, estável em pH entre 7 e 10, com pH ótimo em 9,5, temperatura ótima de 60°C e temperatura de inativação acima de 85°C por 10 min) foi adquirida da Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). A pancreatina (Corolase[®] PP) (complexo enzimático obtido do pâncreas – EC 3.4.21.4, constituído pelas serino-endopeptidases tripsina e quimotripsina e pelas metalo-exopeptidases carboxipeptidases A e B, atividade 200.000 LVE/g, pH ótimo de 9 e temperatura ótima de 50°C), foi adquirida da AB Enzymes Brasil Comercial Ltda (Barueri, SP, Brasil). Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O carvão ativado (granulado n° 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh) foi adquirido da Carbomafrá S.A. (Curitiba, PR, Brasil). O extrato enzimático bruto da casca do abacaxi (*Ananás comosus*) variedade Pérola, foi preparado no laboratório. Utilizou-se o Liofilizador

Freezone, (modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA), o compressor (Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), o cutter (Sire, modelo Super Cutter, São Paulo, Brasil), ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) e o agitador magnético (Fisatom, modelo 752 A, São Paulo, SP, Brasil). O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados proteicos foi constituído por uma coluna cromatográfica poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA) 250 x 9,4 mm, 5 mm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

Métodos

Preparo dos hidrolisados proteicos da farinha de trigo

Inicialmente, a enzima de *Bacillus licheniformis* foi empregada para extrair as proteínas da farinha de trigo, de acordo com o método desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho¹¹. O extrato proteico obtido foi submetido à hidrólise enzimática, testando-se a associação sucessiva da pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi - EB, variando-se os parâmetros: ordem de adição das enzimas (pancreatina + EB e EB + pancreatina); temperatura (35, 40, 50 e 70°C) e relação enzima:substrato (E:S) (2:100, 3:100 e 4:100) para a pancreatina. Dessa forma, foram obtidos 9 hidrolisados proteicos, que estão apresentados na Tabela 1. O tempo total de reação, para todas as amostras, foi de 5h, sendo testado o efeito do tratamento físico em apenas um dos casos estudados.

Tabela 1. Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados proteicos da farinha de trigo

H	Protease	E:S	Parâmetros Hidrolíticos			
			T (°C)	Tempo (h)	pH	Te
H1	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70/50	90 min/210 min	8/7	Ausente
H2	Pancreatina + EB	4:100 + 10:100	50/70	90 min/210 min	7/8	Ausente
H3	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	35	90 min/210 min	7	Ausente
H4	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	40	90 min/210 min	7	Ausente
H5	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	50	90 min/210 min	7	Ausente
H6	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70	90 min/210 min	7	Ausente
H7	EB + pancreatina	10:100 + 2:100	50	90 min/210 min	7	Ausente
H8	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	90 min/210 min	7	Ausente
H9	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	90 min/210 min	7	Ultraturrax

H = hidrolisado; EB: extrato enzimático bruto da casca de abacaxi; E:S: relação enzima:substrato; T = temperatura; Te: tratamento físico do extrato

Remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos

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 trabalho⁸. O CA foi hidratado com água destilada por 10 min sob agitação

constante e, em seguida, colocado em seringa descartável de 10 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. A coluna de carvão ativado foi montada colocando-se embaixo o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por último o de maior granulometria. Em sequência, os hidrolisados foram passados pela coluna em

quantidade suficiente para atingir a relação proteína:CA 1:88,5 e submetidos à pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), tendo sido recolhidos os eluatos.

Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados proteicos

Para caracterizar o perfil peptídico dos hidrolisados, antes e após a remoção de fenilalanina, empregou-se o fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e a sua posterior quantificação. Este primeiro procedimento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por Silvestre et al²⁴. Sucintamente, as amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1 g % (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min. O volume injetado foi de 20 mL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45 mm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e degaseificada imediatamente antes do uso. Posteriormente, a quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres presentes nas frações cromatográficas foi realizada empregando-se o método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre et al²⁵. O cálculo da ACF foi realizado após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Finalmente, traçou-se, uma curva padrão,

relacionando a ACF com os teores de aminoácidos das frações cromatográficas.

Análise Estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados proteicos, foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$)³¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos hidrolisados proteicos

Perfil peptídico

No intuito de exemplificar o perfil cromatográfico obtido dos hidrolisados proteicos, antes e após a remoção de Phe, apresenta-se, na Figura 1, o hidrolisado H1 a 230 nm. As amostras foram separadas em 4 frações, de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres). A análise deste perfil obtido permite concluir que a técnica de SE-HPLC, empregada neste estudo mostrou-se eficiente para fracionar os hidrolisados proteicos com massas moleculares inferiores a 1000 Da. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores realizados neste mesmo laboratório, utilizando esta metodologia, para caracterizar os hidrolisados de diferentes fontes proteicas, tais como o soro de leite^{9,10,30}, a caseína^{26,27,29,32}, o leite^{8,28} e o arroz¹².

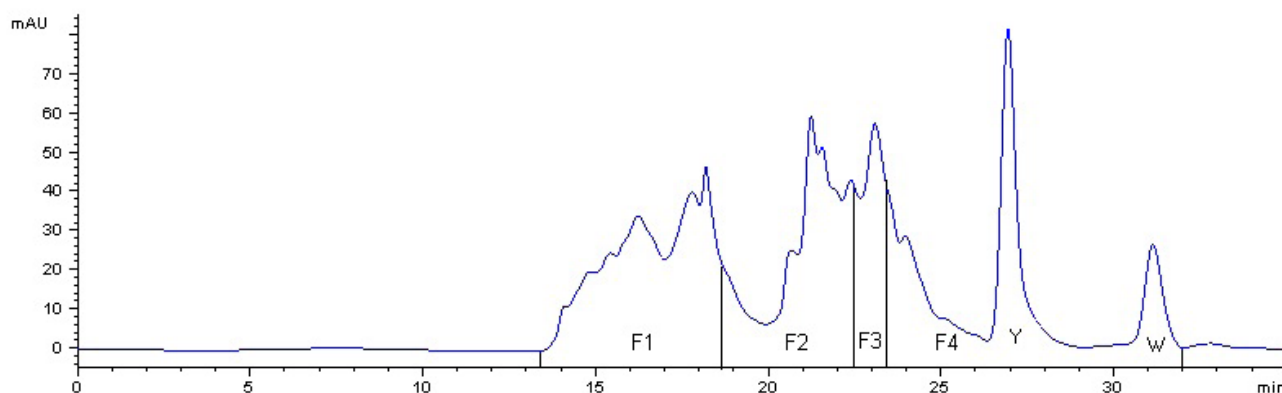


Figura 1. Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado H1: EB (10:100, 70 °C, 90 min, pH 8,0) + pancreatina (4:100, 70 °C, 210 min, pH 7,0)

Ao contrário da técnica aqui utilizada, a maioria dos métodos relatados na literatura, visando o fracionamento de hidrolisados proteicos, apresenta uma série de inconvenientes. Assim, Lemieux et al²¹, empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes. De acordo com Nogueira et al²⁰, na HPLC de fase reversa há sobreposição de peptídeos e impureza nos picos. Além disso, também pode ocorrer sobrecarga de peptídeos básicos tanto na HPLC de fase reversa quanto na HPLC capilar³³. Golovchenko et al²² e Visser et al²³, também utilizando SE-HPLC, porém com uma coluna Superose -12HR 10/30, verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. Por outro lado, o emprego da eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) por Schimidt e Poll³⁴, para estimar a distribuição por pesos moleculares de peptídeos, também não foi adequada, pois esta técnica não permite a identificação dos oligopeptídeos que são arrastados no momento da coloração e lavagem do gel. Dessa forma, a técnica empregada neste trabalho, desenvolvida por Silvestre et al²⁴, possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, apresentando resultados contrários aos encontrados na literatura.

A SE-HPLC também tem sido usada na caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo, apesar de não ter promovido a separação dos di- e tripeptídeos dos hidrolisados maiores, de acordo com o relatado por Wesley et al³⁵, Wang et al³⁶ e Kong et al³⁷. Assim, Kong et al³⁷, empregaram a SE-HPLC com a coluna Sephadex G-15, para avaliarem a distribuição da massa molecular dos peptídeos obtidos da hidrólise do glúten do trigo, sob ação das enzimas proteolíticas alcalase (*Bacillus licheniformis*) e Neutrase (*Bacillus amyloliquefaciens*), e observaram apenas que os peptídeos apresentavam massa molecular inferior a 1355 Da, não sendo avaliados em separado, o conteúdo de di- e tripeptídeos.

De maneira análoga, Wang et al³⁶ caracterizaram o perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo sob a ação de uma papaína, separando os peptídeos obtidos nas seguintes frações: maiores que 15000 Da, entre 15000-10000 Da, entre 5000-10000 Da e menores que 5000 Da. Para tal, empregou o método analítico SE-HPLC com a coluna BioSepSec-4000.

Akiyama et al³⁸, empregando a coluna Superdex™ Peptide HR, com o intuito de separar as frações dos

hidrolisados ácido e enzimático de farinha de trigo, relataram que apenas a faixa de massa molecular foi evidenciada, sendo que no hidrolisado preparado sob a ação de protease, predominaram os peptídeos com massa molecular superior a 1050 000 Da, enquanto que os peptídeos obtidos no hidrolisado ácido, ficaram na faixa de 500-1050 000 Da. Utilizando a coluna Biosep-SEC-S-4000 e a SE-HPLC, Manu e Rao³⁹ fracionaram os extratos proteicos obtidos a partir de diferentes cultivares de farinha de trigo, obtendo-se as frações F1 (>130000 Da), F2 (80000 – 130000 Da), F3 (10000-80000 Da) e F4 (< 5000 Da), sendo estes valores superiores aos determinados no presente estudo. De forma semelhante, Kammoun et al⁴⁰, utilizaram a SE-HPLC e a coluna Shodex KW 802.5 para caracterizar o perfil peptídico do hidrolisado de farinha de trigo, obtido pela ação da enzima Neutrase (endoprotease de *Bacillus subtilis*), obtendo-se também 4 frações: Fração1 (0-1 000 Da), Fração 2 (1000-2000 Da), Fração 3 (2000-3000 Da) e Fração 4 (> 3000 Da), estando apenas a Fração 1 dentro da faixa de massa molecular de principal interesse do presente trabalho.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que compararam o perfil peptídico de hidrolisados proteicos de farinha de trigo ou de outros cereais, antes e após a remoção de Phe.

Teores de peptídeos e de aminoácidos livres

Os resultados obtidos para os teores de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados proteicos de farinha de trigo estão expostos na Tabela 2, na qual os valores estão apresentados em termos de porcentagem de peptídeos presentes nas frações F1, F2, F3 e F4. Pode-se observar que houve variação entre os perfis cromatográficos das amostras analisadas, sendo que muitos hidrolisados apresentaram teores peptídicos significativamente diferentes. Entretanto, os elevados teores de di-e tripeptídeos e aminoácidos livres obtidos e, ainda, quantidades moderadas de grandes peptídeos, confirmam o elevado valor nutricional de todos os hidrolisados estudados, uma vez que, em outros trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, testando-se várias fontes proteicas e diferentes condições hidrolíticas, ficou evidenciada a dificuldade de se obter teores de di-e tripeptídeos acima de 10%, de aminoácidos livres acima de 30% e de grandes peptídeos abaixo de 25%^{8-10,12,26-30,32}. Apenas o processo da ultrafiltração, realizado por Lopes et al⁹ foi capaz de melhorar o perfil peptídico dos hidrolisados analisados, pois promoveu a retirada de peptídeos com massa molecular superior a 10000 Da.

Tabela 2. Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados proteicos

H	F1		F2		F3		F4	
	AR	DR	AR	DR	AR	DR	AR	DR
H1	15,42 ^{h/3}	20,47 ^{b,c,d,e/3}	32,96 ^{a/2}	28,43 ^{b,c,d,e/2}	12,03 ^{e/3}	14,97 ^{b,c,d,e/4}	39,58 ^{a,b,c/1}	36,75 ^{b,c,d/1}
H2	13,09 ^{i/4}	12 ^{i/4}	27,23 ^{c,d,e/2}	28,43 ^{b,c,d,e/2}	16,98 ^{b/3}	23,58 ^{a/3}	42,70 ^{a/1}	36,00 ^{b,c,d/1}
H3	22,61 ^{a,b/3}	19,18 ^{c,d,e/3}	30,68 ^{a,b,c/2}	30,26 ^{a,b,c,d/2}	13,55 ^{c,d,e/4}	15,50 ^{b,c,d/4}	34,15 ^{c,d/1}	35,06 ^{c,d/1}
H4	17,89 ^{e,f,g/3}	16,64 ^{f,g,h/3}	31,24 ^{a,b/2}	32,69 ^{a/1}	15,16 ^{b,c,d/3}	22,28 ^{a/2}	35,71 ^{c,d/1}	28,40 ^{e/1}
H5	15,85 ^{g,h/3}	17,98 ^{e,f,g/3}	29,95 ^{a,b,c,d,e/2}	29,18 ^{a,b,c,d,e/2}	15,52 ^{b,c,d/3}	15,24 ^{b,c,d/3}	38,68 ^{a,b,c/1}	37,60 ^{a,b,c,d/1}
H6	20,08 ^{c,d,e/2}	20,92 ^{a,b,c,d/3}	32,72 ^{a/1}	27,02 ^{c,d,e/1}	14,64 ^{b,c,d,e/3}	14,34 ^{b,c,d,e/4}	32,56 ^{d,e/1}	34,39 ^{c,d/2}
H7	23,06 ^{a/3}	23,13 ^{a/2}	29,21 ^{a,b,c,d,e/2}	26,18 ^{e/2}	12,85 ^{d,e/4}	14,56 ^{b,c,d,e/3}	34,89 ^{c,d/1}	36,14 ^{b,c,d/1}
H8	18,39 ^{d,e,i/3}	19,38 ^{c,d,e/3}	29,18 ^{a,b,c,d,e/2}	27,38 ^{b,c,d,e/2}	13,80 ^{c,d,e/4}	13,81 ^{c,d,e/4}	38,62 ^{a,b,c/1}	39,43 ^{a,b,c/1}
H9	18,47 ^{d,e,i/3}	17,56 ^{e,f,g/3}	30,37 ^{a,b,c,d/2}	28,49 ^{b,c,d,e/2}	15,95 ^{b,c/3}	17,15 ^{b,c/3}	35,22 ^{c,d/1}	36,40 ^{b,c,d/1}

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna). AR: antes da remoção; DR: depois da remoção. F1: maior que 7 resíduos de aminoácidos; F2: entre 4 e 7 resíduos; F3: di- e tripeptídeos e F4: aminoácidos livres

Entretanto, a escolha do hidrolisado com perfil peptídico mais favorável, nutricionalmente, deve ser complementada, baseando-se em estudos realizados por outros autores. Assim, segundo Frenhani e Burini⁴¹, durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di- e tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores, os di- e tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di- e tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di- e tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior.

Conclui-se que o melhor perfil peptídico foi obtido para o hidrolisado H2, após ter sido submetido ao processo de remoção de Phe, apresentando um dos maiores teores de di- e tripeptídeos (23,58%) e de aminoácidos livres (36%) e o menor de grandes peptídeos (12%). Por outro lado, os perfis peptídicos mais desfavoráveis foram obtidos para os hidrolisados H6 e H7, antes e após a remoção de

Phe, uma vez que estes dois hidrolisados apresentaram os menores valores para os di- e tripeptídeos (14,49% e 13,7%, em média, respectivamente), e os maiores conteúdos de grandes peptídeos (20,5% e 23,1%, em média, respectivamente).

Efeito da remoção de Phe sobre o perfil peptídico

Pode-se observar na Tabela 2 que o processo de remoção de Phe interferiu no perfil peptídico de 4 hidrolisados (H1, H2, H3 e H4), o que representa, aproximadamente, 44% das amostras estudadas. Por outro lado, para os hidrolisados H5, H6, H7, H8 e H9, não foram observadas diferenças significativas entre os teores dos peptídeos constituintes das frações cromatográficas dos hidrolisados de farinha de trigo, antes e após a remoção de Phe. Ressalta-se que estes hidrolisados foram obtidos empregando-se as mesmas condições hidrolíticas, referentes à ordem de ação enzimática (EB + pancreatina), tempo de hidrólise (90 min+210 min), e pH (7,0).

A remoção de Phe foi favorável para os hidrolisados H2, H3 e H4, sendo que, no caso dos hidrolisados H2 e H4, o efeito benéfico foi observado, essencialmente, no que diz respeito ao aumento acentuado dos teores de di- e tripeptídeos, que passaram de 16,98% para 23,58% e

de 15,16% para 22,28%, respectivamente. Este resultado está associado à queda nos teores de aminoácidos livres destes hidrolisados, que, por sua vez, poderia ser explicada pela maior facilidade de adsorção da Phe pelo carvão ativado quando presente na forma livre. No preparo dos hidrolisados H2 e H4, apenas a relação enzima:substrato (E:S) empregada foi a mesma; as demais condições hidrolíticas, tais como ordem de ação das enzimas, temperatura e pH foram diferentes.

Quanto ao hidrolisado H3, a melhora do perfil peptídico pela remoção de Phe foi menos pronunciada do que a dos 2 hidrolisados citados acima, relacionando-se apenas a uma pequena redução nos teores de grandes peptídeos (de 22,61% para 19,18%), a qual poderia estar associada a uma maior presença de Phe na fração F1, provavelmente situada na porção -C- ou -N- terminal dos peptídeos.

Dentre todos os hidrolisados analisados, apenas para o H1 a remoção de Phe não favoreceu a obtenção de um perfil peptídico adequado. Além de não terem sido observadas diferenças significativas entre os teores de di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, o emprego do CA promoveu uma elevação no conteúdo de grandes peptídeos, passando de 15,42% para 20,47%.

Não foram encontrados na literatura relatos comparando o perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo ou de outros cereais, antes e após a remoção de fenilalanina.

CONCLUSÃO

O processo de remoção de fenilalanina aqui empregado interferiu na distribuição de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados proteicos, tendo sido prejudicial apenas, em 1 dos 9 casos estudados. Por meio deste processo, foi possível obter um perfil peptídico adequado, representado, especialmente, por um alto teor de di- e tripeptídeos, em torno de 24%.

REFERÊNCIAS

1. Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev Saúde Públ*. 2000; 34(1):86-96.
2. Malloy-Diniz LF, Cardoso-Martins C, Carneiro KC, Cerqueira MMM, Ferreira APA, Aguiar MJB et al. Funções executivas em crianças fenilcetonúricas. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004; 62(2-B):473-9.
3. Hamman K, Clark H, Montini E, Al-Dhalimy M, Grompe M, Finegold M et al. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol Therapy*. 2005; 12(2):337-44.
4. Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev Nutr*. 2006; 19(3):381-7.
5. Wasserstein MP, Snyderman SE, Sansaricq C, Buchsbaum MS. Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria. *Mol Genet Metabol*. 2006; 87(3):272-7.
6. Outinen MT, Tossavainen O, Harju M, Linko P, inventors. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. US Patents 5,547,687. 1996 Aug 20.
7. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr Food Sci*. 2006; 36(2):96-104.
8. Soares RDL, Biasutti EAR, Capobiango M, Vieira CR, Silva VDM, Januário JN et al. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm Bon*. 2006; 25(3):325-32.
9. Lopes DCF, Delvivo FM, Januário JN, Aguiar MJB, Starling ALP, Silvestre MPC. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J Food Technol*. 2007; 5(2):191-7.
10. Silva VDM, De Marco LM, Afonso WO, Lopes DCF, Januário JN, Aguiar MJB et al. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am J Food Technol*. 2007; 2:327-41.
11. Capobiango M, Lopes DCF, Carreira RL, Afonso WO, Segall SD, Silvestre MPC. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int J Food Eng*. 2007; 3:1-19.
12. Lopes DCF, Bizzotto CS, Silva VDM, Afonso WO, Lopes Jr CO, Silvestre MPC. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J Food Technol*. 2008; 6:57-65.
13. Lopes Jr CO. Extração protéica e obtenção de hidrolisados proteicos de feijão com baixo teor de fenilalanina [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte, Minas Gerais: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. 81pp.
14. Silvestre MPC, Vieira CR, Silva MR, Silva MC, Lopes Jr CO, Silva VDM. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolyzing rice proteins aiming at phenylalanine removal. *Int J Food Eng*. 2009; 5(1):1-11.
15. Ganapathy V, Gupta N, Martindale RG. Protein digestion and absorption. In: Johnson LR (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Fourth Edition, Academic Press, 2006. Chapter 65, pp.1667-92.
16. Boza JJ, Moënnos D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Ballèvre O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr*. 2000; 39:237-43.
17. Chicón R, Belloque J, Alonso E, López-Fandiño R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocoll*. 2009; 23:593-9.
18. Li-Jun L, Chuan-He Z, Zheng Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod Proc*. 2008; 86(1):1-6.

19. Ito S, Yoshioka S, Ogata I, Yamashita E, Nagai S, Okumoto T et al. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J Chromatogr A*. 2005; 1090:178-83.
20. Nogueira R, Lämmerhofer M, Lindner W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J Chromatogr A*. 2005; 1089:158-69.
21. Lemieux L, Piot JM, Guillochon D, Amiot J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J Chromatogr*. 1991; 32:499-504.
22. Golovchenko N, Kataeva IA, Akimenko VK. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J Chromatogr*. 1992; 591(4):121-8.
23. Visser S, Slangen CJ, Robben AJPM. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J Chromatogr*. 1992; 599:205-9.
24. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide) - silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J Agric Food Chem*. 1994; 42:2778-82.
25. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J Agric Food Chem*. 1994; 42:2783-89.
26. Morato AF, Carreira RL, Junqueira RG, Silvestre MPC. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J Food Comp Anal*. 2000; 13(5):843-57.
27. Carreira RL, De Marco LM, Dias DR, Morais HA, Ornellas CBD, Silvestre MPC. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm Bon*. 2004; 23(1):17-25.
28. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Braz Food J*. 2005; 107(1):42-53.
29. Morais HA, De Marco LM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim*. 2005; 34(1):59-69.
30. Biasutti EAR, Lopes DCF, Souza MWS, Campos RBD, Segall SD, Silvestre MPC. Obtenção de hidrolisados do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos utilizando-se subtilisina. *Braz J Food Technol*. 2007; 10(4):225-32.
31. Pimentel-Gomes F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba (SP): Nobel; 2000.
32. Barbosa CMS, Morais HA, Delvivo FM, Mansur HS, Oliveira MC, Silvestre MPC. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J Sci Food Agric*. 2004; 84(4):1891-900.
33. Mccalley DV. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004; 1038:77-84.
34. Schmidt DG, Poll JK. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of a-lactoalbumin and b-lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth Milk Dairy J*. 1991; 45(4):225-40.
35. Wesley IJ, Larroque O, Osborne BG, Azudin N, Allen H, Skerritt JH. Measurement of gliadin and glutenin content of flour by NIR spectroscopy. *J Cereal Sci*. 2001; 34:125-33.
36. Wang J, Zhao M, Jiang Y. Effects of Wheat Gluten Hydrolysate and Its Ultrafiltration Fractions on Dough Properties and Bread Quality. *Food Technol Biotechnol*. 2007; 45:410-14.
37. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem*. 2007; 102: 759-63.
38. Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R et al. Profile Analysis and Immunoglobulin e Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006; 140: 36-42.
39. Manu BT, Rao UJSP. Influence of size distribution of proteins, thiol and disulfide content in whole wheat flour on rheological and chapati texture of Indian wheat varieties. *Food Chem*. 2008; 10: 88-95.
40. Kammoun R, Bejar S, Ellouz R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutras. *Bior. Technol*. 2003; 90: 249-54.
41. Frenhani PB, Burini RB. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol*. 1999; 36: 227-37.