

Doi: 10.5212/Publ.Exatas.v.15i2.097106

OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE FEIJÃO COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA

OBTAINING PROTEIN HYDROLYSATE BEANS WITH LOW PHENYLALANINE CONTENT

Carlos de Oliveira Lopes Jr.¹, Mauro Ramalho Silva¹, Mariana Wanessa Santana de Souza¹, Ana Lúcia Pimenta Starling², Marcos José Burle de Aguiar², José Nelio Januário², Marialice Pinto Coelho Silvestre¹

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

² Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico- NUPAD, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

O feijão ocupa um lugar relevante na alimentação dos brasileiros, mas sua utilização na dieta de fenilcetonúricos é proibida devido ao seu alto teor de fenilalanina (Phe), que ultrapassa o limite estabelecido pela legislação brasileira (0,1g/100g). Portanto, visando o preparo de feijão com baixo teor de fenilalanina, as proteínas foram extraídas e, posteriormente, hidrolisadas pela ação de diversas proteases. O carvão ativado (CA) foi empregado como meio adsorvente e o efeito de alguns parâmetros foi avaliado, tais como pH inicial, relação enzima:substrato, temperatura, tipo de protease e a relação proteína:CA. A eficiência da remoção de Phe foi avaliada por espectrofotometria derivada segunda (EDS), determinando-se o teor deste aminoácido livre no feijão e em seus hidrolisados, antes e após tratamento com CA. O melhor resultado foi obtido empregando-se a protease de *Papaya carica* na relação E:S de 10:100, sem ajuste de pH, e com temperatura de 50 °C e relação proteína: CA de 1:88, tendo atingido 88% de remoção de Phe e o teor final de 433,7 mg de Phe/100 g.

Palavras-chave: Fenilcetonúricos. Extração protéica. Hidrólise enzimática. Carvão ativado. Remoção.

ABSTRACT

Although beans occupy an important place in the diet of Brazilian people, its use by phenylketonurics is forbidden due to its high phenylalanine (Phe) content, which exceeds the limit allowed by the Brazilian legislation (0.1g/100g). This study aimed at the preparation of beans with low-phenylalanine (Phe) content to be introduced into the diet of patients with phenylketonuria. Initially, the proteins were extracted and then hydrolysed by the action of several proteases. Activated carbon (AC) was used as adsorbent and the effect of some parameters was evaluated, such as initial pH, enzyme: substrate ratio, temperature, type of

protease and protein: AC ratio. The efficiency of Phe removal was assessed by second derivative spectrophotometry (SDS), determining the content of free Phe in beans and in their hydrolysates, before and after treatment with AC. The best result was obtained using the protease of *Papaya carica* in a E:S ratio of 10:100, without adjustment of pH, and yet, with temperature of 50 °C and protein: AC ratio of 1:88, reaching 88% removal of Phe and final content of 433.7 mg Phe/100 g.

Keywords: phenylketonurics, protein extraction, enzymatic hydrolysis, activated carbon, removal.

1. Introdução

As leguminosas são fontes proteicas para a população de países em desenvolvimento, sendo o feijão (20–25% de proteína) a mais importante e mundialmente utilizada na alimentação humana. (SANGRONIS et al., 2006).

A fenilcetonúria é um dos mais comuns erros inatos do metabolismo causado pela deficiência parcial ou total da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Esta enzima, ativa no fígado, é responsável por catalisar a oxidação do aminoácido fenilalanina (Phe) à 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 consequentemente retardo mental. (RAMASWAMI; SMITH, 1997; HENDRIKSZ; WALTER, 2004; MONTEIRO; CÂNDIDO, 2006; GIOVANNINI et al., 2007).

O tratamento da fenilcetonúria, que deve ser iniciado até o 20º dia de vida, preconiza um rigoroso controle da ingestão proteica, de forma a manter os níveis de fenilalanina dentro de limites que previnam o dano cerebral. (SMITH et al., 1990; 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.

Em atenção ao fato que o feijão é uma boa fonte de proteínas (cerca de 23%) e ocupa um lugar relevante na alimentação dos brasileiros, seria de grande importância obter um feijão contendo teor reduzido de fenilalanina, para que pudesse ser incorporado, sem restrições, na dieta de fenilcetonúricos, atendendo assim à legislação brasileira, que estabelece um limite máximo de 100 mg Phe/100g de produto. (BRASIL, 2002).

A primeira etapa no desenvolvimento deste feijão envolve a extração proteica, que é feita enzimaticamente. Em seguida, as proteínas extraídas são hidrolisadas, empregando-se diferentes enzimas proteolíticas e condições de reação, para promover a exposição da Phe, permitindo sua posterior remoção por um meio adsorvente, como carvão ativado, resinas ou filtração em gel. (CAPOBIANGO et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo hidrolisar as proteínas extraídas do feijão, empregando-se condições de hidrólise variadas, e otimizar a remoção de Phe destes hidrolisados proteicos, utilizando o carvão ativado como meio adsorvente.

2. Materiais e métodos

2.1 Material

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) foi adquirido no comércio de Belo Horizonte, MG, Brasil. Foram utilizados três pacotes de 1 kg do mesmo lote do feijão carioca tipo 1 (PINK, Belo Horizonte, MG, Brasil). As proteases: Protemax® 580 L, proveniente do *Bacillus lichenformis*, e a Protemax® N200, de origem de *Bacillus subtilis*, foram gentilmente cedidas pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). As proteases: Corolase® LAP, proveniente de *Aspergillus sojae*, Corolase® 7089, proveniente de *Bacillus subtilis*, Corolase® L10, proveniente de *Papaya carica* e a Corolase® TS, de origem de *Bacillus stearothermophilus*, foram gentilmente doadas pela AB Enzymes Brasil Comércio Ltda (Barueri, SP, Brasil). O carvão ativado, 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 Extração das proteínas

O feijão moído foi suspenso em água destilada na proporção de 1:10 (p/v). Após o ajuste do pH da suspensão para 10,5, utilizando uma solução de NaOH a 3 mol/L, foi aquecido em banho de vaselina líquida a 50 °C, sobre agitador magnético, com agitação constante. Estabilizada a temperatura da suspensão, foi adicionada a enzima Protemax® 580 L (*Bacillus licheniformis*) na relação enzima:substrato (E:S) de 10:100, e a extração enzimática foi realizada por três horas. A suspensão foi então resfriada até 25 °C e centrifugada por 15 minutos a 10.640 x g. O extrato proteico de feijão e o resíduo foram recolhidos separadamente. O resíduo foi lavado duas vezes com

água destilada, repetindo-se a etapa de centrifugação entre as lavagens e recolhendo sempre o extrato proteico no mesmo recipiente. O resíduo foi pesado e submetido à determinação do teor de proteína. O extrato proteico e o resíduo foram acondicionados em recipientes hermeticamente fechados sob refrigeração, até o momento de análise.

2.2.2 Preparo dos hidrolisados proteicos isentos de fenilalanina

Foram preparados 15 hidrolisados enzimáticos, tendo sido variados os seguintes parâmetros: tipo de enzima, pH, relação enzima:substrato e temperatura (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados proteicos de feijão e na remoção de fenilalanina

Hidrolisados	Hidrólise enzimática				Remoção de Phe
	Fonte de protease	pH	E:S	Temperatura (°C)	Relação proteína:CA
H1	<i>B. licheniformis</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H2	<i>B. stearothermophilus</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H3	<i>B. subtilis (PROZYN)</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H4	<i>B. subtilis (AB ENZYMS)</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H5	<i>Aspergillus sojae</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H6	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:88
H7	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:44
H8	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	50	1:16
H9	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	4:100	25	1:88
H10	<i>Papaya carica</i>	8,0	4:100	50	1:88
H11	<i>Papaya carica</i>	9,0	4:100	50	1:88
H12	<i>Papaya carica</i>	11,0	4:100	50	1:88
H13	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	5:100	50	1:88
H14	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	7:100	50	1:88
H15	<i>Papaya carica</i>	Sem ajuste	10:100	50	1:88

E:S = Relação enzima substrato; CA = Carvão ativado; pH sem ajuste = 8,4

Inicialmente, 40 mL do extrato proteico de feijão foram colocados em erlenmeyer e o valor do pH foi medido (8,4). Em seguida, foi aquecido em banho de vaselina líquida, sob agitação constante, até se atingir a temperatura desejada (Tabela 1). Após a estabilização da temperatura, a enzima foi adicionada na quantidade suficiente para atingir a relação E:S desejada (Tabela 1). Ao final da reação, o processo foi interrompido por aquecimento em banho-maria a 80 °C por 20 minutos.

2.2.3 Remoção de fenilalanina dos hidrolisados

A Phe foi removida dos hidrolisados proteicos de feijão pela utilização do CA como meio adsorvente. Foi empregado o procedimento de passagem por coluna, descrito por Soares et al. (2006). Dois gramas de CA foram hidratados com água destilada por dez minutos sob agitação constante e, em seguida, colocados em seringa descartável de 10 mL, contendo filtro de náilon 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 na quantidade suficiente para se obter valores de relação proteína:carvão ativado de 1:16, 1:44 e 1:88 (Tabela 1). Posteriormente, sob pressão à coluna (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), os eluatos foram recolhidos.

2.2.4 Avaliação da eficiência da remoção de fenilalanina

A avaliação da eficiência de remoção de Phe pelo carvão ativado foi realizada pela medida do teor de Phe livre no feijão 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 horas) e, após ajuste do pH para 6,0, com solução de fosfato de sódio bibásico (1 mol/L), foram submetidas às leituras de absorbância na faixa de 250 a 280 nm. Foram traçados os espectros de derivada

segunda (Espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Hanslope, Inglaterra) e a área do terceiro pico negativo foi usada para calcular a quantidade de Phe presente nas amostras, empregando-se a curva padrão. O software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, EUA) foi utilizado para traçar os espectros da derivada segunda.

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

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

sendo,

A = Teor de Phe no feijão (g/100 g de feijão);

B = Teor de Phe no hidrolisado proteico, após tratamento com CA (g/100 g de hidrolisado);

C = Teor de proteína no feijão (g/100 g de feijão);

D = Teor de proteína no hidrolisado proteico (g/100 g de feijão).

2.3 Análise estatística

Todos os experimentos e análises foram feitos em triplicata. Para comparar a porcentagem de remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos em relação à variação dos parâmetros empregados na hidrólise enzimática das proteínas do feijão, foram utilizados 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 Eficiência da remoção de fenilalanina

Os resultados obtidos para a remoção de Phe dos diferentes hidrolisados proteicos de feijão estão expostos na Tabela 2, onde os valores estão apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e em teor final de Phe (mg Phe/100 g de hidrolisado), sendo esta última forma a mais apropriada para os cálculos de adequação das prescrições dietéticas de substitutos proteicos destinados a fenilcetonúricos, além de atender a regulamentação técnica que normaliza a rotulagem nutricional de alimentos. (ANVISA, 2003). O teor de Phe no feijão foi de 1.527,45 mg Phe/100 g de feijão (com 20,74% de proteína em base seca).

Como pode ser observado, o uso do carvão ativado mostrou-se eficaz na remoção de Phe dos hidrolisados proteicos de feijão obtidos pela ação de proteases de diferentes origens, tendo o percentual de remoção variado de 25,4% a 87,9%, e o teor final de Phe de 433,7 a 2.679,8 mg Phe/100g de hidrolisado. Assim sendo, o hidrolisado obtido com menor teor de Phe poderia ser utilizado, parcialmente, no desenvolvimento de um feijão modificado com baixo teor de Phe e, desta forma, ser inserido na dieta de fenilcetonúricos. Desta forma, ao se reconstituir o feijão utilizando este hidrolisado (H15), deve-se levar em consideração a composição química da matéria-prima, a fim de reproduzir o mais próximo possível suas características químicas e nutricionais. Levando-se em conta o teor máximo de Phe permitido pela legislação brasileira para pacientes fenilcetonúricos (0,1 g por 100 g de produto), sugere-se, para a reconstituição de 100 g de feijão, a utilização de 71 g de amido comercial isento de proteína que, deste modo, não fornecerá Phe, e a este poderiam ser incorporados 22,5 g do hidrolisado H15, contribuindo deste modo com um valor proteico de 10 g/100 g e teor de Phe de 97,46 mg/100g de produto. Para complementar os outros constituintes do feijão, poderia, ainda, ser feita a adição de lipídeos e minerais em quantidades próximas às reportadas por Antunes et al. (1995), cujos valores são iguais a 1,5 e 4,2, respectivamente.

Tabela 2- Percentual de remoção e teor final de fenilalanina dos hidrolisados proteicos de feijão

Hidrolisados	Remoção de Phe (%)	Teor final de Phe (mg de Phe/100g)
H1	77,9 ^{bcd}	795,3
H2	70,3 ^e	1067,3
H3	69,6 ^e	1092,8
H4	60,8 ^f	1409,4
H5	73,5 ^{de}	951,9
H6	81,5 ^b	665,5
H7	60,2 ^f	1429,2
H8	25,4 ^g	2679,8
H9	69,4 ^e	1099,3
H10	75,6 ^{cd}	878,3
H11	80,1 ^{bc}	716,6
H12	73,0 ^{de}	971,7
H13	82,7 ^b	623,5
H14	81,5 ^b	649,0
H15	87,9 ^a	433,7

Phe = Fenilalanina. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Deve-se ressaltar que a fenilalanina, por ser um aminoácido essencial, precisa ser obtida por meio da alimentação e, por isso, determinada quantidade deve estar presente no produto final para fenilcetonúricos, de forma a garantir a síntese proteica e o crescimento normal. Além disso, as condições operacionais necessárias para atingir cerca de 100% de remoção de Phe aumentariam demasiadamente os custos do processo. (SOARES et al., 2006).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que relatassem a remoção de fenilalanina de hidrolisados proteicos de feijão. No mesmo laboratório do presente trabalho, o CA já foi utilizado com eficiência para a remoção de Phe de outros alimentos, tais como de leite desnatado (93,6 a 99%) (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2006), soro de leite (75 a 99%) (DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007), arroz em grão (85 a 100%) (LOPES et al., 2008), fubá de milho (68,63 a 97,55%) (CAPOBIANGO et al., 2007) e farinha de arroz (25,7 a 94,1%) (VIEIRA et al., 2008). Na maioria destes estudos, foram utilizadas diferentes enzimas e condições hidrolíticas, além de ter sido empregado apenas um tipo de CA de menor granulometria (20 x 60 mesh), com exceção de Capobiango et al. (2007) e Vieira et al. (2008), que utilizaram os três tipos de carvão ativado deste trabalho. Apesar das variações nas condições utilizadas, os resultados aqui encontrados foram semelhantes aos citados acima.

Outros autores também relataram o emprego de CA para remoção de Phe da caseína. Assim, Lopez-Bajonero et al. (1991) removeram 92% de Phe de hidrolisados proteicos de caseinato de sódio, obtidos pela ação de uma protease do *Aspergillus oryzae* (Enzimas y Productos Químicos S.A.), seguida da papaína (Hervi S.A.). Empregando um sistema de três enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase, Sigma-Aldrich), Moszczyński e Idziak (1993) removeram 89,5% de Phe de hidrolisados de caseína.

3.2 Efeito de alguns parâmetros sobre a remoção de fenilalanina

Os parâmetros foram analisados levando-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação em larga escala. Deste modo, 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 está associada ao menor consumo de energia; o de uma menor quantidade de carvão ativado (maior relação proteína:CA) implica menores gastos, por ser o insumo de maior custo utilizado no processo.

3.3 Efeito do tipo de enzima

Para se avaliar o emprego de diferentes proteases, foram comparados os hidrolisados de H1 a H6. Na Figura 1 pode ser notado que o hidrolisado H6, obtido pela ação da protease de *Papaya carica*, apresentou o maior percentual de remoção de Phe (81,5%) e, portanto, o menor teor de Phe final (665,5 mg Phe/100 g de hidrolisado).

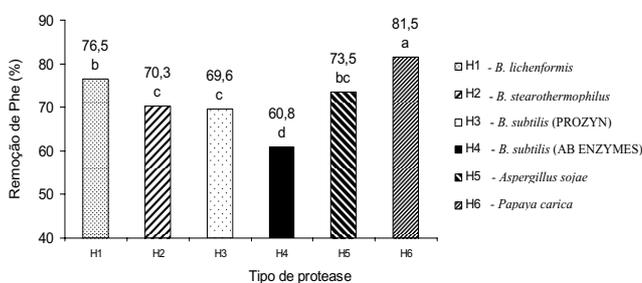


Figura 1 - Efeito do tipo de enzima sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos de feijão. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Este melhor desempenho da papaína poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de as condições de pH e temperatura empregadas no preparo dos hidrolisados proteicos (pH 8,4 e 50 °C) estarem dentro das faixas de pH (3 – 9) e temperatura (50 – 70 °C) ótimas da enzima, ao contrário do que aconteceu em relação às demais enzimas para as quais o pH e a temperatura utilizados não correspondem aos seus valores ótimos, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de pH e temperatura para as diferentes enzimas

Hidrolisados	Enzimas	pH		Temperatura (°C)	
		Utilizado	Ótimo*	Utilizada	Ótima*
H1	<i>B. licheniformis</i>	8,4	9,5	50	60
H2	<i>B. stearothermophilus</i>	8,4	8,0	50	80
H3	<i>B. subtilis</i> (PROZYN)	8,4	7,0 a 7,5	50	55
H4	<i>B. subtilis</i> (AB ENZYMES)	8,4	7,0	50	55
H5	<i>Aspergillus sojae</i>	8,4	9,0	50	70
H6	<i>Papaya carica</i>	8,4	3,0 a 9,0	50	50 a 70

*Valores fornecidos pela PROZYN (2005) e AB ENZYMES (2001, 2002, 2003).

Vários estudos, já realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, avaliaram o efeito do tipo de enzima sobre a remoção de Phe em hidrolisados proteicos. Assim, Soares et al. (2006), ao utilizarem uma pepsina e uma papaína para o preparo de hidrolisados de leite em pó, não observaram diferença significativa na remoção de Phe (97,1% e 97,6%, respectivamente). No entanto, Vieira et al. (2008), ao avaliarem o efeito de diferentes proteases (uma de *Bacillus stearothermophilus*, duas de *Bacillus subtilis*, uma de *Aspergillus sojae*; uma pancreatina e uma papaína) no preparo de hidrolisados proteicos de farinha de arroz, obtiveram maior remoção de Phe ao empregarem a mesma papaína utilizada neste trabalho, tendo atingido 94,1%.

3.4 Efeito da relação proteína: carvão ativado

A avaliação do efeito da relação proteína:carvão ativado sobre a remoção de Phe foi realizada comparando os hidrolisados H6 (1:88), H7 (1:44), e

H8 (1:16). Pode-se observar na Tabela 2 que o efeito benéfico da utilização de uma maior relação proteína:CA não foi obtido, pois os percentuais de remoção da Phe foram de 82%, 60% e 25% para as relações de 1:88, 1:44 e 1:16, respectivamente.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores abordando o efeito deste parâmetro sobre a remoção de Phe de hidrolisados proteicos. Por outro lado, três estudos já foram realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, objetivando verificar se a relação proteína:CA influenciava a remoção de Phe de hidrolisados proteicos obtidos de diferentes fontes proteicas. No primeiro, ao se utilizar valores para esta relação de 1:118, 1:90 e 1:60, não foi detectada diferença significativa entre os resultados obtidos, tendo sido encontrado um valor médio de 97% de remoção de Phe de hidrolisados proteicos de leite desnatado. (SOARES, et al., 2006). Nos outros dois estudos, tal como no presente trabalho, não foi observado o efeito benéfico da utilização de uma maior relação proteína:CA. Assim, para os hidrolisados proteicos de fubá de milho, o emprego desta relação de 1:88,5, 1:16 e 1:8 levou à remoção de Phe de 84,0%, 62,4% e 54,1%, respectivamente. (CAPOBIANGO, et al., 2007). No caso de hidrolisados proteicos de farinha de arroz, para as relações de 1:88, 1:44 e 1:22 obtiveram-se 94,1%, 78,4% e 44,0%, respectivamente. (VIEIRA et al., 2008).

O carvão ativado é o meio adsorvente responsável pela remoção da fenilalanina. Portanto, uma provável explicação para a obtenção de uma menor remoção de Phe com o emprego de uma relação proteína:CA mais elevada é o fato de que, ao se diminuir a quantidade de carvão ativado na coluna, o hidrolisado terá uma menor superfície de contato com o carvão, que ficará saturado mais rapidamente, perdendo, portanto, sua capacidade adsorviva e, conseqüentemente, gerando hidrolisados com maior teor final de fenilalanina.

3.5 Efeito da temperatura de reação

Para a avaliação deste parâmetro sobre a remoção de Phe, foram comparados os hidrolisados H6 (50 °C) e H9 (25 °C). Observa-se na Tabela 2 que a vantagem da utilização de uma menor temperatura

de reação não foi observada, uma vez que a maior taxa de remoção (81,5%) foi obtida a 50 °C.

A maior eficiência da remoção de fenilalanina após a hidrólise a 50 °C pode estar relacionada a uma maior atuação da enzima de *Papaya carica* a esta temperatura. Tal resultado poderia ser explicado, provavelmente, pela influência de dois fatores. Primeiro, pelo fato da temperatura de 50 °C estar na faixa ótima de atuação da enzima utilizada, que, segundo o fornecedor, situa-se entre 50 e 70 °C (Tabela 3). Assim sendo, na obtenção do H9, a temperatura utilizada (25 °C) está muito abaixo da faixa ideal de atuação da enzima, enquanto no H6 a temperatura encontra-se na faixa ótima de atuação indicada pelo fornecedor. A utilização de uma temperatura fora da faixa ideal influenciou, provavelmente, na interação da enzima com seu substrato, diminuindo sua atividade, o que levou, provavelmente, a uma menor exposição da Phe e, conseqüentemente, a menor remoção deste aminoácido pelo carvão ativado.

Além disso, sabe-se que a temperatura exerce influência na estrutura tridimensional das proteínas, e que a atividade de uma enzima está diretamente associada a sua conformação. Conseqüentemente, a temperatura terá efeito sobre a atividade enzimática. (LEHNINGER, 2006). Portanto, a utilização de uma temperatura mais elevada (50 °C) pode ter provocado uma alteração da conformação da estrutura proteica, favorecendo uma maior interação das proteínas com a enzima, o que favoreceria a exposição da Phe e, conseqüentemente, sua maior remoção pelo carvão ativado.

Não foram encontrados na literatura dados de outros autores sobre o efeito da temperatura de reação sobre a remoção de Phe de hidrolisados proteicos. No entanto, este parâmetro foi anteriormente avaliado pelo mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho. Assim, Delvivo et al. (2006) verificaram que o emprego da temperatura de reação (25 °C e 50 °C) foi influenciado por diversos parâmetros utilizados no preparo dos hidrolisados proteicos de soro de leite, ao se empregar uma pancreatina, sendo que, em alguns casos, o emprego de uma maior temperatura foi mais vantajoso, em outros não houve diferença significativa ou, ainda, foi prejudicial para a remoção de Phe.

3.6 Efeito do pH inicial

Para a avaliação do efeito do pH inicial da reação de hidrólise na remoção de Phe dos hidrolisados proteicos de feijão, foram comparados os hidrolisados: H6 (pH 8,4), H10 (pH 8,0), H11 (pH 9,0) e H12 (pH 11,0).

Na Figura 2 nota-se que a utilização de diferentes valores do pH inicial para o preparo dos hidrolisados (pH 8,4, pH 8,0 e pH 9,0) não levou a uma diferença significativa na remoção de Phe (81,4, 75,6 e 80,06%, respectivamente). Isto pode ser explicado pelo fato de os três valores de pH utilizados estarem dentro da faixa de pH ótimo de atuação da enzima (de 3,0 a 9,0). Este mesmo fato justifica a menor remoção obtida no hidrolisado preparado com pH inicial 11,0 (72,96%), pois este valor de pH encontra-se fora da faixa ótima de atuação da enzima. Considerando que não houve diferença significativa entre os hidrolisados H6, H10 e H11, definiu-se o pH 8,4 (H6) como melhor valor, pois não necessita da etapa de ajuste de pH do extrato proteico de feijão, o que simplifica o processo de hidrólise.

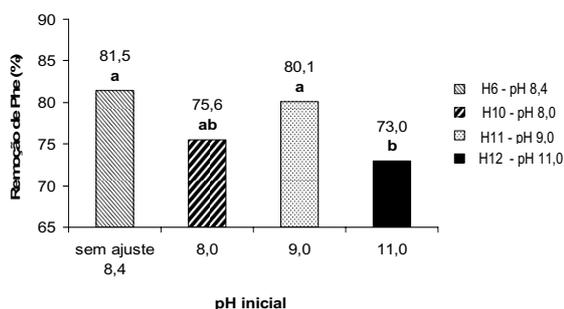


Figura 2 - Efeito do pH inicial da reação de hidrólise sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos de feijão. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Não foram encontrados na literatura dados sobre o efeito do pH inicial sobre a remoção de Phe de hidrolisados proteicos.

3.7 Efeito da relação enzima:substrato

Com o objetivo de avaliar o efeito da relação enzima:substrato sobre a remoção de fenilalanina, foram comparados entre si os hidrolisados: H6 (E:S = 4:100), H13 (E:S = 5:100), H14 (E:S = 7:100) e H15

(E:S = 10:100). Como pode ser observado na Figura 3, a vantagem da utilização de uma menor relação E:S (menor quantidade de enzima) não foi constatada para os valores de E:S estudados, uma vez que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos ao se utilizar E:S de 4:100, 5:100 e 7:100 e, ainda, ao se comparar 7:100 com 10:100, fica evidente que a maior taxa de remoção (87,9%) foi obtida quando se empregou a E:S mais elevada.

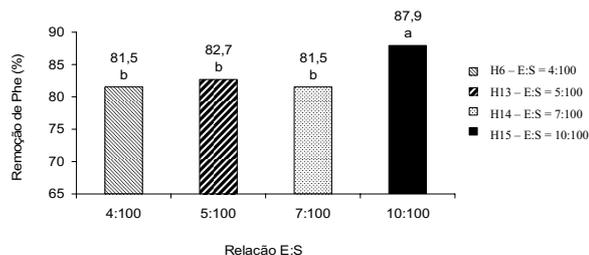


Figura 3 - Efeito da relação enzima:substrato sobre a remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos de feijão. E:S = Enzima:Substrato. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Não foram encontrados na literatura relatos de outros autores abordando o efeito da relação E:S sobre a remoção de Phe de hidrolisados proteicos. Porém, no mesmo laboratório do presente trabalho, alguns estudos foram realizados neste sentido. Assim, Capobiango et al. (2007), utilizando fubá de milho como matéria-prima, avaliaram diversas condições de hidrólise, com o emprego de uma pancreatina (AB Enzymes, Barueri, Brasil), sendo que, em alguns casos, observou-se a vantagem do uso de uma menor relação E:S (1:100 e 2:100), a qual levou a uma remoção de Phe mais elevada (86,7% e 79,0%, respectivamente). No entanto, em outro estudo deste mesmo laboratório, utilizando outra pancreatina (Sigma, St. Louis, EUA) para hidrolisar as proteínas de arroz (LOPES et al., 2008), não foi observado o mesmo efeito, já que o emprego de uma menor relação E:S (1:100 e 2:100) acarretou uma remoção menos acentuada de Phe (91,0% e 100,0%, respectivamente). O efeito benéfico de uma menor relação E:S também não foi observado em hidrolisados proteicos de farinha de arroz, obtidos pela ação da mesma papaína do presente trabalho, ao utilizar uma relação E:S de 1:100 (62,7% de remoção) e de 4:100 (94,1% de remoção). (VIEIRA et al., 2008).

Estes resultados demonstram que apesar de se esperar, teoricamente, que a utilização de uma maior

relação E:S leve a um maior grau de hidrólise e exposição de Phe mais acentuada, o que proporcionaria uma maior remoção deste aminoácido, na prática esse procedimento é bem mais complexo do que o esperado e depende de outros fatores, tais como: tipo e concentração de enzima e substrato, pH, tempo e temperatura da reação hidrolítica.

4. Conclusões

Empregando-se várias proteases para a hidrólise das proteínas do feijão e o CA como meio adsorvente, foi possível obter hidrolisado proteico com teor reduzido de Phe (433,7 mg Phe/100 g), que poderia ser utilizado na reconstituição do feijão, permitindo a sua introdução na dieta de fenilcetonúricos. Para os diversos parâmetros estudados, o melhor resultado foi encontrado ao se empregar a papaína na relação E:S de 10:100; relação proteína:CA de 1:88; pH inicial de 8,4 e temperatura de 50 °C, obtendo 87,93% de remoção de Phe.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapemig, Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; MOACIR, C.; SOARES, G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares Rico 23, Carioca, Pirata-1 e Rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, p. 12-18, 1995.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 26 dez. 2003. p. 33.
- 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, DF, 04 nov. 2002. p. 83.
- CAPOBIANGO, M. et al. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. **International Journal of Food Engineering**, Berkeley, v. 3, n. 6, 2007.
- CARREIRA, R. L. et al. Association of two enzymes for obtaining low phenylalanine protein hydrolysates from wheat flour. **International Journal of Food Engineering**, Berkeley, v. 4, n. 7, 2008.
- DELVIVO, F. M. et al. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. **American Journal of Food Technology**, Nova Iorque, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- GIOVANNINI, M. et al. Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster, v. 30 p. 145-152, 2007.
- HENDRIKSZ, C. J.; WALTER, J. H. Update on phenylketonuria. **Current Paediatrics**, Nova Iorque, v. 14, p. 400-406, 2004.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1120 p.
- LOPES, D. C. F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. **Food Science and Technology**, Londres, v. 38, n. 5, p. 447-453, 2005.
- LOPES, D. C. F. et al. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. **Journal Food Technology**, Oxford, v. 5, p. 191-197, 2007.
- LOPES, D. C. F. et al. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. **Journal of Food Technology**, Nova Iorque, v. 6, p. 57-65, 2008.
- LOPEZ-BAJONERO, L. J. et al. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, p. 938-942, 1991.
- MONTEIRO, L. T. B.; CÂNDIDO, L. M. B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, p. 381-387, 2006.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDIZIAK, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Nova Iorque, v. 29, p. 302-306, 1993.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.
- RAMASWAMI, U.; SMITH, I. Phenylketonuria. **Current Paediatrics**, Nova Iorque, v. 7, p. 251-255, 1997.
- SANGRONIS, E. et al. Protein quality of germinated (*Phaseolus vulgaris*). **European Food Research Technology**, Berlin, v. 222, p. 144-148, 2006.

SILVA, V. D. M. et al. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. **American Journal of Food Technology**, Nova Iorque, v. 2, p. 327-341, 2007.

SMITH, I.; BEASLEY, M. G.; ADES, A. E. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. **Archives Disease Childhood**, Londres, v. 65, p. 472-478, 1990.

SOARES, R. D. L. et al. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, p. 325-332, 2006.

VIEIRA, C. R. et al. Elaboração de hidrolisados protéicos de farinha de arroz destinados a dietoterapia de pacientes com fenilcetonúria. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 23, p. 83-90, 2008.