

EMPREGO DO CARVÃO ATIVADO PARA A REMOÇÃO DE FENILALANINA DE LEITE EM PÓ

ROSÂNGELIS D. L. SOARES *

FERNANDA M. DELVIVO **

LETÍCIA M. DE-MARCO ***

MARCOS J. B. AGUIAR ****

ROBERTO G. JUNQUEIRA *****

AMINTAS F. S. FIGUEIREDO *****

MARIALICE P. C. SILVESTRE *****

Visando o desenvolvimento de formulações dietéticas especiais para fenilcetonúricos foram preparados cinco hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado com papaína (PA) e pepsina (PE), isoladamente ou em associação com a protease do *Aspergillus oryzae* (AO). O carvão ativado foi utilizado para remover a fenilalanina (Phe) dos hidrolisados, sendo testados os tratamentos em bêquer e em coluna. O tratamento em coluna por corrida direta em seringa de 20 mL, utilizando o carvão hidratado na quantidade de 90 g/g de caseína, foi a condição escolhida para a remoção de Phe dos hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. A ação isolada da PA e da PE, e a associação de PA com AO resultaram nos maiores percentuais de remoção de Phe (97% a 98%). A espectrofotometria derivada de segunda ordem permitiu avaliar a eficiência da remoção de fenilalanina.

PALAVRAS-CHAVE: CARVÃO ATIVADO; FENILCETONÚRIA; FENILALANINA; LEITE EM PÓ DESNATADO; SUPLEMENTO DIETÉTICO.

* Nutricionista, Mestre em Ciências de Alimentos, Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

** Farmacêutica Bioquímica de Alimentos, Mestre em Ciências de Alimentos, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG.

*** Farmacêutica, Mestre em Ciências de Alimentos, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG.

**** Doutor em Genética, Ambulatório de Fenilcetonúria, Hospital das Clínicas, UFMG.

***** Doutor em Bioquímica, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG.

***** Doutor, com Pós-Doutorado em Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFMG.

***** Doutor, com Pós-Doutorado em Ciências de Alimentos, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG.

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU), doença genética de caráter autossômico recessivo, é causada por distúrbio do metabolismo de fenilalanina (Phe) em consequência da atividade ausente ou deficiente da enzima hepática, fenilalanina-hidroxilase, aumentando os níveis sangüíneos desse aminoácido. Em sua forma clássica, a atividade enzimática encontra-se abaixo de 2%. Só o tratamento precoce previne o grave e irreversível retardo mental, causado pelo acúmulo de Phe no sangue. A terapêutica, exclusivamente nutricional, consiste na restrição severa de alimentos protéicos e na utilização de formulações isentas ou com baixos teores de Phe para complementar o aporte protéico recomendado (SCRIVER et al., 1997; STARLING et al., 1999; WAPPENER et al., 1999; MIRA e MARQUEZ, 2000).

Para o tratamento de PKU é indispensável o uso de substitutos protéicos sintéticos, originados de misturas de L-aminoácidos ou hidrolisados protéicos (SCRIVER et al., 1997). Os produtos disponíveis no mercado brasileiro são importados e de alto custo, consistindo (normalmente) em formulações à base de aminoácidos livres. Portanto, além de apresentarem elevada osmolaridade e sabor desagradável, exigem doses diárias muito fracionadas e aporte protéico 50% superior para atingir a recomendação adequada (ACOSTA e YANNICELLI, 1997). Os hidrolisados protéicos de alto valor biológico, com elevado teor de di-e tri-peptídios são mais indicados, uma vez que propiciam melhor utilização das proteínas em relação às misturas de aminoácidos. São absorvidos mais rapidamente pelo organismo, apresentam menor osmolaridade, melhor tolerância e aceitação, além de serem economicamente mais viáveis (COGAN et al., 1981; SILVESTRE et al., 1994a; MIRA e MARQUEZ, 2000).

O preparo de formulações com baixos teores de Phe, utilizando hidrolisados protéicos, baseia-se no princípio da liberação desse aminoácido pela hidrólise enzimática de proteínas. Isso facilita sua posterior adsorção por filtração em gel, carvão ativado ou resinas de adsorção (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1992; SHIMAMURA et al., 1999).

Para a quantificação de Phe, alguns métodos têm sido citados na literatura além do convencional por cromatografia de troca iônica,

acoplado a analisador de aminoácidos. Dentre esses, encontra-se a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) em fase reversa, trabalhando com gradiente, na qual são utilizados diferentes tipos de coluna, detector ultra-violeta (UV) ou de fluorescência e a derivação pré-coluna com vários reagentes: o-fenilisotiocianato (BIDLINGMEYER, COHEN e TARVIN, 1984), cloreto de dansila (BADOUD e PRATZ, 1984; ZEZZA et al., 1992), feniltiocarbamil (FESTE, 1992; HOOGERHEIDE e CAMPBELL, 1992), 4-cloro-7-nitrobenzenofurazona - NBD-Cl (CARISANO, 1985), cloridrato de dabsil (VENDRELL e AVILÉS, 1986) e malonato de dietiletoximetileno (ALAIZ et al., 1992). A cromatografia em fase delgada, desenvolvida por HEATHCOTE e HAWORTH (1969), também pode ser utilizada para a análise quantitativa de aminoácidos de hidrolisados protéicos, após a separação com mistura de reagentes (ninidrina-cadmio). Outro método, baseado na utilização de sensor enzimático de membrana ("enzyme membrane sensor"), foi descrito por SHIMAMURA et al. (1999). Mais recentemente, CARREIRA et al. (2002) utilizaram a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) para analisar os aminoácidos essenciais de hidrolisados enzimáticos de caseína.

Vários autores têm reportado a grande confiabilidade do uso da espectrofotometria derivada de segunda ordem (EDS) entre 245 e 270 nm para quantificar resíduos de Phe em proteínas, desde que variáveis como o pH e a adição de outras substâncias sejam controladas (BRANDTS e KAPLAN, 1973; O'HARVER, 1979; MATSUSHIMA, INOUE e SHIBATA, 1975; ICHIKAWA e TERADA, 1977, 1979, 1981; CAHILL e PADERA, 1980; GRANT e BHATTACHARYA, 1985; ROJAS et al., 1998). Além disso, a EDS tem sido considerada técnica analítica simples, rápida e de custo relativamente baixo, tornando-se alternativa vantajosa em relação a outros métodos quantitativos (RAGONE et al., 1984).

Com relação ao estudo de hidrolisados protéicos, a EDS foi utilizada pela primeira vez por SILVESTRE, DAUPHIN e HAMON (1993) em hidrolisados de caseína e para a análise das alterações observadas na proteína (em torno dos resíduos aromáticos) que normalmente ocorrem ao se romper a estrutura nativa. A EDS revelou-se útil para avaliar a pureza de hidrolisados comerciais, indicando a adição de aminoácidos livres, de proteínas nativas ou mesmo de hidrolisados com diferentes graus de hidrólise.

Além de estudar os espectros dos aminoácidos aromáticos em pH 7,0 e 13,0, BARBOSA et al. (2002) utilizaram a EDS para avaliar o grau de exposição (GE) da Phe em hidrolisados de caseína obtidos pela ação da papaína. O GE da Phe foi também empregado por LOPES et al. (2003) para escolher a melhor condição de remoção desse aminoácido em hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado.

O objetivo deste trabalho consistiu em utilizar o carvão ativado para a remoção de Phe de hidrolisados de leite em pó desnatado, visando a preparação de suplementos dietéticos para fenilcetonúricos. Vários parâmetros foram estudados, buscando-se otimizar o uso desse meio adsorvente e, assim, obter elevado grau de remoção de Phe. A EDS foi empregada para determinar o teor de Phe do leite em pó desnatado e dos hidrolisados, avaliando-se a eficiência dos tratamentos em relação ao percentual de remoção desse aminoácido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, a protease do *Aspergillus oryzae* (tipo XXIII), a pepsina e o carvão ativado (80K 1099, 20-60 mesh não-tratado, granulado) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A papaína foi gentilmente cedida pela BIOBRÁS (Montes Claros, MG, Brasil). O leite em pó desnatado, sem a adição de vitaminas e sais minerais, foi adquirido em supermercado de Belo Horizonte.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparação dos hidrolisados de leite em pó desnatado

Cinco hidrolisados protéicos foram preparados utilizando-se papaína e pepsina, isoladamente ou em associação com a protease do *Aspergillus oryzae*. As soluções de leite em pó desnatado a 0,35 g% (p/v), conteúdo correspondendo à concentração protéica de 0,125 g/100 mL, foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0) exceto no hidrolisado contendo a pepsina (H2), para o qual

utilizou-se o tampão HCl-KCl 0,01mol/L pH 1,9. Todas as amostras foram, inicialmente, aquecidas a 80 °C por 10 min. A seguir, a temperatura foi reduzida para 50°C, em banho de gelo. As enzimas, papaina (PA), pepsina (PE) e a protease do *Aspergillus oryzae* (AO) foram adicionadas em quantidades suficientes para se obter as relações enzima:substrato desejadas. As reações foram interrompidas com a redução do pH para 3,0 pela adição de ácido fórmico (H1) e aumento do pH para 8,0 com solução de NaOH 12,5 mol/L (H2), ou com o abaixamento de temperatura para 10 °C por meio de banho de gelo e acetona (H3, H4 e H5). Imediatamente, após a hidrólise, as amostras foram congeladas e liofilizadas em liofilizador Free Zone, modelo 77500, Labconco (Kansas City, MI, EUA). O tempo total de hidrólise foi de 5h para todas as amostras, sendo apresentadas outras condições de reação na Tabela 1.

TABELA 1 – CONDIÇÕES HIDROLÍTICAS EMPREGADAS NA PREPARAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE LEITE EM PÓ DESNATADO PELA AÇÃO DA PAPAÍNA, DA PEPSINA E DA PROTEASE DO *Aspergillus oryzae*

Hidrolisados	Tempo de hidrólise	E:S (%)		
		AO	PA	PE
H1	PA (5h)	-	1	-
H2	PE (5h)	-	-	1
H3	AO (1h) + PE (4h)	1	-	2
H4	AO (1h) + PE (4h)	10	-	20
H5	AO (1h) + PA (4h)	10	20	-

E:S = relação enzima:substrato; PA = papaína; PE = pepsina; AO = protease do *Aspergillus oryzae*.

Temperatura: 50°C.

2.2.2 Preparação da curva padrão de fenilalanina

A curva padrão de Phe foi preparada em duas soluções-tampão, sendo o tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L pH 6,0 utilizado nos hidrolisados H1, H3, H4 e H5, e o tampão HCl-KCl 0,01 mol/L pH 1,9 no hidrolisado H2. Nos dois casos, os procedimentos descritos abaixo foram usados

para as preparações das soluções e a leitura dos espectros (BARBOSA et al., 2002).

Foram preparadas soluções estoques dos aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) em soluções-tampão apropriadas, pH 6,0 e pH 1,9, nas seguintes concentrações: 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. Em seguida, 10 mL de cada uma dessas soluções foram transferidas para frasco, sendo a mistura homogeneizada por agitação. A partir dessa mistura foram preparadas, por diluições sucessivas, soluções contendo Phe em concentrações variando entre 0,13 e 1,01 ($\times 10^{-4}$ mol/L).

As soluções diluídas contendo Phe, Tyr e Trp foram, então, submetidas às leituras de absorvância na faixa de 250 a 280 nm (espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra). Os espectros foram traçados com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA). Para traçar a curva padrão foram testadas a altura e a área do 3º e do 4º picos negativos do espectro da Phe em função de sua concentração.

2.2.3 Utilização do carvão ativado para remoção de fenilalanina

No tratamento com o carvão ativado, utilizado para a remoção de Phe dos hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado, foram testados dois procedimentos: agitação em béquer (LOPES et al., 2002) e passagem por coluna (seringa descartável). A amostra utilizada nesses testes correspondeu ao hidrolisado H5.

2.2.3.1 Agitação em béquer

Para o tratamento em béquer seguiu-se o procedimento descrito por LOPES et al. (2003), tendo sido testadas cinco quantidades de carvão ativado. Além do valor no qual esses autores obtiveram a maior remoção de Phe (118 g/g de caseína), quatro outras quantidades foram estudadas (15, 30, 60 e 90 g/g de caseína). Resumidamente, adicionou-se o carvão ativado à solução de hidrolisado a 80 mg% em água purificada (Aries, Vaponics, EUA). A mistura foi homogeneizada, por 30 min, em agitador magnético (Frisatom, São Paulo, Brasil) e velocidade suficiente

para manter o carvão em suspensão (velocidade 3). A seguir, a mistura foi centrifugada (Centrífuga Jouan, modelo B/BR4i, França) a 11.000 g por 10 min, a 25 °C, e filtrada em papel de filtro Whatman número 1 (Maidstone, Inglaterra).

2.2.3.2 Passagem por coluna

Para o tratamento em coluna utilizou-se seringa descartável, contendo filtro de nylon e lã de vidro como suportes. Após a adição do carvão à seringa, a solução de hidrolisado (80 mg% em água purificada) foi aplicada e recolheu-se o eluato. As etapas de centrifugação e filtração não foram necessárias nesse tratamento.

Quatro tipos de testes foram feitos com relação ao tratamento em coluna.

2.2.3.2.1 Modo de passagem da solução de hidrolisado pela coluna

Três procedimentos foram testados com 118 g de carvão/g de caseína: corrida direta (passagem ininterrupta); repouso de 30 min (passagem após contato com o carvão na coluna, por 30 min); e gotejamento (passagem com o auxílio de bureta de 2 mL por gotejamento ininterrupto). Em todos os testes foi utilizado carvão ativado “seco” (3% de umidade), ou seja, tal como é encontrado na sua embalagem original.

2.2.3.2.2 Hidratação prévia do carvão

Antes de ser adicionado à coluna, na proporção de 118 g/g de caseína, o carvão foi hidratado com 25 mL de água purificada, sob agitação (agitador magnético), em tempos variados (5, 10, 15, 20 e 30 min). A suspensão foi colocada na coluna contendo o filtro, sendo descartado o eluato. A seguir, retirou-se o carvão da coluna para observar o grau de hidratação.

Após a escolha do tempo de agitação que levou à melhor hidratação, a solução do hidrolisado foi aplicada à coluna nos modos de passagem

em que houve melhor remoção de Phe.

2.2.3.2.3 Capacidade da seringa

Foram utilizadas seringas descartáveis de 10 mL e 20 mL, em passagem por corrida direta com carvão hidratado na quantidade de 118 g/g de caseína.

2.2.3.2.4 Quantidade de carvão

Quantidades de carvão hidratado de 60, 90 e 118 g/g de caseína foram testadas no tratamento em coluna.

2.2.4 Determinação do teor de fenilalanina

As amostras de leite em pó desnatado e de seus hidrolisados foram submetidas à hidrólise ácida (HCl 5,7 mol/L) a 110 °C por 24h. Efetuou-se a leitura de absorvância das amostras no mesmo intervalo de comprimento de onda utilizado no preparo da curva padrão (250 nm a 280 nm), traçando-se a derivada de segunda ordem dos espectros. Os valores das áreas ou alturas dos picos negativos (“c” e “d”) foram, então, levados à curva padrão de Phe para quantificação do teor desse aminoácido nas amostras. No caso dos hidrolisados protéicos, esse mesmo procedimento foi efetuado nas amostras após o tratamento pelo carvão ativado em coluna (LOPES et al., 2002).

2.2.5 Avaliação da eficiência de remoção de fenilalanina

A eficiência da remoção de Phe dos hidrolisados protéicos pelo carvão ativado foi avaliada calculando-se o percentual de remoção do aminoácido de acordo com a seguinte fórmula (LOPES et al., 2002):

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

Na qual,

Teor de Phe inicial = teor de Phe no leite em pó desnatado.

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

2.2.6 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. As diferenças entre as médias das áreas ou alturas dos picos dos aminoácidos aromáticos entre os diferentes hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado foram determinadas pela Análise de Variância (ANOVA fator único) e pelo Teste de Duncan. Para a avaliação da remoção de Phe, comparando dois tratamentos (bêquer e coluna) em diferentes concentrações de carvão ativado, utilizou-se a Análise Fatorial. A Análise de Variância foi empregada para cada condição, seguida pelo Teste de Duncan para a comparação das médias. A curva padrão foi obtida por análise de regressão, empregando sete concentrações de fenilalanina em três repetições (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CURVA PADRÃO DE FENILALANINA

A curva padrão preparada em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0) apresentou a seguinte equação da reta: $y = 2,1748x + 0,3913$ e $R^2 = 0,992$. A que foi preparada em tampão HCl-KCl 0,01 mol/L (pH 1,9) teve como equação da reta $y = 6,0452x - 0,2375$ e $R^2 = 0,972$. Em ambas, a área do pico “d” (Figura 1 B) foi escolhida para ser relacionada com a concentração do aminoácido por ter apresentado maior coeficiente de determinação (R^2) do que a altura. Constatou-se, também, que a regressão para a Phe, em pH 6,0 e pH 1,9, foi altamente significativa ($p < 0,001$). Esse resultado está de acordo com o obtido por ZHAO et al. (1996) que relacionaram a altura do pico de absorção da Phe, em mistura com Trp e a Tyr, com a concentração do aminoácido. Outros autores também relataram resultados semelhantes com relação à Phe, em pH 7,0, na presença de concentrações variadas de Tyr e Trp (ICHIKAWA e TERADA, 1977; BARBOSA et al., 2002; LOPES et al., 2003).

A EDS foi utilizada por outros autores na mesma faixa de comprimento de ondas que a do presente trabalho. No entanto, os resultados obtidos relacionados ao número de picos negativos no espectro da Phe mostraram-se diferentes. ICHIKAWA e TERADA (1977) obtiveram cinco picos negativos para esse aminoácido em pH 7,0, enquanto MICLO et al. (1995) relataram a presença de seis picos em pH 1,9. Essa variação no espectro da Phe pode estar associada à diferenças nas formas do aminoácido padrão utilizadas (livre ou N-acetil-éster), com a aparelhagem empregada, como também ao tipo de solvente e valores de pH (LEVILLAIN e FOMPEYDIE, 1986).

3.2 ESPECTROS

Na Figura 1 estão apresentados os espectros da Phe em pH 6,0 e pH 1,9, assim como os dos hidrolisados H1 (pH 6,0) e H2 (pH 1,9). Observou-se semelhança entre os espectros nesses dois valores de pH, quanto à posição e ao número de picos negativos. Além disso, tais espectros são similares ao da Phe. A semelhança entre os espectros de aminoácidos padrões e o de proteínas já havia sido relatada por ICHIKAWA e TERADA (1979), que empregaram EDS para determinar a quantidade de resíduos de Phe em diversas proteínas desnaturadas ou em seus estados nativos (insulina, ribonuclease, lisozima e soro albumina). Resultados similares foram demonstrados por BARBOSA et al. (2002) ao estudarem os espectros de absorvância e de derivada segunda de hidrolisados de caseína obtidos pela ação da papaína. LOPES et al. (2002) verificaram semelhança entre os espectros, quando empregaram papaína e AO no preparo de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado.

3.3 AGITAÇÃO EM BÉQUER: ESCOLHA DA QUANTIDADE DE CARVÃO PARA REMOÇÃO DE FENILALANINA

Dentre as cinco quantidades de carvão ativado estudadas, 15 g e 30 g/g de caseína levaram aos mais baixos percentuais de remoção de Phe (83% e 92%, respectivamente). As quantidades de carvão ativado de 90 g e 118 g/g de caseína foram as mais eficientes nesse sentido. Tais resultados indicam que a quantidade de carvão utilizada (em béquer por agitação) interferiu na remoção de Phe (Tabela 2).

FIGURA 1 - ESPECTROS DA PHE EM pH 6,0 (A) E pH 1,9 (B) EM SOLUÇÃO CONTENDO TYR E TRP; E DOS HIDROLISADOS H1 EM pH 6,0 (C) E H2 EM pH 1,9 (D)

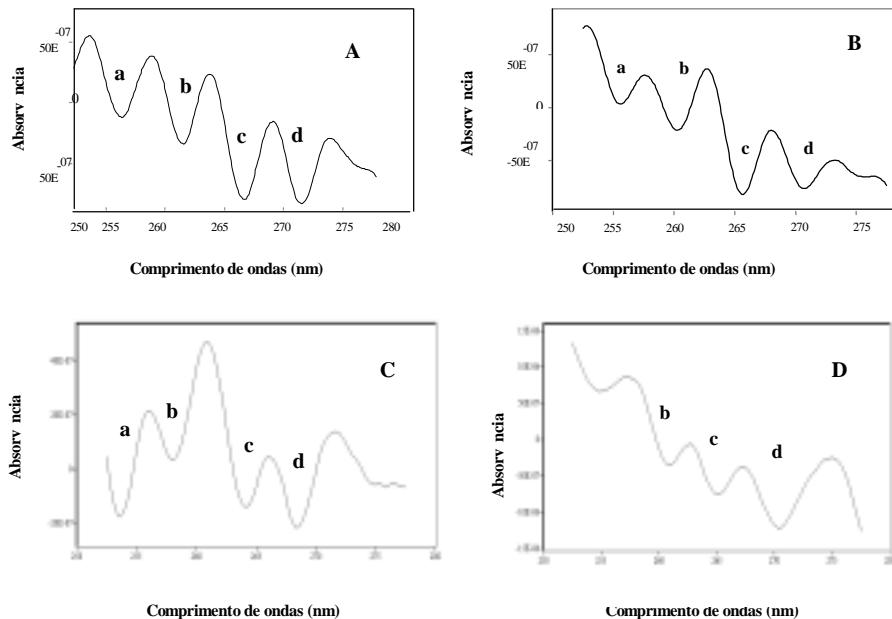


TABELA 2 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO SOBRE A REMOÇÃO DE Phe

Tratamentos	Quantidade de carv ^a o (g/g case na)		
	60	90	118
B ^b quer %	95,4 ^{2/b} – 2,1	97,3 ^{1/a} – 0,3	98,2 ^{1/a} – 0,6
Coluna * %	97,3 ^{1/a} – 0,4	98,1 ^{1/a} – 0,6	96,6 ^{1/a} – 1,2

* Corrida direta, carvão hidratado, seringa de 20 mL. Amostra utilizada: hidrolisado H5. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação da mesma concentração de carvão para diferentes tratamentos. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade na comparação de diferentes concentrações de carvão para o mesmo tratamento.

3.4 PASSAGEM POR COLUNA: TESTES PARA A REMOÇÃO DE FENILALANINA

Com relação ao modo de passagem pela coluna não houve diferença significativa entre os tratamentos com corrida direta (97% de remoção de Phe) e após repouso por 30 min (98%). Entretanto, a técnica da corrida direta apresenta a vantagem de ser mais simples e rápida e, portanto, economicamente mais viável. O sistema de gotejamento foi o menos eficiente na remoção de Phe (95%), tendo apresentado diferença significativa em relação aos dois outros tratamentos.

O teste de hidratação prévia do carvão mostrou que o tempo mínimo de agitação necessário para promover adequada adsorção de água foi de 10 min. Quanto à remoção de Phe em corrida direta e repouso de 30 min, com o carvão previamente hidratado, observaram-se valores de 98% e 99%, respectivamente. Portanto, a hidratação promoveu aumento de 1% na remoção de Phe, em relação ao carvão seco.

O maior percentual de remoção de Phe foi obtido com a seringa de 20 mL (97%), sendo verificada diferença significativa em relação a seringa ou 10 mL (93%).

Os testes em coluna só foram realizados com as quantidades de carvão ativado que promoveram os maiores percentuais de remoção de Phe no procedimento com béquer, ou seja, 60 g, 90 g e 118 g/g de caseína.

Os dados apresentados na Tabela 2 indicam que ao contrário do tratamento em béquer, as quantidades testadas de carvão em coluna não influenciaram o percentual de remoção de Phe.

3.5 TRATAMENTO EM BÉQUER VERSUS EM COLUNA

Para o tratamento em béquer foram consideradas as melhores condições estabelecidas para a passagem por coluna, ou seja, corrida direta, hidratação prévia do carvão por 10 min e seringa de 20 mL.

De acordo com os dados da Tabela 2 houve diferença significativa entre os dois tratamentos apenas quando se utilizou 60 g de carvão/g

de caseína, sendo a passagem por coluna nesse caso mais eficiente que a agitação em béquer. Além disso, o tratamento em coluna permite eliminar três etapas na remoção de Phe (agitação, centrifugação e filtração), reduzindo-se o tempo e o custo do processo.

Deve-se ressaltar que as três quantidades de carvão testadas em coluna não apresentaram diferenças significativas no percentual de remoção de Phe. No entanto, o emprego de 90 g de carvão/g de caseína no estudo dos hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado revelou melhor espalhamento do carvão sobre o filtro na coluna em comparação à quantidade de 60 g de carvão/g de caseína.

LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) removeram 92% de Phe utilizando 2,95 g de carvão/g de caseína em hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio. Tal diferença parece estar associada à proporção de carvão utilizada, uma vez que os maiores percentuais de remoção de Phe em béquer foram encontrados com 90 g e 118 g/g de caseína, (97% e 98%, respectivamente). Essas quantidades são 30 vezes superiores às utilizadas por aqueles autores. Deve-se ressaltar, entretanto, que não foram citadas as condições de uso do carvão ativado, tais como o tempo, a velocidade de agitação e a temperatura da solução protéica tratada. Além disso, apesar de terem afirmado que o estudo foi realizado com leite em pó desnatado e caseína, os resultados apresentados referem-se apenas à caseína.

3.6 PERCENTUAL DE REMOÇÃO DE FENILALANINA

O uso de carvão ativado (nas condições definidas no item 2.2.5) foi eficiente para a remoção de Phe em todos os hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (Tabela 3). O percentual de redução variou de 94% a 98%, o que corresponde ao teor final de 25,2 a 7,4 µg de Phe/100 g de hidrolisado. O teor de Phe do leite em pó desnatado foi de 5,69 mg/100 mg de proteína.

Os resultados foram apresentados em percentagem de remoção de Phe e teor final de Phe (µg/100 g de hidrolisado) devido aos cálculos de adequação das prescrições dietéticas de substitutos protéicos destinados aos fenilcetonúricos e para atender à regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos (BRASIL, 2001).

TABELA 3 – PERCENTUAL DE REMOÇÃO E TEOR DE Phe DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE LEITE EM PÓ DESNATADO

Hidrolisados	Remoção Phe *	Teor final de Phe ($\mu\text{g}/100\text{ g Hidrolisado}$)
	(%)	
H1	97,6 ^a – 1,2	9,6 – 4,7
H2	97,1 ^a – 0,3	11,5 – 1,2
H3	94,7 ^b – 0,1	20,9 – 0,5
H4	93,6 ^b – 2,1	25,2 – 8,4
H5	98,1 ^a – 0,6	7,4 – 2,5

* Passagem por coluna (corrida direta), 90 g de carvão hidratado/g de caseína, seringa de 20 mL.

Teor final de Phe = teor de Phe dos hidrolisados após o tratamento com o carvão ativado. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias de remoção de Phe indicadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Outros autores, que também utilizaram o carvão ativado para remover a Phe de hidrolisados protéicos obtiveram resultados semelhantes ao do presente trabalho. KITAGAWA et al. (1987) empregaram a actinase para hidrolisar as proteínas do soro do leite e, após tratamento com carvão ativado, conseguiram remover 97% de Phe. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991), utilizando o carvão ativado, removeram 92% de Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio, obtidos pela ação da papaína e de protease do *Aspergillus oryzae* (AO). MOSZCZYNSKI e IDZIAK (1993) eliminaram com carvão ativado 95% de Phe de hidrolisados enzimáticos de caseína, empregando sistema de três enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase). LOPES et al. (2002) relataram remoção de Phe na faixa de 96% a 99% de hidrolisados de leite em pó desnatado. Empregaram papaína e protease de AO após tratamento com carvão ativado em bêquer com agitação magnética de 30 min e concentração de 118 g/g de caseína. Por outro lado, COGAN et al. (1981) removeram apenas 36% de Phe quando empregaram carvão ativado em hidrolisados enzimáticos de caseína, utilizando a associação de papaína e pepsina.

ARAI et al. (1986), empregando a coluna cromatográfica Sephadex G-

15, removeram cerca de 99% de Phe de hidrolisados protéicos do soro do leite concentrado, obtidos pela ação isolada da pronase E ou associada com a pepsina, quimotripsina e papaína. OUTINEN et al. (1996) eliminaram praticamente toda Phe (99,5% a 99,9%) de hidrolisados protéicos, utilizando pancreatina (E:S de 3%, 6h, pH 7,0) e resinas hidrofóbicas de poliestireno (XAD-4 e XAD-16). Apesar desses resultados serem superiores aos do presente trabalho, deve-se mencionar que o uso de resinas para remover a Phe apresenta elevado custo (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI e IDZIAK, 1993; SHIMAMURA et al., 1997).

3.7 EFEITO DA AÇÃO ENZIMÁTICA SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

3.7.1 Ação isolada das enzimas

Observou-se que a PA e a PE (hidrolisados H1 e H2, respectivamente), agindo isoladamente, deram origem a hidrolisados protéicos com teores semelhantes de Phe após o tratamento com o carvão ativado (Tabela 3).

O efeito da ação isolada das enzimas sobre a remoção de Phe já foi relatado por outros autores que (após o tratamento com o carvão ativado ou com resina de adsorção) encontraram valores semelhantes ao do presente trabalho (ARAI et al. 1986; KITAGAWA et al., 1987 e OUTINEN et al. 1996). LOPES et al. (2002) também obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram isoladamente protease de AO (E:S de 1%, durante 5 h, a 50°C, pH 6,0) para hidrolisar o leite em pó desnatado, removendo 98% de Phe.

3.7.2 Associação das enzimas

Dentre as três associações estudadas, as duas com PE e AO (hidrolisados H3 e H4) mostraram-se semelhantes entre si e menos eficientes que a associação de PA com AO (Tabela 3). ARAI et al. (1986) empregaram pronase E associada à papaína ou à quimotripsina e obtiveram percentuais de remoção de Phe de 98,8%, portanto

semelhantes aos obtidos pela ação de PA com AO (H5). Esses autores testaram a pronase E associada à pepsina e conseguiram maior percentual de remoção de Phe (99,8%) em relação aos obtidos com a associação de PE com AO (H3 e H4).

LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) estudaram a associação de duas enzimas, AO com PA (E:S de 1% e 2%, durante 5h e 20 h, respectivamente) e removeram percentual de Phe (92%) inferior aos obtidos nos hidrolisados deste estudo (H3, H4 e H5). MOSZCZYNSKI e IDZIAK (1993) empregaram sistema de três enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e leucina aminopeptidase) e conseguiram remover 95% de Phe de hidrolisados enzimáticos de caseína. LOPES et al. (2003), utilizaram a associação de AO com PA, na mesma relação E:S empregada por LOPEZ-BAJONERO et al. (1991), porém com tempos de hidrólise cinco vezes menores. Obtiveram percentual de remoção de Phe, ligeiramente, superior (99%) em relação ao hidrolisado H5 (98%).

COGAN et al. (1981) conseguiram pequena redução no teor de Phe (36%) com a associação de papaína e pepsina em hidrolisados enzimáticos de caseína.

3.7.3 Ação isolada versus associação de enzimas

Comparando a ação isolada de PA (H1) e sua associação com AO (H5) verifica-se que ambas foram igualmente eficientes na remoção de Phe (Tabela 3). No caso de PE, a sua ação isolada (H2) possibilitou maior remoção de Phe do que a associação com AO (H3 e H4).

Alguns autores consideram vantajosa a utilização da associação de enzimas para maior remoção de Phe. ARAI et al. (1986), estudando a ação isolada da pronase E e sua associação com a pepsina, relataram a superioridade da associação (99,7% de remoção) sobre a ação isolada (99,0% de remoção). Visando a otimização da liberação de Phe em hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato, LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) testaram ações isoladas e associadas de AO e PA. O primeiro procedimento não promoveu a completa liberação de Phe, sendo mais vantajosa a associação de AO com PA (relação E:S de 1% e 2%, respectivamente) com tempo total de hidrólise de

25h. Entretanto, não mencionaram os percentuais isolados de remoção de Phe de cada uma das enzimas.

LOPES et al. (2003) não verificaram diferenças significativas entre o percentual de remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado, submetidos à ação isolada da protease do AO (E:S de 1%, tempo de hidrólise de 1h a 15h) ou sua associação com PA (E:S de 2%, tempo de hidrólise 4h a 20h) a 50º C e pH 6,0.

4 CONCLUSÃO

O carvão ativado mostrou-se eficaz na remoção de Phe (94% a 98%) de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. Dentre as condições testadas, o tratamento em coluna por corrida direta com 90 g de carvão hidratado por grama de caseína, em seringa de 20 mL, propiciou elevada remoção de Phe (98%) e maior praticidade. O tratamento em coluna foi mais vantajoso do que em bêquer, considerando-se a redução do tempo e do custo do processo. A papaína (PA) e a pepsina (PE) removeram, isoladamente, quantidades próximas de Phe. A associação de PA ou de PE com a protease do *Aspergillus oryzae* (AO) não aumentou a remoção de Phe em relação à ação isolada das duas enzimas (PA e PE).

A espectrofotometria derivada de segunda ordem (EDS) foi eficiente para a determinação de Phe no leite em pó desnatado e nos hidrolisados, após o tratamento com carvão ativado. O método é simples, rápido e de custo relativamente baixo, podendo ser utilizado para avaliar a eficiência da remoção de Phe de hidrolisados protéicos.

Abstract

UTILIZATION OF ACTIVATED CARBON FOR THE REMOVAL OF PHENYLALANINE FROM SKIM MILK POWDER

Aiming the development of special dietetic formulations for phenylketonuria, five enzymatic hydrolysates from skim milk powder were prepared, using papain (PA) and pepsin (PE), separately or in association with protease from *Aspergillus oryzae* (AO). The activated carbon was used to remove phenylalanine (Phe) from hydrolysates being tested the treatments in Beaker and in column. The treatment in column by direct passage, in 20 mL syringe, using 90 g of hydrated carbon/g of casein, was the chosen condition for Phe removal from skim milk powder

hydrolysates. The isolated action of PA and PE, and the association of PA with AO produced the highest Phe removal (97 to 98%). The second derivative spectrophotometry allowed to estimate the efficiency of Phe removal.

KEY-WORDS: *ACTIVATED CARBON; PHENYLKETONURIA; PHENYLALANINE; SKIM MILK POWDER; SECOND DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY.*

REFERÊNCIAS

- 1 ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S. Protocolo 1 – Phenylketonuria (PKU). In: ROSS PRODUCTS DIVISION. Abbott Laboratories. **The ross metabolic formula system:** nutrition support protocol. 3rded. Columbia: Keziaz Strvat, 1997.
- 2 ALAIZ, M.; NAVARRO, J.L.; GIRON, J.; VIOQUE, E. Amino acids analysis by high-performance liquid chromatograph after derivatization with diethyl ethoxymethylenermanolate. **J. Chromatogr.**, v. 591, n.1, p.181-186, 1992.
- 3 ARAI, S.; MAEDA, A.; MATSUMURA, M.; HIRAO, N.; WATANABE, M. Enlarged-scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, 2929-2931, 1986.
- 4 BADOUD, R.; PRATZ, G. Simple and rapid quantitative determination of lysinoalanine and protein hydrolysate amino acids by high-performance liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride. **J. Chromatogr.**, Denver, v.19, n.6, p.155-164, 1984.
- 5 BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; SILVA, V.D.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Padronização de método analítico para avaliação do grau de exposição da fenilalanina em hidrolisados de caseína, por espectrofotometria derivada segunda. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, São Paulo, v.38, n.1, p.113-119, 2002.
- 6 BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, Amsterdan, v.336, n.1, p.93-104, 1984.
- 7 BRANDTS, J.F.; KAPLAN, L.J. Derivate spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. **Biochem.**, v.12, n.10, p.2011-2024, 1973.
- 8 BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução n.40 de 21 de março de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico para rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 mar. de 2001. p.22-25.
- 9 CAHILL, J.E.; PADERA, F.G. Derivate analysis of uv/visible spectra. **Amer. Laborat.**, v. 12, n. 1, p. 101-112, 1980.
- 10 CARISANO, A. Rapid and sensitive method for the determination of proline by reversed-phase high-performance liquid chromatography with automated pre-column fluorescence derivatization. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.318, n.1, p.132-138, 1985.
- 11 CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego de cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. **Rev. Ciênc. Tecol. Alim.**, Campinas, v.22, n.3, p.229-232, 2002.
- 12 COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of

enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food and Agr.*, v.32, n.1, p.459-466, 1981.

13 FESTE, A. S. Reversed-phase chromatography of phenylthiocarbamyl amino acid derivatives of physiological amino acids: an evaluation and a comparison with analysis by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.574, n.1, p.23-24, 1992.

14 GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P. K. Application of derivate spectroscopy to the determination of chromatography peak purity. *J. Chromatogr.*, v. 347, n 2, p. 219-235, 1985.

15 HEATHCOTE, J.G.; HAWORTH, C. An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose. *J. Chromatogr.*, v.43, n.1, p.84-92, 1969.

16 HOOGERHEIDE, J.G.; CAMPBELL, C. M. Determination of cysteine plus half-cystine in protein and peptide hydrolysates: use of dithiodiglycolic acid and phenylisothiocyanate derivatization. *Analyt. Biochem.*, San Diego, v.201, n.1, p.146-151, 1992.

17 ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 494, n. 2, p.267-270, 1977.

18 ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.580, n.1, p.120-128, 1979.

19 ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.29, n.2, p.438-444, 1981.

20 KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURAI, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low: phenylalanine peptide. *Enzyme* v.38, n.1, p.321-327, 1987.

21 LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrophotométrie dérivée: intérêt, limites et applications. *Analysis*, Oxford, v.14, n.1, p.1-20, 1986.

22 LOPES, D. C. F.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; SANTORO, M. M.; FIGUEIREDO, A. F.S.; SILVESTRE, M. P. C. Hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado para fenilcetonúricos. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v.17, n.3, p.130-136, 2002.

23 LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v.56, n.4, p.938-942, 1991.

24 MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA, K. Derivate absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal. Biochem.*, v.65, n.3, p.362-368, 1975.

25 MICLO, L.; PERRIN, E.; DRIOU, A., MELLET, M.; LINDEN, G. Determination of the ratios of the aromatic amino acids residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides. *Int. J. Pep. Prot. Res. Haguena*, v.46, n.2, p.186-192, 1995.

26 MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Públ.*, v.34, n.1, p.86-96, 2000.

27 MOSCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Ap. Biochem. and Microbiol.*, v.29, n.3, p.302-306, 1993.

28 O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, n. 9, p.1548-1553, 1979.

29 OUTINEN, M. T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. **Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof.** Patents US 5547687, 1996.

30 PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental.** 14.ed. Piracicaba, 2000. 477 p.

31 RAGONE, R.; COLONNA, G.; BALESTRIERI, C.; SERVILLO, L.; IRACE, G. Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivative spectroscopy. *Biochem.*, New York, v.23, n. 3, p.1871-1875, 1984.

32 ROJAS, F. S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivate ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, v.35, n. 10, p. 753-761, 1998.

33 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. 1015-75.

34 SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. **Peptide mixture and products thereof.** Patents US 5952193, 1999.

35 SILVESTRE, M.P.C.; DAUPHIN, C.; HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivate spectrophotometry for analysing casein hidrolysates. *Anal. Chim. Acta.*, v.282, n.2, p.603-612, 1993.

36 STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. *Rev. Med. Minas Gerais*, v.9, n.3, p. 106-110, 1999.

37 VENDRELL, J.; AVÉLES, F. Complete amino acids analysis of proteins by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.358, n.3, p.401-413, 1986.

38 WAPPNER, R.; CHO, S.; KRONMAL, R.A.; SCHUETT, V.; SEASHORE, M. R. Management of phenylketonuria for optimal outcome: a review of guidelines for phenylketonuria management and a report of surveys of parents, patients, and clinic directors. *Pediatr.*, v.104, n.1, p.4-9, 1999.

39 ZEZZA, F.; KERNER, J.; PASCALE, M.R.; GIANNINI, R.; MARTELLI, E.A. Rapid determination of amino acids by high-performance liquid chromatography; release of amino acids by perfused rat liver. *J. Chromatography*, v.593, n.2, p.99-101, 1992.

40 ZHAO, Q.; SANNIER, F.; GARREAU, I.; LECOEUR, C.; PIOT, J.M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second order derivate spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides: application to hemorphins. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.723, n.3, p.35-41, 1996.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro a este trabalho, nas formas de auxílio à pesquisa e bolsas de Aperfeiçoamento e Iniciação Científica.