

Obtenção de Bromelina e caracterização da atividade proteolítica visando a sua utilização na produção de suplemento dietético para fenilcetonúricos

Guilherme Rabelo de Souza¹
Adriana Álvares de Souza e Silva²
Raquel Linhares Carreira³
Marialice Pinto Coelho Silvestre⁴

RESUMO: A fenilcetonúria (PKU) clássica é a doença clinicamente mais encontrada dentro do grupo de erros congênitos no metabolismo de aminoácidos. Essa enfermidade caracteriza-se pela deficiência ou inatividade da enzima fenilalanina hidroxilase que converte a fenilalanina (Phe) em tirosina. O tratamento da fenilcetonúria é realizado quase que exclusivamente através de uma alimentação restrita de alimentos protéicos, e do controle na ingestão de Phe. No Brasil, a baixa disponibilidade de alimentos com teores reduzidos de Phe torna a dieta monótona, pouco atrativa e de difícil adesão. Os produtos especiais, à base de misturas de aminoácidos livres, são geralmente importados, apresentando elevado custo. Visando a proporcionar a introdução de novos alimentos na dieta dos fenilcetonúricos, este estudo foi realizado no intuito de desenvolver produtos a partir das proteínas da farinha de trigo hidrolisadas com protease vegetal. Assim sendo, otimizou-se a obtenção do extrato enzimático bruto do abacaxi, caracterizando em relação à atividade enzimática e propriedades físico-químicas, utilizando-o no preparo de hidrolisados protéicos da farinha de trigo. Para este fim, as partes do abacaxi (polpa, talo e casca) foram extensivamente estudadas em relação ao teor protéico e respectiva atividade enzimática, a fim de se determinar com qual fração seria elaborado o extrato bruto enzimático. Não houve diferenças significativas na atividade proteolítica entre a polpa e o talo, utilizando-se, então, este subproduto da agroindústria do abacaxi em uma relação enzima: substrato 2%, para a elaboração dos hidrolisados de proteínas da farinha de trigo.

PALAVRAS-CHAVE: Alimentos especiais. Farinha de trigo. Fenilcetonúria. Extrato enzimático de abacaxi. Hidrolisados protéicos.

ABSTRACT: The phenylketonuria (PKU) classic is the illness more found inside of the group of congenital errors in the amino acid metabolism. This disease characterizes for the deficiency or inactivity of the phenylalanine enzyme hydroxylase that converts the phenylalanine (Phe) into tyrosine. The treatment of the phenylketonuria is carried through almost that exclusively through a restricted protein food, and of the control in the ingestion of Phe. In Brazil, low the food availability with reduced of Phe, becomes the monotonous, little attractive diet and of difficult adherence. The products special, to the base of free amino acid mixtures, generally are imported, presenting raised custo. In view to provide the food introduction new in the diet of the phenylketonurics, this study were carried through in intention to develop products from hydrolysed proteins the flour of vegetal wheat with protease. Thus being, it was optimized attainment of the rude enzymatic extract of the pineapple, characterizing in relation to the enzymatic activity and properties physicist-chemistries. For this end, the parts of the pineapple (pulp, stem and rind) extensively had been studied in relation to the protein content and respective

¹ Acadêmico do curso de Farmácia do Unipam e bolsista do CNPq 2004/2005.

² Professora Assistente do Unipam e orientadora da pesquisa

³ Professora Assistente do Unipam e orientadora da pesquisa

⁴ Professora Dra. colaboradora da Faculdade de Farmácia da UFMG

enzymatic activity, in order to determine itself with which fraction would be elaborated the enzymatic crude extract. It did not have significant differences in the activity between the pulp and the stem, using itself then, this by-product of the industry of the pineapple, in a relation enzyme: substratum 2%, for the elaboration of the hydrolisated ones of proteins of the wheat flour.

KEY WORDS: Phenylketonuria. Bromelain. Whey. Dietary supplement.

1 Introdução

A fenilcetonúria (PKU) é o resultado de um erro inato do metabolismo, de herança autossômica recessiva (MARTINS et al., 1993). Caracteriza-se por um defeito ou deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase, que é responsável pela conversão da fenilalanina em tirosina. Sem a restrição da ingestão de fenilalanina da dieta, este aminoácido e seus metabólitos se acumulam no sangue e em outros tecidos e a Tyr se torna deficiente, afetando o sistema nervoso (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; GREVE et al., 1994; OUTINEN et al., 1996; ACOSTA et al., 1998; SHIMAMURA et al., 1999). O tratamento para a PKU consiste numa dieta pobre em fenilalanina, que deve ser iniciada até o terceiro mês de vida do recém-nascido e mantida por toda a vida (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS et al., 1993; SHIMAMURA et al., 1999; MIRA & MARQUEZ, 2000).

Misturas de L-aminoácidos isentas de fenilalanina são essenciais para as necessidades de pacientes com fenilcetonúria (ACOSTA et al., 1998), entretanto, por serem importadas, essas formulações são de alto custo, além de resultarem em uma dieta monótona e pouco palatável (MIRA & MARQUEZ, 2000). Uma boa alternativa para o tratamento consiste no uso de formulações à base de hidrolisados protéicos isentos ou com baixo teor de fenilalanina, pois apresentam melhor tolerância, sabor e odor mais agradáveis, menor osmolaridade, o que evita a diarreia osmótica causada pelo uso de aminoácidos livres. Além disso, são prontamente utilizáveis, pois os di- e tripeptídeos provenientes da hidrólise parcial de proteínas são absorvidos mais rápida e completamente que uma mistura de aminoácidos livres, e sua produção é economicamente mais viável do que as misturas sintéticas de aminoácidos (COGAN et al., 1981; AUBES-DUFAU et al., 1995; MILUPA, 1995; MIRA & MARQUEZ, 2000).

Dado o grave problema econômico e social do tratamento de pacientes com fenilcetonúria, a pesquisa deste trabalho foi direcionada para o desenvolvimento de uma formulação dietética à base de hidrolisados protéicos, com baixo teor de fenilalanina, utilizando-se como fonte de proteínas a farinha de trigo e o extrato bruto enzimático de abacaxi na produção de proteínas hidrolisadas.

Existem, na literatura, diversos trabalhos sobre as propriedades da bromelina extraída de plantas de abacaxi. O uso de bromelina é variado, sempre fundamentado em sua propriedade proteolítica (BALDINI et al, 1993).

Considerando-se que o Brasil é um grande produtor de abacaxi, ocupando a primeira posição na América do Sul e o terceiro lugar no ranking mundial, estabeleceu-se a utilização da bromelina do abacaxi na obtenção dos hidrolisados protéicos da farinha de trigo.

O abacaxi fruto é a parte comercializável da planta, porém, esta porção representa somente 23% do total da planta, enquanto que o restante, formado por caule, folha, casca, coroa e talos, é considerado resíduo agrícola e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em perdas econômicas.

Trabalhos já realizados demonstram que estes resíduos apresentam teores representativos de carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas que possibilitam a sua utilização industrial como matéria-prima para a obtenção de bromelina, amido, fibras, álcool etílico e ração animais (BALDINI et al, 1993).

O objetivo geral do presente trabalho consiste em desenvolver uma formulação a partir da farinha de trigo, contendo as proteínas panificáveis deste cereal, hidrolisadas com o extrato bruto enzimático do abacaxi e outras enzimas comerciais, apresentando baixo teor de fenilalanina, a ser utilizada em dietas de fenilcetonúricos.

2 Proteases de origem vegetal

As enzimas proteolíticas vegetais são a papaína, a ficina e a bromelina, apresentando a mesma faixa de pH ótimo de ação, variando entre 7,0 e 8,0 (BELITZ & GROSCHE, 1992). A papaína é obtida a partir do látex que flui por incisão no fruto ainda não maduro do *Carica papaya* (EVANGELISTA, 2000). A ficina é obtida a partir do látex do *Ficus* sp, que abrange diferentes tipos de figueiras tropicais. Tanto a ficina quanto a bromelina apresentam as mesmas funções da papaína (EVANGELISTA, 2000).

2.1 A Bromelina

A) Fonte: o abacaxizeiro

O abacaxizeiro é uma angiosperma, monocotiledônea, da família Bromeliaceae, gênero *Ananás*, espécie *Ananás comosus* e que possui cultivares de interesse agrícola,

dentre eles o cv. *Smooth Cayenne*, o mais cultivado mundialmente. Planta herbácea perene, produz uma fruta única em uma inflorescência terminal.

O abacaxizeiro produz frutos de sabor e aroma aceitáveis no mundo todo. O Brasil é um grande produtor de abacaxi, ocupando a primeira posição na América do Sul e o terceiro lugar no ranking mundial, sendo conhecidas cinco espécies de Ananás e uma de pseudoananas. Dentro da espécie *Ananás comosus*, estão incluídos todos os cultivos de interesse agrícola sendo o Pérola e o *Smooth Cayenne* (Santos 1995) os principais cultivados no Brasil.

A planta é propagada vegetativamente, podendo-se usar para o plantio mudas de vários tipos. A demanda do material produtivo é muito grande, já que para o plantio de um hectare são necessários de 35.000 a 70.000 mudas, dependendo do espaçamento usado. Por outro lado, a taxa média de produção de mudas por planta é relativamente pequena, variando de 3 a 6 mudas ao final de 18 meses de cultura. Desta forma, um problema sério para os agricultores é a disponibilidade de mudas saudáveis e de boa qualidade (Santos, 1995).

O modo usual e natural de propagação do abacaxizeiro é através de mudas como coroa, filhote e rebentão. A coroa (tufo de folhas no ápice da fruta) proporciona uma plantação homogênea, de florescimento uniforme, mas é pouco utilizada, pois geralmente acompanha a fruta em sua comercialização "in natura". Os filhotes, que são as brotações do pedúnculo, são bastante usados em plantios, por estarem disponíveis em maior quantidade. Os rebentões, que são as brotações do talo, são os tipos de muda mais usados no caso do cv *S. Cayenne*, cuja produção de filhotes é pequena (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

O abacaxi fruto é a parte comercializável da planta, porém, esta porção representa somente 23% do total da planta, enquanto que o restante, formado por caule, folha, casca, coroa e talos é considerado resíduo agrícola e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em perdas econômicas. Para o aproveitamento destes resíduos, sem perdas de qualidade química, é necessário que se faça a colheita e se estabeleçam condições ideais de armazenamento com a temperatura e umidade relativa controladas, permitindo retardar o processo vital do produto, através da redução do seu metabolismo, sem, contudo, alterar a sua fisiologia (CHITARRA & CHITARRA, 1990). A maioria dos produtores rurais não dispõe de tecnologias adequadas de armazenamento, que deve ser feito em atmosfera fresca e ventilada. Desta forma, grande parte destes resíduos agrícolas são perdidos (SANTOS, 1995).

Trabalhos já realizados demonstram que estes resíduos apresentam teores representativos de carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas, que possibilitam a sua utilização industrial como matéria-prima para a obtenção de bromelina, amido, fibras, álcool etílico e ração animais (BALDINI et al, 1993).

B) Características da enzima

A Bromelina (EC 3.4.22.4) é uma enzima proteolítica encontrada no abacaxizeiro e em outras espécies de plantas da família Bromeliaceae. Está presente na fruta e na planta, principalmente no caule. Em 1891, foi estabelecida a existência da bromelina como uma enzima protéica digestiva por MARCANO, químico venezuelano, estudando sua atividade a partir do suco de abacaxi (BALLS et al., 1941). Os estudos envolvendo a produção de bromelina em escala industrial concentram-se na sua obtenção a partir do talo do abacaxizeiro, por este ser um subproduto de sua exploração.

A atividade proteolítica é o principal parâmetro de avaliação da qualidade e do valor comercial da bromelina. O preço no catálogo da Sigma (2000) de um preparado parcialmente purificado é de cerca de US\$450/Kg e o preço da enzima usada industrialmente é em média 20% menor que este (MEINIG, 1999). O valor comercial aumenta à medida que aumenta sua pureza e, conseqüentemente, a sua atividade.

Comparando-a com outras proteases, como a papaína, a bromelina é de mais fácil obtenção e aparece em maiores quantidades, em razão de sua presença na fruta e na planta do abacaxi. Entretanto, a quantidade produzida ainda é pequena em relação às necessidades de mercado, o que a torna um produto de alto valor comercial, que não é produzido no Brasil (PIZA et al, 1997).

A bromelina está incluída na classificação das hidrolases. As proteinases são todas as hidrolases capazes de romper a ligação peptídica, separando proteínas e aminoácidos. A especificidade das proteinases é ampla e classificada de acordo com seu sítio ativo em 3 grupos principais: serina proteinase, ácido aspártico proteinase e cisteína proteinase, sendo que a bromelina se enquadra neste último grupo (SANTOS, 1995).

Segundo ROWAN et al. (1988), existem dois tipos distintos de bromelina do abacaxi, a do talo subterrâneo e a da fruta, que diferem basicamente na seqüência de aminoácidos de sua composição, sendo imunologicamente diferentes, certamente produtos de genes distintos. A bromelina produzida e utilizada industrialmente é uma mistura das duas.

A bromelina do talo tem peso molecular de aproximadamente 28000 daltons; é cerca de 1,5 vezes maior em tamanho quando comparada com a papaína. É uma glicoproteína que tem um oligossacarídeo por molécula o qual é covalentemente ligado à cadeia peptídica. A enzima possui um grupo sulfidril (SH) por molécula que é essencial para a sua atividade catalítica. O aminoácido terminal é um resíduo de valina. A enzima purificada obtida a partir de procedimentos de rotina mostrou 60 a 70% de atividade quando

em testes com a hidrólise de caseína na ausência de ativadores da reação. A especificidade da enzima é considerada ampla, uma vez que hidrolisa vários substratos sintéticos.

A bromelina extraída do suco do abacaxi possui maior atividade proteolítica do que a extraída do talo, aproximadamente metade da proteína presente na fruta é encontrada na principal protease, a bromelina. A bromelina do fruto é uma proteína ácida e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6, com mudanças conformacionais irreversíveis em valores de pH maiores que 10,3 (MURACHI, 1976).

De acordo com MURACHI (1970), a bromelina da fruta tem peso molecular de 31000 dáltons, possui menor concentração de lisina, arginina e histidina e o aminoácido terminal é um resíduo de alanina. Alguns estudos revelaram que a enzima não está presente nos primeiros estádios de maturação da fruta, entretanto, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, quando decresce ligeiramente. A queda marcante na atividade da protease durante o período final da maturação não é acompanhada por uma mudança correspondente na concentração de proteína e parece razoável supor que os aminoácidos componentes da bromelina sejam utilizados para formar outra proteína com função metabólica diferente, como a enzima produtora de sabor e aroma, uma vez que os constituintes voláteis responsáveis pelo aroma são formados quando a atividade da protease está diminuindo. Observa-se neste período, quando os ésteres voláteis estão sendo elaborados, que há o aparecimento de metionina no suco da fruta (BALDINI et al, 1993).

A matéria prima mais empregada para obtenção de bromelina são os talos maduros de abacaxizeiros, utilizando-os após a colheita das frutas, no entanto, podem ser utilizadas também folhas, suco, cascas e resíduos. A bromelina aparece em maior concentração na porção inferior dos talos de plantas maduras. A porção central do talo contém mais proteases do que a porção mais externa (BALDINI et al, 1993). Já HEINICKE & GORTNER (1957) afirmaram que os talos imaturos mais novos e suculentos não possuem ou apresentam baixos teores de bromelina.

Na farmacologia, segundo MEINIG (1999), o primeiro efeito da bromelina relatado foi como digestivo, substituindo a pepsina e a tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. É utilizada também no tratamento de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas, sinusites; devido, principalmente, à sua capacidade de facilitar a coagulação sanguínea, diminuindo os edemas e também por apresentar um efeito antiinflamatório. Faz parte de componentes ativos de fármacos que ativam a circulação sanguínea e respiração, pois suprimem os depósitos protéicos em veias e artérias. Nas terapias contra o câncer, é utilizada no aumento de lises de células cancerosas. Recentemente, tem sido relatado que as proteases extracelulares têm um papel específico regulatório na modulação da resposta imune e também pode agir como

sinalizadoras em processos de mutagêneses (MYNOTT et al, 1999). A bromelina promove o aumento nos níveis de antibióticos quando administrada concomitantemente a eles (WINTER, 1990).

É empregada também nas indústrias de alimentos, no amaciamento de carne, pois degrada suas proteínas conjuntivas, tornando possível seu amaciamento; na produção de biscoitos a partir de farinhas de trigo com alto teor protéico; na produção de ovos desidratados; na preparação de leite de soja e isolados protéicos; nas cervejarias, para clarificação da cerveja, hidrolisando certos complexos proteínas-taninos, formados durante a fermentação (FREIMAN & SRUR, 1999). É ainda empregada no tratamento de couros, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes.

3 Hidrólise enzimática de proteínas

3.1 Importância

A hidrólise de proteínas pode ser catalisada por ácidos, bases, ou enzimas. A hidrólise ácida ou alcalina é totalmente inespecífica; pode destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1985).

Os processos químicos não são facilmente aceitos, principalmente devido à crescente preocupação do consumidor quanto à segurança alimentar. No tratamento enzimático utilizando-se proteases específicas, podem-se citar algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, entre elas: especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, menor conteúdo de sal no hidrolisado final e formação mínima de subprodutos (CHEFTEL et al., 1989; MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995). A hidrólise enzimática, ainda, dá origem a oligopeptídeos que nutricionalmente são superiores e apresentam elevado potencial para o preparo de formulações hipoalergênicas (ANANTHARAMAN & FINOT, 1993). Além disso, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é freqüentemente desnecessária ou mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser utilizados em concentrações maiores (REED, 1975).

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, tais como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL, 1993). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes,

hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando, assim, significativamente, a qualidade e o valor dos produtos *in natura* (CHEFTEL et al., 1989).

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas pelo tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois se sabe que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (VIJAYALAKSHIMI et al., 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando, assim, um maior valor nutritivo (HARA et al., 1984; KEOHANE et al., 1985; SILVESTRE et al., 1994a).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise, o qual parece estar relacionado à liberação de aminoácidos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (ADLER-NISSEN, 1981; MINAGAWA et al., 1989).

4 Importância nutricional dos hidrolisados protéicos

Desde 1940, os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Entretanto, na década de 1970, esta utilização registrou expressivo crescimento, que continua ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CÂNDIDO, 1998).

Os hidrolisados geralmente são destinados a três grandes grupos: (1) formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo; (2) formulações especiais para adultos com função gastrointestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos; e (3) suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (MAHAN et al. 1998; MIRA & MARQUEZ, 2000).

O valor nutricional dos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional e ao método de hidrólise que possibilite a obtenção de peptídeos de pesos moleculares diferentes (GRIMBLE et al., 1986; SILVESTRE et al., 1994a,b).

Vários trabalhos comparam a absorção entre os aminoácidos originados de hidrólise enzimática parcial de proteínas com uma mistura equivalente de aminoácidos

livres. A velocidade de absorção intestinal de aminoácidos é consideravelmente maior para soluções contendo somente di- e tripeptídeos ou proteína parcialmente hidrolisada, do que aquelas constituídas apenas de aminoácidos livres (ADIBI & MORSE, 1971; ADIBI & SOLEIMANPOUR, 1974; KEOHANE et al., 1985). HARA et al. (1984) compararam em ratos a absorção intestinal de aminoácidos de um hidrolisado enzimático de clara de ovo com uma mistura equimolar de aminoácidos livres e observaram que a eficiência de absorção do hidrolisado foi de 70% a 80% superior, apresentando, assim, uma melhor qualidade nutricional. O estudo do mecanismo de absorção intestinal sugere que a taxa de absorção de aminoácidos livres é menor do que aquela dos pequenos peptídeos, porque na absorção de di- e tripeptídeos a competição entre aminoácidos, que compartilham o mesmo sistema de transporte, é parcial ou completamente eliminada (GRIMBLE et al., 1989). A baixa osmolaridade das soluções constituídas, principalmente, por di- e tripeptídeos as tornam melhor toleradas pelos indivíduos com reduzida absorção, em relação às soluções de aminoácidos livres. Para a produção de fórmulas dietéticas, a osmolaridade não deve ultrapassar 300 mOsm/L, ou seja, a osmolaridade ótima fisiológica do plasma sanguíneo (FURST et al., 1990; GONZÁLES-TELLO et al., 1994).

Proteínas e peptídeos de elevado peso molecular freqüentemente causam alergias. Com isso, é crescente o uso de fórmulas preventivas ou terapêuticas contendo hidrolisados parciais de proteína, já que o decréscimo no tamanho dos peptídeos tem relação direta com a diminuição da imunogenicidade (TAKASE et al., 1979). Assim, os hidrolisados de caseína são usados na fabricação de alimentos especiais para recém-nascidos prematuros, em fórmulas para crianças que apresentam diarreia, gastroenterite, mal-absorção e fenilcetonúria (SMITHERS & BRADFORD, 1991).

Outro emprego de hidrolisados protéicos é na complementação alimentar de certas patologias, em que a alimentação por via oral não é possível. Nestas situações, a ingestão de alimentos é insuficiente, estando prejudicadas a digestão e a absorção intestinais, fazendo com que a dieta normal se torne ineficaz ou mesmo inadequada (CUTHBERTSON, 1950).

O tratamento clínico e nutrição enteral de pacientes com desordens específicas de digestão como fibrose cística ou de absorção e metabolização de aminoácidos utiliza proteínas pré-digeridas. Uma mistura de hidrolisados protéicos, além de ser vantajosa do ponto de vista nutricional, é consideravelmente menos onerosa que uma mistura de aminoácidos sintéticos (AUBES-DUFAU et al., 1995). Assim, segundo COGAN et al. (1981), uma outra vantagem relacionada ao uso dos hidrolisados protéicos refere-se à sua produção economicamente mais viável do que as misturas sintéticas de aminoácidos. Entretanto, cabe, ainda, ressaltar a importância clínica da utilização de uma formulação especial de alto valor nutricional e com baixa concentração de Phe para o desenvolvimento neuropsicomotor

normal de pacientes afetados pela PKU, justificando, portanto, todos os custos operacionais necessários à sua produção.

De acordo com GONZÁLES-TELLO (1994), os hidrolisados protéicos, para uso em dietas especiais, devem apresentar as seguintes características: alto teor de di- e tripeptídeos, massa molecular média de 500 Da, para controlar a osmolaridade, e não devem conter peptídeos com massa superior a 1000 Da. Além disso, o valor nutricional dos hidrolisados protéicos depende do seu teor em pequenos peptídeos contendo determinados aminoácidos que na forma livre apresentam problemas com relação à estabilidade e solubilidade. A tirosina e a cistina são pouco solúveis, a glutamina e a cisteína são instáveis em solução e facilmente destruídas durante as etapas de esterilização e armazenamento. Entretanto, sob a forma de di- e tripeptídeos, estes aminoácidos apresentam boa solubilidade e estabilidade, o que mostra a importância do isolamento destes peptídeos de hidrolisados protéicos (FURST et al., 1990; ANANTHARAMAM & FINOT, 1993).

5 Métodos de remoção da fenilalanina

Considerando que a Phe está presente em todas as proteínas de origem animal e vegetal na proporção de 3 a 6% (OUTINEN et al., 1996), vários métodos para remoção deste aminoácido foram desenvolvidos no Japão na década de 1970, visando ao desenvolvimento de formulações especiais com baixa concentração de Phe.

Diversos laboratórios produziram peptídeos com baixos teores de Phe em escala laboratorial ou em projetos piloto. A remoção da Phe pode ser realizada por técnicas e procedimentos diferenciados, como o uso de carvão ativado, da peneira molecular e da cromatografia de troca iônica. A desaminação com a enzima fenilalanina amônia liase também é sugerida. A escolha do procedimento deve sempre considerar a relação custo/eficiência (ARAI et al., 1986; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDIZIAK, 1993).

Os métodos mais usados envolvem uma hidrólise ácida ou enzimática de uma proteína de alto valor biológico, seguida de um tratamento com carvão ativado ou com resina de troca iônica. A reação com plasteína, que consiste na condensação peptídeo-peptídeo, é útil para a remoção do paladar amargo e para a incorporação de tirosina e triptofano parcialmente perdidos durante a hidrólise enzimática (MIRA & MARQUEZ, 2000).

OUTINEN et al. (1996) utilizaram endopeptidases e exopeptidases para promover a hidrólise enzimática e a Phe foi separada da mistura por cromatografia em gel.

LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) relataram que a hidrólise enzimática parece ser a alternativa mais viável para preparar produtos com baixos teores de Phe, tanto pelo

aspecto econômico quanto pelo menor dano aos aminoácidos associados em comparação às hidrólises ácidas ou alcalinas. Estes autores desenvolveram um método para a remoção de Phe de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado e caseinato, utilizando, primeiramente, uma protease produzida pelo *Aspergillus oryzae* e, em seguida, a papaína. O hidrolisado foi tratado com carvão ativado, sendo constatada uma remoção de 92% da Phe. Os autores sugerem a reação de plasteína, assim como a eliminação de Phe pela desaminação com fenilalanina amônia lyase.

DE HOLANDA & VASCONCELOS (1989) desenvolveram um método em que a Phe foi removida de um hidrolisado ácido de caseína com a resina de adsorção XAD-4. Este tratamento reduziu o percentual de Phe na caseína de 3,42% para 1,35%. Entretanto este teor não é suficientemente baixo para ser utilizado por pacientes com PKU.

LOPES et al. (2003a,b), empregando o carvão ativado em bequer, removeram de 96% a 99% de Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado, obtidos pela ação da papaína e de uma protease do *Aspergillus oryzae*. Os métodos, que satisfazem a produção industrial para a remoção de Phe de hidrolisados protéicos, devem ser práticos, de fácil reprodução, ter custo/benefício adequados, apresentar uma reconstituição e utilização viáveis, além de resultarem em produtos palatáveis.

6 Métodos de determinação do teor de fenilalanina

Além da utilização de um analisador de aminoácidos, a dosagem de Phe pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1989), pelo emprego de um sensor enzimático de membrana, "enzyme membrane sensor" (SHIMAMURA et al., 1999) ou por cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica (CARREIRA et al., 2002).

7 Metodologia

7.1 Processamento da amostra

Os frutos do abacaxi coletados na plantação de Presidente Olegário foram encaminhados ao laboratório de Bromatologia do UNIPAM, onde foram lavados e separados em casca, talo e polpa. Em seguida, foram processados no multiprocessador Walita, filtrados em gaze e armazenados a – 18°C .

7.2 Precipitação isoelétrica

A precipitação isoelétrica da Bromelina foi realizada em diferentes pHs utilizando-se os extratos do abacaxizeiro obtidos a partir da polpa, talo e casca. O ajuste do pH foi realizado empregando-se as soluções de ácido láctico, ácido cítrico e hidróxido de sódio, de acordo com as características iniciais dos extratos utilizados. Para cada extrato, promoveu-se a precipitação isoelétrica em 7 valores de pHs, a fim de se determinar o ponto isoelétrico da bromelina presente nas diversas frações do abacaxizeiro. Após o ajuste de pH, utilizando-se o potenciômetro, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com água destilada por 3 vezes consecutivas, centrifugando-se a 5000 rpm, por 15 minutos no total. O precipitado obtido foi armazenado a -18°C, sendo utilizado para determinação da atividade proteolítica da bromelina assim obtida. Este procedimento foi realizado no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob a supervisão da Profa. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre.

7.3 Determinação de proteína (bradford)

O teor de proteína obtido nos 7 diferentes valores de pH's para cada fração foi calculado através do método de Bradford, empregando-se a curva padrão preparada com soroalbumina bovina (BSA).

7.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método descrito por MURACHI (1970) e BALDINI et al (1993) através da hidrólise enzimática da caseína a 1,2% (p/v) pH 6,0 a 35°C por 20 min, seguindo-se a precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5%.

8 Resultados e discussão

Determinação de proteína (BRADFORD): O maior teor de proteína da Polpa foi encontrado no pH 4,6, determinando-se assim o pI da bromelina da polpa do abacaxi; o maior teor de proteína do Talo foi no pH 4,0, determinando-se assim o pI da bromelina do talo do abacaxi; o maior teor de proteína da Casca foi observado no pH 5,0, determinando-se assim o pI da bromelina da casca do abacaxi.

Os resultados da determinação da atividade enzimática não apresentaram diferenças significativas entre o extrato obtido da polpa no pH 4,6, utilizando-se a relação E:S 5% e os resultados para o talo no pH 4,0, seguindo-se a relação E:S de 2%. Sugere-se, assim, o emprego de um extrato bruto enzimático obtido a partir do talo, no pH 4,0, para a produção de hidrolisados protéicos da farinha de trigo. Este seria um efeito positivo, visto que utilizaria resíduo da agroindústria do abacaxi, reduzindo os custos de uma formulação destinada aos fenilcetonúricos.

9 Conclusão

Na preparação de hidrolisados de proteínas da farinha de trigo, o emprego do extrato enzimático de abacaxi obtido apenas do talo contribuirá para a elaboração de formulações dietéticas especiais, de adequado valor nutritivo e baixo custo.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. *In: IDF (Inter. Dairy Fed.) Seminar on Protein & Fat globule modifications.*, p.97-105, 1993.

ACOSTA, P.B. Nutrient intake and grow of infants with phenylketonuria undergoing therapy. *J. Ped. Gastr. Nutr.*, n.27, p.287-291, 1998.

ADACHI, S.; KIMURA, S.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v. 45, p.925 - 932, 1991.

ADIBI, S. A.; MORSE, E.L. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest.*, v.50, p.2266-2275, 1971.

ADIBI, S. A.; SOLEIMANPOUR, M. R. Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. *J. Clin. Invest.*, v.53, p.1368-1374, 1974.

ADLER-NIESSEN, J. Enzymatic hydrolysis of proteins in food. *Bagsvaerd: Novo Nordisk A/S*. 1985.

ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P. A. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. *Food Rev. Int.*, v.9, p.629-655, 1993.

ARAI, S.; MAEDA, A.; MATSUMURA, M.; HIRAO, N.; WATANABE, M. Enlarged sacale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patientes with phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.*, v . 50, 2929 - 2931, 1986.

AUBES-DUFAU, I., SERIS, J-L., COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, p.1982-1988, 1995.

BALDINI, V.L.; IADEROSA, M.; FERREIRA, E.A.; SALES, A .M.; DRAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro. *Colet.Inst.Tecnol.Aliment.*, v.53, p.44-55, 1993.

BALLS, A .K.; THOMPSON, R.R.; KIES, M.W. Bromelain. Properties and comercial production. *Ind. Eng. Chemistry*, v.33, p.950-953, 1941.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. *Química de los alimentos*. 2ed. Zaragoza: Acribia, 1992. 1087p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

CÂNDIDO, L. M. B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. UNICAMP, Campinas, 1998 (Tese de Doutorado).

CARREIRA R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M. P. C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.22, n.3, 229-232, 2002.

CHEFTEL, J-D.; CUQ, J-L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias-bioquímica-propiedades funcionales-valor nutricional-modificaciones químicas*. Acribia, 345p, 1989.

CHITARRA, A .B.; CHITARRA, M.I.F. *Pós-colheita de frutos e hortaliças, fisiologia e manuseio*. Lavras: ESAI/FAEPE, 230p, 1990.

COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. *J. Sci. Food and Agric.*, v.32, p.459-466, 1981.

CUTHBERTSON, D.P. Amino - acids and protein hydrolysates in human and animal nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, v.1, p.35-41, 1950.

DE HOLANDA e VASCONCELOS. *Biothecnology and Bioengineering*, v . 56, p . 1324 - 1329, 1989.

EVANGELISTA, J. *Tecnologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2000, 652p.

FREIMANN, L.O.; SRUR, A .U. O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelina extraídos dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.19 (2), p.170-173, 1999.

FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v.49, p. 343-359, 1990.

GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M.. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biothecnology and Bioengineering*, v. 44, n. 4. p. 529-532, 1994.

GREVE, L. C.; WHEELER, M. D.; GREEN-BURGESSON, D. K.; ZORN, E. M.. Breast-feeding in the management of the newborn with phenylketonuria: A practical approach to dietary therapy. *Journal of the American Dietetic Association* v.94 p.305-309, 1994.

GRIMBLE, G. K. & SILK, D. B. A. Peptides in human nutrition. *Nutr. Research Rev.*, v.2, p.87-108, 1989.

GRIMBLE, G. K.; KEOHANE, P. P.; HIGGINS, B. E.; KAMINSKI Jr., M. V.; SILK, D. B. A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v.71, p.65-9, 1986.

HARA, H.; FUNABIKI, R.; IWATA, M.; YAMAZAKI, K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J. Nutr.*, v.114, p.1122-1129, 1984.

HEINICKE, R.M.; GORTNER, W. A. Stean bromelain: A new protease preparation from pineapple plants. *Economic Botany*, v.11, p.225, 1957.

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

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 como fonte de oligopeptídeos para formulações dietéticas. *Nutrire*, 2003b (No prelo).

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

MAHAN, L. K.; STUMP, S.E. *Krause - Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9. Ed. São Paulo: Roca, 1998.

MANHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem.Soc.*, v.69, p.1163-1169, 1992.

MARTINS, A. M.; FISBERG, R. M.; SCHMIDT, B. J. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica. NESTLÉ, São Paulo, n.54, 1993.

MEINIG, G.E. Bromelain. *Phytomedicine*, v.2, p1-2, 1999.

MILUPA. *Protein substitutes for the dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia*, 1995.

MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, v.54, p.1225-1229, 1989.

MIRA, N. V. M. e MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Revista Saúde Pública*, v. 34 (1), p. 86 - 96, 2000.

MYNOTT, T.L.; LADHAMS, A. ; SCARMATO, P.; ENGWERDA, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *J. Immunology*, v.163, p.2568-75, 1999.

MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hidrolizates of casein depleted in phenilalanine. *Applied Biochemistry and Microbiology* 29 (3), p. 302-306, 1993.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: PERGMANN, GE. & LORAND, L. *Methods in Enzymology*, v.19, p.273-84, New York, Academic Press, 1970.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. *Methods in Enzymology*, v.XLV, p.475-85, New York, Academic Press, 1976.

OUTINEN, M. T.; TOSSAVAINEN, O. ; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenilalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. *Valio Oy, Helsink, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.*

PEARCE, R. J. Food functionaliy ucces or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.50, p.15-23, 1995.

REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London:Academic Press, 573p, 1975.

ROWAN, A .D. ; BUTTLE, D.J.; BARRET, A .J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v.266, n.3, p.869-75, 1990.

SANTOS, S.A .*Efeito do tempo na composição físico-química. Química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro Ananás comosus (L.) merr. CV. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração.* Lavras: ESAL, 1995.47p.(Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos).

SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M.. Peptide mixture and products thereof. *Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.*

SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994b.

SMITHERS, G. W.; BRADFORD, R.S. New casein products: fresh opportunities for the dairy industry., *Food Res. Quart.*, v.51, p.92-98, 1991.

TAKASE, M.; KAWASE, K.; DIYOSOWA, I.; OGASA, K.; SUSUKI, S.; KUROUME, T. Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate. *J. Dairy Sci.* , v.62, p.1570-1576, 1979.

VIJAYALAKSHMI, M. A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v.9, p.3559-3576, 1986.

WINTER, H.L. On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose dependent-effects. *Planta Med.*v.56, 249-253, 1990.