

**AUTORES**  
AUTHORS

**Raquel Linhares CARREIRA**  
Mestre em Ciência de Alimentos

**Harriman Aley MORAIS**  
**Cristiane Márcia da Silva BARBOSA**  
Estudante de mestrado da UFMG

**Silvana da MOTTA**  
Profa. Dra. do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG

✉ **Marialice Pinto Coelho SILVESTRE**  
Profa. Dra. do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG - Av. Olegário Maciel, 2360 CEP 30180-112, Belo Horizonte - MG  
Tel: (031) 3339-7633, FAX: (031) 3339-7666  
e-mail: malice@farmacia.ufmg.br

**RESUMO**

O emprego da associação da pepsina (P) com a tripsina (T) e a subtilisina (S) foi estudado, no intuito de se estabelecer as condições hidrolíticas para a obtenção de hidrolisados de caseína com teores elevados de di- e tripeptídeos, adequados para uso em dietas especiais. O fracionamento dos hidrolisados, de acordo com o tamanho da cadeia dos peptídeos, foi realizado por HPLC de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração. O melhor perfil peptídico foi obtido pela associação das três enzimas (33% de di- e tripeptídeos) em comparação com a de duas (24% de di- e tripeptídeos) mas, nesse caso, o custo da produção em larga escala deve ser avaliado.

**SUMMARY**

In order to establish the hydrolytic conditions for obtaining casein hydrolysates with high di- and tripeptide contents for dietary purposes, the use of an association of pepsin (P) with trypsin (T) and subtilisin (S) was studied. Size-exclusion HPLC was used to fractionate the casein hydrolysates, according to the peptide chain length, and the rapid Corrected Fraction Area method used to quantify the peptides. The best peptide profile was obtained by the association of the three enzymes (33% of di- and tripeptides) as compared to that using only two enzymes (24% of di- and tripeptides). However an economic analysis is necessary for large scale production.

**PALAVRAS-CHAVE**  
KEY WORDS

Hidrólise enzimática; Caseína; Peptídeos; Pepsina; Tripsina; Subtilisina / Enzymatic hydrolysis; Casein; Peptides; Pepsin; Trypsin; Subtilisin.

## 1. INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática de proteínas tem sido utilizada com diversas finalidades, destacando-se a obtenção de preparações ricas em di- e tripeptídeos, possuindo maior valor nutricional do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres (HARA *et al.*, 1984, KEOHANE *et al.*, 1985, GRIMBLE *et al.*, 1986).

Em alguns trabalhos, é relatado o emprego de enzimas proteolíticas diversas, assim como são citadas fontes protéicas variadas, visando ao preparo de hidrolisados com elevado teor de oligopeptídeos (LOOSEN *et al.*, 1991, CHATAUD *et al.*, 1992, GONZÁLEZ-TELLO *et al.*, 1994).

A avaliação dos teores de peptídeos em hidrolisados protéicos envolve, inicialmente, o fracionamento das amostras. Neste sentido, várias técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, mas apresentam inúmeros inconvenientes, tais como interações secundárias entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (KOPACIEWICZ, REGNIER, 1982, LEMIEUX, AMIOT, 1989, VERNEUIL *et al.*, 1990, LEMIEUX *et al.*, 1991, DAVIS, LEE, 1992, GOLOVCHENKO *et al.*, 1992).

Nosso grupo tem se dedicado a este tema, tendo desenvolvido alguns trabalhos empregando a caseína bovina, como proteína de origem, e testando a ação de diferentes enzimas e condições hidrolíticas (CARREIRA *et al.*, 2001, MORATO *et al.*, 2000, SILVESTRE *et al.*, 1994a, b). O método de análise de hidrolisados protéicos empregado nestes estudos mostrou ser eficiente no fracionamento de peptídeos com massa molecular inferior a 1000 Da.

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da associação sucessiva da pepsina com duas outras enzimas

na obtenção de di- e tripeptídeos a partir da caseína. Num primeiro momento, adicionou-se apenas a tripsina e, posteriormente, incorporou-se também a subtilisina.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

A caseína bovina (C7078) e as enzimas tripsina de pâncreas bovino (tipo XIII, tratada com TPCK), pepsina suína (P6887), subtilisina carlsberg (P-5380, tipo VIII do *Bacillus licheniformis*) foram adquiridas da Sigma (St.Louis, MO). O ácido clorídrico e o fórmico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Preparo dos hidrolisados de caseína

Foram preparados nove hidrolisados de caseína bovina. No intuito de promover a desnaturação protéica, as soluções de caseína a 0,25g% em tampão fosfato 0,01M (pH 1,9 e 7,5) foram, inicialmente, pré-aquecidas em banho-maria a 90°C por 30min. Posteriormente, a temperatura foi ajustada para cada caso e as enzimas (pepsina, tripsina e subtilisina) foram adicionadas numa dada concentração, de maneira a obter a E:S (% p/p) desejada. O tempo total de reação foi de 5h, com exceção de H1 e H4, para os quais a hidrólise teve uma duração de 3h. Os outros parâmetros das reações estão apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1.** Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados de caseína.

	Uso da pepsina (P)		Temp. (°C)	pH			E:S		
	Associada com a tripsina (T)	Associada com a tripsina (T) e subtilisina (S)		P	T	S	P	T	S
H1	P (1h) + T (2h)		37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H2	P (2h) + T (3h)		37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H3	P (3h) + T (2h)		37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H4	T (2h) + P (1h)		37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H5	T (3h) + P (2h)		37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H6	T (2h) + P (3h)		37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H7		T (1h) + P (1h) + S (3h)	37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H8		T (1h) + S (3h) + P (1h)	37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4
H9		S (3h) + T (1h) + P(1h)	37	1,9	7,5	7,5	4	3,3	4

E: S = relação enzima substrato

### 2.2.2 Fracionamento e quantificação dos hidrolisados de caseína

O fracionamento dos hidrolisados foi realizado por SE-HPLC em coluna PHEA, como descrito por SILVESTRE *et al.* (1994b). O sistema de HPLC consistiu de uma bomba isocrática (série HP1100), um detector espectrofotométrico em UV-VIS, acoplado a um computador com software HPChemstation (HP1100, Germany) e um coletor de frações (Pharmacia-Frac 100, EUA). Foi utilizada a coluna cromatográfica Poli-(2-hidroxiethylaspartamida)-sílica (PHEA) 250 X 9,4mm, 5µm e 200 Å (PolyIC, Columbia, MD).

As amostras foram dissolvidas a uma concentração de 1% em solução de ácido fórmico 0,05M (pH próximo a 2,5) e cromatografadas à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5mL/min, durante 35min. A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45µM, e sonicada imediatamente antes do uso. A detecção dos picos cromatográficos foi efetuada em três comprimentos de onda: 230, 280 e 300nm. As amostras foram analisadas em triplicatas e as frações foram separadas, de acordo com o tempo de retenção, sendo F1, de 13,7 a 18,2min; F2, de 18,2 a 21,7min; F3, de 21,7 a 22,7min; e F4, de 22,7 a 35min.

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF) foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados de caseína (SILVESTRE *et al.*, 1994a). As amostras foram fracionadas e os valores da ACF calculados, de acordo com a curva-padrão estabelecida por MORATO *et al.* (2000).

### 2.2.3 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para a determinação das diferenças entre as médias do conteúdo de aminoácidos das frações cromatográficas dos hidrolisados de caseína foram feitos a Análise Fatorial e o Teste de Duncan (PIMENTEL-GOMES, 1990).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

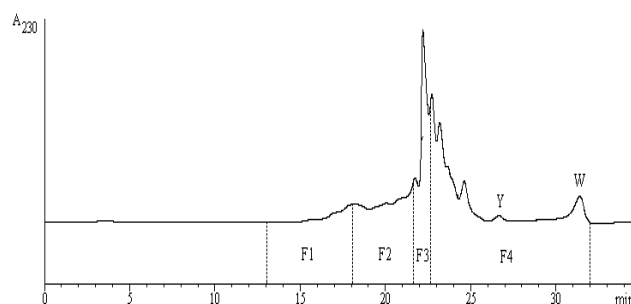
### 3.1 Caracterização dos hidrolisados de caseína

#### 3.1.1 Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão molecular (SE-HPLC)

O perfil cromatográfico do hidrolisado H9, a 230nm está apresentado na Figura 1, conforme descrito anteriormente (SILVESTRE *et al.*, 1994a, MORATO *et al.*, 2000, CARREIRA *et al.*, 2001).

Os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações. A fração 1 corresponde aos peptídeos contendo mais que 7 resíduos de aminoácidos; a fração 2 de 4 a 7 resíduos; a fração 3, de 2 a 3 resíduos e a fração 4 contendo os aminoácidos livres. Os últimos dois picos na fração 4 correspondem à tirosina (pico Y) e triptofano (pico W). Assim sendo, a técnica de SE-HPLC, empregada no presente trabalho, mostrou ser eficiente

na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente nos casos em que o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos de baixa massa molecular, ou seja, inferior a 1000 Da. Por outro lado, os demais métodos, que têm sido utilizados no fracionamento de hidrolisados protéicos, apresentam inúmeros inconvenientes, dificultando ou impossibilitando a separação de peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia (CARREIRA *et al.*, 2001).



**FIGURA 1.** Perfil cromatográfico do hidrolisado H9 a 230nm. F1: peptídeos grandes (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres; Y = tirosina; W = triptofano.

### 3.1.2 Distribuição de tirosina e triptofano nas frações cromatográficas

Levando-se em conta as vantagens, do ponto de vista nutricional, da presença de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) na forma de di- e tripeptídeos (CARREIRA *et al.*, 2001) estimou-se a distribuição destes dois aminoácidos nas frações cromatográficas (Tabela 2). Observa-se que o hidrolisado H4 foi o mais vantajoso, apresentando os maiores teores de Tyr e Trp na fração F3, seguido de H3, cujo resultado para a Tyr não diferenciou significativamente de H4.

### 3.2 Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos

#### 3.2.1 Associação de duas enzimas: pepsina com a tripsina

##### 3.2.1.1 Efeito da ordem de ação das enzimas

Neste estudo, compararam-se os hidrolisados H1 (P1h+T2h) com H4 (T2h+P1h), H2 (P2h+T3h) com H5 (T3h+P2h) e H3 (P3h+T2h) com H6 (T2h+P3h), onde inverteu-se apenas a ordem das enzimas e o tempo foi mantido constante entre os grupos. Como mostrado na Figura 2, a ordem de adição das enzimas interferiu no perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos por meio da ação sucessiva da pepsina e da tripsina. Entre as três condições estudadas, duas delas (H1 com H4 e H2 com H5) mostraram que a melhor distribuição de peptídeos foi obtida quando a pepsina atuou

após a tripsina, uma vez que obteve-se uma redução do teor de grandes peptídeos e uma elevação no teor de di- e tripeptídeos. Por outro lado, observou-se um aumento no teor de aminoácidos livres. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a tripsina, apresentando estreita especificidade de ação, quebraria a molécula de caseína em grandes peptídeos que seriam, posteriormente, quebrados em cadeias menores. Na comparação de H3 com H6, a ação da pepsina em segundo lugar apesar de ter provocado uma redução do teor de grandes peptídeos, não alterou o de di- e tripeptídeos e, ainda, elevou o de aminoácidos livres.

Em relação à distribuição dos aminoácidos aromáticos apresentados na Tabela 2, observa-se que quando a ação da pepsina sucedeu à da tripsina, obtiveram-se maiores teores destes aminoácidos na fração F3 apenas para os dois primeiros casos estudados (H1 com H4 e H2 com H5).

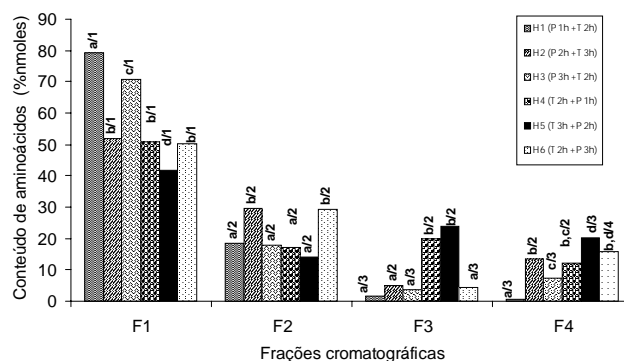
### 3.2.1.2 Efeito do tempo de ação das enzimas

O efeito do tempo de ação das enzimas na hidrólise da caseína está apresentado na Figura 2. Quando a pepsina foi adicionada antes da tripsina, o aumento no tempo de ação da primeira enzima de 1h (H1) para 2h (H2) provocou uma redução nos teores de grandes peptídeos (de 79% para 52%) e uma elevação nos teores de médios peptídeos (de 18% para 30%) e aminoácidos livres (de 1% para 13%). Não houve diferenças em relação aos níveis de di- e tripeptídeos. Aumentando-se o tempo de ação da pepsina de 2h (H2) para 3h (H3), observou-se um aumento nos teores de grandes peptídeos (F1: 51% para 71%) e uma diminuição no conteúdo de médios peptídeos (F2: 30% para 18%) e de aminoácidos livres (F4: 13% para 7%). Em relação aos teores de di- e tripeptídeos (F3), não houve variação entre estes dois hidrolisados.

**TABELA 2.** Distribuição de tirosina e triptofano nas frações cromatográficas dos hidrolisados de caseína.

Hidrolisados	Aminoácidos	Frações cromatográficas*			
		F1	F2	F3	F4
H1	Tyr	25,26	51,92	15,33	7,49
	Trp	9,84	33,81	27,57	28,78
H2	Tyr	8,01	15,39	57,81	18,79
	Trp	15,47	15,24	48,70	20,58
H3	Tyr	11,19	9,91	77,39	1,51
	Trp	9,45	3,84	52,87	33,84
H4	Tyr	2,30	17,75	78,10	1,87
	Trp	11,52	4,82	64,13	19,53
H5	Tyr	9,54	0,89	65,17	24,39
	Trp	11,22	5,18	59,24	24,36
H6	Tyr	5,47	1,48	36,00	57,06
	Trp	16,39	25,96	22,06	35,59
H7	Tyr	24,6	32,6	36,90	5,92
	Trp	5,32	7,68	11,22	78,22
H8	Tyr	12,35	19,88	25,61	42,16
	Trp	72,37	2,40	7,58	17,6
H9	Tyr	16,50	19,27	33,07	31,16
	Trp	5,36	29	5,12	60,52

\* Os valores representam a média das triplicatas. F1: peptídeos grandes (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os dados referem-se à porcentagem da área total das quatro frações, medida a 230nm.



**FIGURA 2.** Efeito da ordem de ação das enzimas no tamanho dos peptídeos resultantes em hidrolisados de caseína. P = pepsina; T = tripsina. F1: peptídeos grandes (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Letras iguais em colunas diferentes indicam que não houve diferença estatística entre os hidrolisados e os números, entre as frações para o mesmo hidrolisado, sendo  $p \leq 0,05$ .

Pode-se concluir que, nestes casos, o aumento do tempo de ação da pepsina não favoreceu o perfil peptídico, do ponto de vista nutricional.

Em relação à distribuição de aminoácidos aromáticos, o aumento no tempo de ação da primeira enzima de 1h (H1) para 2h (H2), como também de 2h (H2) para 3h (H3), foi benéfico, pois elevou os teores de tirosina e triptofano na fração F3 (Tabela 2).

Nas outras condições estudadas, nas quais a pepsina foi a segunda enzima a atuar, o aumento em 1h (de 1h para 2h) no tempo de ação da segunda enzima (H4 e H5), não apresentou qualquer vantagem no perfil cromatográfico do ponto de vista nutricional, uma vez que promoveu uma redução no teor de grandes peptídeos (F1: 51% em H4 para 42% em H5) e uma elevação de aminoácidos livres (F4: 12% em H4 para 20% em H5). Além disso, esta variação no tempo de reação não alterou significativamente o conteúdo de médios e di- e tripeptídeos. Por outro lado, observou-se um efeito negativo no valor nutricional do hidrolisado com o aumento do tempo de ação da pepsina de 2h (H5) para 3h (H6), principalmente por ter ocasionado uma redução importante no teor de di- e tripeptídeos (de 24% em H5 para 5% em H6). O mesmo efeito foi observado por MORATO *et al.* (2000), quando a subtilisina atuou após a tripsina e aumentou-se o seu tempo de ação. Em relação à distribuição de tirosina e triptofano na fração F3, pode ser visto na Tabela 2 que o acréscimo em 1h no tempo de ação da pepsina foi prejudicial, pois reduziu os teores dos dois aminoácidos aromáticos.

Considerando-se os diversos fatores citados por GONZÁLEZ-TELLO *et al.* (1994), que devem ser avaliados em um hidrolisado protéico para uso em dietas especiais, pode-se concluir que o melhor resultado foi obtido para o hidrolisado H5, no qual a pepsina atuou após a tripsina

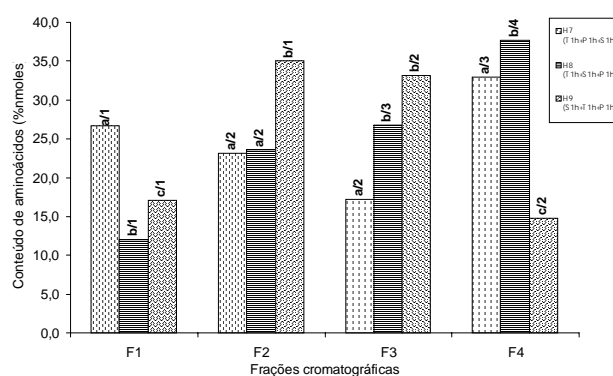
(tripsina 3h + pepsina 2h), uma vez que apresentou um maior conteúdo de di- e tripeptídeos (24%); maior teor de peptídeos com massa molecular média de 500Da (38%) e a menor porcentagem de peptídeos com massa molecular maior que 800 Da (42%). Ao contrário dos resultados aqui apresentados, MORATO *et al.* (2000) concluíram que a melhor associação enzimática foi obtida quando a subtilisina atuou como a primeira enzima (subtilisina 5 min + tripsina 4h55min).

Outros autores também empregaram a associação enzimática no intuito de obter hidrolisados protéicos ricos em di- e tripeptídeos. Assim, FREITAS *et al.* (1993), empregando simultaneamente a tripsina com quimiotripsina e pancreatina na hidrólise da caseína, obtiveram 20% de grandes peptídeos (10-40 resíduos de aminoácidos); 62% de pequenos peptídeos (2-9 resíduos de aminoácidos) e 18% de aminoácidos livres. LOOSEN *et al.* (1991) prepararam hidrolisados de caseína contendo 75% de di- e tripeptídeos, utilizando em associação, três enzimas bacterianas. Este valor foi maior que o obtido por MORATO *et al.* (2000) que, utilizando apenas uma enzima bacteriana, produziu um hidrolisado de caseína contendo 36% de di- e tripeptídeos.

### 3.2.2 Associação de três enzimas: pepsina, tripsina e subtilisina

Como mostrado na Figura 3, a ordem de adição das enzimas influenciou o perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos através da ação sucessiva da pepsina, tripsina e subtilisina. A ação da pepsina entre as duas outras enzimas (H7) foi desvantajosa, pois elevou os teores de grandes peptídeos e reduziu o conteúdo de di- e tripeptídeos, quando comparado aos outros hidrolisados. Quando a pepsina foi a última enzima a atuar (H8 e H9), a ordem de adição da tripsina e subtilisina influenciou o perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos. Entre as duas condições estudadas, a melhor distribuição de peptídeos foi obtida quando a tripsina atuou em segundo lugar (H9), com 33% de di- e tripeptídeos e menor teor de aminoácidos livres (15%). Em H8, a ação sucessiva de duas enzimas de ampla especificidade (subtilisina e pepsina), possivelmente potencializou a taxa de clivagem da molécula protéica reduzindo, dessa forma, o teor de grandes peptídeos mas, por outro lado, contribuiu para elevar a quantidade de aminoácidos livres. Já, no melhor hidrolisado desta associação enzimática (H9), a ação inespecífica da tripsina pode ter reduzido o sinergismo de atuação das outras duas enzimas, uma vez que agiu entre elas, produzindo maior teor de grandes peptídeos e menor de aminoácidos livres.

Em relação à distribuição dos aminoácidos aromáticos (Tabela 2), uma comparação entre os três hidrolisados mostra que os teores mais elevados de tirosina e triptofano na forma de di- e tripeptídeos foram obtidos quando a pepsina atuou entre as duas enzimas (H7). Nos casos em que a pepsina atuou por último, obteve-se um teor mais elevado de tirosina no hidrolisado H9 (33%), caracterizado pela ação da subtilisina antecedendo à da tripsina, enquanto um maior conteúdo de triptofano na fração F3 (8%) foi observado quando a subtilisina atuou após a tripsina (H8).



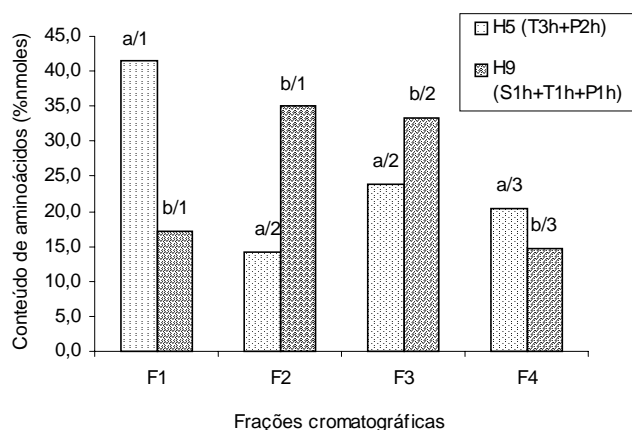
**FIGURA 3.** Associação das três enzimas. P = pepsina; T = tripsina; S = subtilisina. F1: peptídeos grandes (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Letras iguais em colunas diferentes indicam que não houve diferença estatística entre os hidrolisados e os números, entre as frações para o mesmo hidrolisado, sendo  $p \leq 0,05$ .

De acordo com GONZÁLEZ-TELLO *et al.* (1994), dentre os hidrolisados preparados pela tripla ação enzimática, o H9 (S3h+T1h+P1h) apresentou as melhores características para ser utilizado em dietas especiais, ou seja, maior teor de di- e tripeptídeos (F3) e peptídeos com massa molecular média de 500Da (F2+F3), reduzida porcentagem de peptídeos com massa molecular maior que 800Da (F1), bem como o nível mais baixo de aminoácidos livres. A ação inespecífica e restrita da tripsina intercalada por duas enzimas de ampla especificidade de ação (subtilisina e pepsina) favoreceu a obtenção de um hidrolisado protéico de elevado valor nutricional.

### 3.2.3 Comparação entre as duas associações enzimáticas

Comparando-se os melhores resultados obtidos para a associação de duas (H5) com a de três enzimas (H9), observa-se (Figura 4) a superioridade do último tratamento. O aumento do teor de di- e tripeptídeos promovido pela associação das três enzimas pode ser devido ao sinergismo de ação enzimática, ou ao emprego da enzima microbiana subtilisina. MORATO *et al.* (2000) observaram que o hidrolisado obtido pela ação isolada da subtilisina do *Bacillus licheniformis* apresentou melhor perfil peptídico em relação ao teor de di- e tripeptídeos, se comparado ao hidrolisado obtido através da associação enzimática com a tripsina. Deve-se, entretanto, ressaltar que, do ponto de vista industrial, o hidrolisado H9 apresenta um custo mais elevado de produção.

Em relação à distribuição de tirosina e triptofano (Tabela 2), a associação de duas enzimas (H5) foi mais vantajosa, uma vez que produziu os índices mais elevados destes aminoácidos na forma de di- e tripeptídeos.



**FIGURA 4.** Efeito das associações enzimáticas no tamanho dos peptídeos resultantes em hidrolisados de caseína. P = pepsina; T = tripsina; S = subtilisina. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Letras iguais em colunas diferentes indicam que não houve diferença estatística entre os hidrolisados e os números, entre as frações para o mesmo hidrolisado, sendo  $p \leq 0,05$ .

#### 4. CONCLUSÃO

O estudo de várias associações enzimáticas da pepsina com a tripsina e a subtilisina mostrou que, do ponto de vista nutricional, o emprego das três enzimas é vantajoso, com exceção da distribuição de Tyr e Trp na forma de di- e tripeptídeos. Entretanto, o custo envolvido na preparação deste hidrolisado de caseína deve ser avaliado, no caso da produção em larga escala.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapemig e ao CNPq pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARREIRA, R.L., MORAIS, H.A., ORNELLAS, C.B.D., MOTTA, S., JUNQUEIRA, R.G., SILVESTRE, M. P.C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. *Rev. Bras. Ciências Farm.* (submetido para publicação).

CHATAUD, J., DESREUMEUX, S., CARTWRIGHT, T., Procédé de fabrication d'un hydrolysat Oenzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988.

DAVIS, M, LEE, T.D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: a practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci.*, **1**:935-944, 1992.

FREITAS, O., PADOVAN, G.J., VILELA, L., SANTOS, J.E., DUTRA DE OLIVEIRA, J.E., GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, **41**(8):432-1438, 1993.

GOLOVCHENKO, N., KATAEVA, I.A., AKIMENKO, V.K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, **591**(4):121-128, 1992.

GONZÁLEZ-TELLO, P., CAMACHO, F., JURADO, E., PAÉZ, M.P., GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotech. Bioeng.*, **44**(4):529-32, 1994.

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 lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, **71**(1):65-9, 1986.

HARA, H., FUNABIKI, R., IWATA, M., YAMAZAKI, K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J. Nutr.*, **114**(3):1122-1129, 1984.

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.*, **26**(4):907-913, 1985.

KOPACIEWICZ, W., REGNIER, F.E. Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: effects of pH at low ionic strength. *Anal. Biochem.*, **126**(13):8-16, 1982.

LEMIEUX, L., AMIOT, J. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, **73**(1):189-206, 1989.

LEMIEUX, L., PIOT, J.M., GUILLOCHON, D., AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J.Chromatogr.*, **32**(3):499-504, 1991.

LOOSEN, P.C., BRESSPOLLIER, P.R., JULIEEN, A.R., PEJOAN, C.H., VERNEUIL, B. **Procède pour preparer un hydrolysat enzymatique.** Tessenderlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessenderlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.

MORATO, A.F., CARREIRA, R.L., JUNQUEIRA, R.G., SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, **13**(3):101-117, 2000.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental.** 13. Ed. Piracicaba: Nobel, 1990, 467p.

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**(12):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**(12):2783-2789, 1994b.

VERNEUIL, B., BRESSOLIER, P.H., JULIEN, R. Quantification of amino acids, and di- and tripeptides in nutritional interest protein hydrolysates by ligand exchange chromatography in combination with Edman degradation. **4<sup>th</sup> Symposium on purification technologies**, 1990, p.253-258.