



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



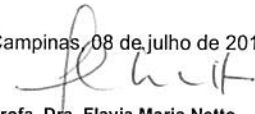
**EFEITO DA HIDRÓLISE PRÉ E PÓS POLIMERIZAÇÃO
CATALISADA PELA TRANSGLUTAMINASE NA ANTIGENICIDADE
DA β -LACTOGLOBULINA**

Isabele Serimarco Sabadin
Nutricionista

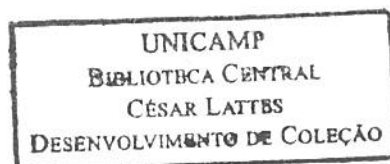
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por **Isabele Serimarco Sabadin** aprovado pela Comissão Julgadora em 08 de julho de 2010.

Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Netto
Orientadora

Campinas, 08 de julho de 2010.

Prof.^a Dra. Flavia Maria Netto
Presidente da Banca

Campinas, 2010



Isabele Serimarco Sabadin

**EFEITO DA HIDRÓLISE PRÉ E PÓS POLIMERIZAÇÃO
CATALISADA PELA TRANSGLUTAMINASE NA ANTIGENICIDADE
DA β -LACTOGLOBULINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Netto
Orientadora

Campinas, 2010

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Flavia Maria Netto
(Orientadora) - DEPAN/FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
(Membro) - FCM/UNICAMP



Prof.ª Dr.ª Mirna Lúcia Gigante
(Membro) - DTA/FEA/UNICAMP

Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Bertoldo Pacheco
(Membro) – ITAL

Prof.ª Dr.ª Adriane Elisabete Costa Antunes de Moraes
(Membro) – FCA/UNICAMP

Campinas, de de 2010.

362670708

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

Dedico

Aos meus amados pais Umberto e Sonia

*Pela minha vida, pois sem eles eu não estaria aqui.
Pelo amor incondicional, educação e preocupação
estando sempre presentes em todos os momentos de
minha vida, me ajudando no que fosse necessário.*

Ao Rodrigo

*Namorado e melhor amigo. Pelo amor e
companheirismo. Pela caminhada até a finalização
deste trabalho e sempre. Obrigada por existir em
minha vida e estar sempre ao meu lado!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, pela minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Netto, pela orientação, confiança e experiência adquirida no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela colaboração, e pela gentileza em permitir a utilização de equipamentos e materiais do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE).

Aos demais professores presentes na banca: Prof.^a Dr.^a Mirna Lúcia Gigante, Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Bertoldo Pacheco e Prof.^a Dr.^a Adriane Elisabete Costa Antunes de Moraes pelas valiosas sugestões para a composição final deste trabalho.

À toda minha família, meu alicerce, com quem encontro sempre nos momentos de paz. Aos meus pais Umberto e Sonia. Ao meu irmão Thiago. Obrigada por estarem em minha vida!

À minha segunda família Bernadete, Adalberto, Gislaine e Guilherme, que sempre me apoiaram, principalmente nos momentos em que estive em Campinas.

Ao Rodrigo, namorado e melhor amigo! Por todo o apoio durante a construção desse trabalho, dando idéias e me ajudando no que fosse preciso. Obrigada por existir em minha vida e estar sempre ao meu lado em todos os momentos!

À grande amiga que ganhei Mariana (Mari), companheira de laboratório, de projetos, e de todas as horas. Obrigada por todo o apoio e amizade sempre, pelas risadas e por toda a troca de experiências, tanto nos momentos de trabalho quanto de lazer!

Às queridas companheiras do LBN Eliana e Bete, obrigada por todo o apoio sempre que precisei, pelas conversas e risadas. Foi muito bom ter a companhia de vocês durante o trabalho!

Às companheiras de laboratório Mariana, Camila, Milena, Fernanda e Célia, pela troca de experiências e momentos de descontração vividos.

À ex companheira de laboratório e ex colega de república Michele, pelo apoio no início e por todas as experiências vividas ao longo desse tempo, dentro e fora do trabalho.

Aos amigos do LIAE Conceição, Meg, Karla, Giovanna, Luiz e Camila pela ajuda enquanto estive no laboratório e por terem me recebido tão bem!

Às amigas de longa data Nádia e Fernanda de Piracicaba, pelos momentos de descontração.

Às mais recentes amigas que conquistei Aline, Carol Pazzinato. Sempre presentes desde caminhadas até viagens!

As companheiras de almoço no DEPAN, Andrea, Carol pelas conversas sobre praticamente tudo e pelas risadas!

Ao Chico pelo suporte no laboratório e paciência e principalmente pelos momentos de descontração.

À todos os professores, amigos e funcionários do DEPAN, que de certa forma ajudaram na construção desse trabalho.

À AJINOMOTO, pela gentileza no fornecimento da enzima transglutaminase, para desenvolvimento do trabalho.

À DAVISCO, pela gentileza no fornecimento da proteína β -Lactoglobulina, para desenvolvimento do trabalho.

À PROZYN, pela gentileza no fornecimento da enzima bromelina, para desenvolvimento do trabalho.

À NOVOZYMES, pela gentileza no fornecimento das enzimas Alcalase e Neutrase, para desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) pela bolsa de estudo concedida.

À FAPESP, pela concessão de auxílio pesquisa para desenvolvimento deste projeto.

Aos meus animais de estimação, que sempre me proporcionaram momentos de alegria e descontração.

RESUMO

A β -Lactoglobulina (β -Lg) é uma das proteínas mais antigênicas presentes no leite bovino. Tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos podem alterar a antigenicidade desta proteína. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos tratamentos combinados de hidrólise, por diferentes proteases, e polimerização, catalisada pela transglutaminase (TG), realizada pós ou pré hidrólise, na atividade antigênica da β -Lg. Para a hidrólise da β -Lg foram utilizadas, separadamente, as enzimas Alcalase, Neutrase e bromelina, utilizando 3% β -Lg e 25 U enzima g⁻¹, conforme estabelecido por experimento fatorial 2². Os hidrolisados obtidos foram incubados com TG (7% substrato e 10 ou 25 U TG g⁻¹). Para obtenção dos polimerizados, a β -Lg nativa (β -Lg N) (7%) foi incubada com a TG (10 U g⁻¹) após tratamento térmico (80°C/ 60 min) (β -Lg TT TG) ou na presença de agente redutor Cys (0,1 mol L⁻¹) (β -Lg Cys TG) que foram posteriormente hidrolisados com as três enzimas, nas condições definidas anteriormente. A reação de hidrólise foi acompanhada pelo método pH-stat. As amostras foram caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE/tricina e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR). O grau de hidrólise (GH) das amostras polimerizadas pós hidrólise foi avaliado também pelo método de trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto à antigenicidade, por Imunoblote, quanto à resposta de IgE específica anti- β -Lg, utilizando *pool* de soro de camundongos BALB/c sensibilizados. Os hidrolisados obtidos com Alcalase apresentaram 12,6% e com Neutrase e bromelina aproximadamente 4% de GH. A polimerização pós hidrólise, avaliada por eletroforese e cromatografia, não resultou em aumento da massa molecular (MM). No entanto, as amostras apresentaram menor GH (determinado pelo método de TNBS) do que antes da reação com a TG, sugerindo que houve polimerização. Os perfis eletroforéticos da β -Lg polimerizada, β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG, apresentaram bandas de MM alta, sugerindo a formação de produtos polimerizados de diferentes MM. A Alcalase foi a enzima que hidrolisou mais eficientemente tanto a β -Lg como seus polímeros. Os hidrolisados com Neutrase, pré e pós polimerização, apresentaram β -Lg residual, observada no perfil eletroforético e no cromatograma, assim como os hidrolisados pela bromelina, porém, com maior intensidade. A análise por Imunoblote mostrou que os hidrolisados com Alcalase obtidos tanto pré como pós polimerização não reagiram com o soro anti- β -Lg, assim como os hidrolisados por bromelina pré polimerização. Hidrolisados da β -Lg com Neutrase apresentaram reação apenas na região correspondente ao monômero da β -Lg, porém esta banda ficou menos intensa após a polimerização com TG. Para os hidrolisados com Neutrase pós polimerização houve marcação na fração com MM >26 kDa, mais intensa no hidrolisado da β -Lg Cys TG. O hidrolisado da β -Lg Cys TG com bromelina não reagiu com o soro, porém com o hidrolisado da β -Lg TT TG houve reação com o soro anti- β -Lg ao longo de toda a membrana. O processo de hidrólise na redução da antigenicidade mostrou-se um método efetivo independente do uso da polimerização.

Palavras chave: Proteínas do soro do leite, peptídeos, proteases, alergia alimentar.

ABSTRACT

The β -Lactoglobulin (β -Lg) is one of the most antigenic proteins present in bovine milk. Physical, chemical or enzymatic treatments may alter the antigenicity of this protein. The present study aimed to evaluate the effect of combined treatments of hydrolysis and polymerization reactions catalyzed by transglutaminase (TG), realized post or pre hydrolysis on the antigenic activity of β -Lg. For the β -Lg hydrolysis were used separately the enzymes Alcalase, Neutrase or bromelain, using 3% β -Lg and 25 U enzyme g⁻¹, as required by 2² factorial experiment. The hydrolysates were incubated with TG (7% substrate and 10 U TG g⁻¹). To obtain the polymerized protein, the native β -Lg (β -Lg N) was incubated with TG (10 U g⁻¹) after heat treatment (80°C/ 60 min) (β -Lg HT TG) or in the presence of the reducing agent Cys (0.1 mol L⁻¹) (β -Lg Cys TG) and subsequently was hydrolyzed with one of the three enzymes under the conditions previously set. The hydrolysis reaction was monitored by pH-stat method. The samples were characterized by electrophoresis SDS-PAGE/tricine and high performance liquid chromatography reverse phase (RP-HPLC). The degree of hydrolysis (DH) of the hydrolyzed and polymerized post hydrolysis samples was also evaluated by the trinitrobenzene sulfonic method (TNBS). Subsequently, the samples antigenicity was tested by immunoblotting, in relation to the specific IgE response, using sera pool from BALB/c mice sensitized with β -Lg N. The hydrolysates obtained with Alcalase showed 12.6% and with Neutrase and bromelain, approximately 4% of DH. The polymerization post hydrolysis, analyzed by electrophoresis and chromatography, resulted in no increase in molecular mass (MM). However, the samples showed lower DH (determined by TNBS method) than before the reaction with TG, suggesting that polymerization occurred. Electrophoretic profiles of polymerized β -Lg, β -Lg HT TG and β -Lg Cys TG showed higher MM bands, suggesting the formation of polymerized products of different MM. Alcalase was the most efficient enzyme to hydrolyze β -Lg and its polymers. The hydrolysates with Neutrase pre and post polymerization showed residual β -Lg, observed in the electrophoretic profile and in the chromatogram, as well as the hydrolyzed by bromelain, but with greater intensity. Analysis by immunoblotting showed that the hydrolysates obtained with Alcalase both pre and post polymerization did not react with the anti- β -Lg sera, as well as the hydrolyzed by bromelain pre polymerization. β -Lg hydrolysates with Neutrase reacted only in the region corresponding to the monomer of β -Lg, but this band was less intense after polymerization with TG. The hydrolysates with Neutrase post polymerization was marked in the fraction with MM >26 kDa, more intense in the hydrolysates of β -Lg Cys TG. With bromelain, the hydrolysates of β -Lg Cys TG did not react with the sera, but with the hydrolysates of β -Lg HT TG reacted with the anti- β -Lg sera throughout the membrane. The hydrolysis process was shown to be an effective method in the reduction of antigenicity, independent of the use of polymerization.

Key Words: Whey protein, peptides, proteases, food allergy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -La	Alfa-Lactoalbumina
Alúmen	3% Hidróxido de alumínio
β -Lg	Beta-lactoglobulina
β -Lg N	Beta-lactoglobulina nativa
β -Lg Alcalase	3% de beta-lactoglobulina hidrolisada com 25 U de Alcalase g ⁻¹ de substrato
β -Lg bromelina	3% de beta-lactoglobulina hidrolisada com 25 U de bromelina g ⁻¹ de substrato
β -Lg Neutrase	3% de beta-lactoglobulina hidrolisada com 25 U de Neutrase g ⁻¹ de substrato
β -Lg Cys TG	7% beta-lactoglobulina polimerizada com 10 U TG g ⁻¹ de substrato na presença de 0,1 mol L ⁻¹ de Cys
β -Lg TT TG	7% de beta-lactoglobulina polimerizada com 10 U TG g ⁻¹ de substrato após tratamento térmico a 80 °C
GH	Grau de hidrólise
PBS	Solução salina fosfatada
RAST	<i>Radio-allergosorbent test</i>
RIE	<i>Rocket immuno-electrophoresis</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
-SH	Grupo sulfridril livre
S-S	Ponte dissulfeto
(-SH/S-S)	Tiol-dissulfeto
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Transglutaminase
TT	Tratada termicamente
U g ⁻¹	Unidade de atividade enzimática por grama de substrato

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Curva padrão de tirosina para determinação da atividade enzimática da Alcalase, Neutrase e bromelina.....21
- Figura 2:** Fluxograma geral do ensaio biológico e imunoquímico.....26
- Figura 3:** Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais.....28
- Figura 4:** Perfil da β -Lg: (A) em SDS-PAGE tricina. Coluna 1: padrão de massa molar (1 - 26 kDa), coluna 2: β -Lg. (B) em CLAE-FR, na concentração de 0,1% de proteína.....30
- Figura 5:** Curva de hidrólise da β -Lactoglobulina nativa (β -Lg) ou tratada termicamente (β -Lg TT) hidrolisada pela Alcalase (A), Neutrase (B) ou bromelina (C) em quatro condições diferentes de concentração de substrato (%) e relação enzima:substrato (U g^{-1}). Símbolos vazios: β -Lg nativa; símbolos cheios: β -Lg TT. (- $\blacktriangle$ -) 3% β -Lg e 10 U g^{-1} , (- $\triangle$ -) 3% β -Lg TT e 10 U g^{-1} , (- $\bullet$ -) 7% β -Lg e 10 U g^{-1} , (- $\circ$ -) 7% β -Lg TT e 10 U g^{-1} , (- $\blacksquare$ -) 3% β -Lg e 25 U g^{-1} , (- $\square$ -) 3% β -Lg TT e 25 U g^{-1} , (- $\blacklozenge$ -) 7% β -Lg e 25 U g^{-1} , (- $\lozenge$ -) 7% β -Lg TT e 25 U g^{-1} 32
- Figura 6:** Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina em meio redutor, de β -Lg N, β -Lg N ou TT hidrolisada com as enzimas Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina). Colunas: (1) e (15) Padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) e (16) β -Lg N; Hidrolisados com **Alcalase**: (3) 3% β -Lg 10 U g^{-1} ; (4) 7% β -Lg 10 U g^{-1} ; (5) 3% β -Lg 25 U g^{-1} ; (6) 7% β -Lg 25 U g^{-1} ; (7) 3% β -Lg TT 10 U g^{-1} ; (8) 7% β -Lg TT 10 U g^{-1} ; (9) 3% β -Lg TT 25 U g^{-1} ; (10) 7% β -Lg TT 25 U g^{-1} ; Hidrolisados com **Neutrase** (11) 3% β -Lg 10 U g^{-1} ; (12) 7% β -Lg 10 U g^{-1} ; (13) 3% β -Lg 25 U g^{-1} ; (14) 7% β -Lg 25 U g^{-1} ; (17) 3% β -Lg TT 10 U g^{-1} ; (18) 7% β -Lg TT 10 U g^{-1} ; (19) 3% β -Lg TT 25 U g^{-1} ; (20) 7% β -Lg TT 25 U g^{-1} ; Hidrolisados com **bromelina** (21) 3% β -Lg 10 U g^{-1} ; (22) 7% β -Lg 10 U g^{-1} ; (23) 3% β -Lg 25 U g^{-1} ; (24) 7% β -Lg 25 U g^{-1} ; (25) 3% β -Lg TT 10 U g^{-1} ; (26) 7% β -Lg TT 10 U g^{-1} ; (27) 3% β -Lg TT 25 U g^{-1} ; (28) 7% β -Lg TT 25 U g^{-1} 37
- Figura 7:** Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina em meio redutor da β -Lg nativa (β -Lg N) e β -Lg hidrolisada com as enzimas Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina) e polimerizada pela TG com 10 ou 25 U g^{-1} de proteína. Colunas: (1) Padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg N; (3) β -Lg Alcalase; (4) β -Lg Alcalase e 10 U TG g^{-1} ; (5) β -Lg Alcalase e 25 U TG g^{-1} ; (6) β -Lg Neutrase; (7) β -Lg Neutrase e 10 U TG g^{-1} ; (8) β -Lg Neutrase e 25 U TG g^{-1} ; (9) β -Lg bromelina; (10) β -Lg bromelina e 10 U TG g^{-1} ; (11) β -Lg bromelina e 25 U TG g^{-1} 39

Figura 8: Perfil cromatográfico de β -Lg hidrolisada com as enzimas Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina) e polimerizada pós hidrólise: (A) β -Lg Alcalase; (B) β -Lg Alcalase e 10 U TG g⁻¹; (C) β -Lg Alcalase e 25 U TG g⁻¹; (D) β -Lg Neutrase; (E) β -Lg Neutrase e 10 U TG g⁻¹; (F) β -Lg Neutrase e 25 U TG g⁻¹; (G) β -Lg bromelina; (H) β -Lg bromelina e 10 U TG g⁻¹; (I) β -Lg bromelina e 25 U TG g⁻¹. Região I: alta hidrofiliabilidade, região II: média hidrofiliabilidade, região III: baixa hidrofiliabilidade.....41

Figura 9: Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina em meio redutor, de β -Lg N, β -Lg polimerizada com TG e hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina: colunas (1) padrão de massa molar (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg N; (6) β -Lg TT TG; (7) β -Lg Cys TG. **A** - (3) β -Lg Alcalase; (4) β -Lg TT TG Alcalase; (5) β -Lg Cys TG Alcalase. **B** - (3) β -Lg Neutrase; (4) β -Lg TT TG Neutrase; (5) β -Lg Cys TG Neutrase. **C** - (3) β -Lg bromelina; (4) β -Lg TT TG bromelina; (5) β -Lg Cys TG bromelina.....46

Figura 10: Perfil cromatográfico de β -Lg hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina pós polimerização com TG. (A) β -Lg TT TG Alcalase; (B) β -Lg Cys TG Alcalase; (C) β -Lg TT TG Neutrase; (D) β -Lg Cys TG Neutrase; (E) β -Lg TT TG bromelina; (F) β -Lg Cys TG bromelina. Região I: alta hidrofiliabilidade, região II: média hidrofiliabilidade, região III: baixa hidrofiliabilidade.....49

Figura 11: Reatividade de IgE específica do pool de soro dos animais sensibilizados com: Alúmen (A e B); Solução salina (C e D), frente as amostras hidrolisadas com Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina) pré e pós polimerização com TG, assim como a β -Lg TT polimerizada e polimerizada na presença de Cys. Figura A e C - colunas: (1) β -Lg N; (2) β -Lg Alcalase; (3) β -Lg Alcalase e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Alcalase; (5) β -Lg Cys TG Alcalase (6) β -Lg TT TG; (7) β -Lg Cys TG. Figuras B e D - colunas: (1) β -Lg N; (2) β -Lg Neutrase; (3) β -Lg Neutrase e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Neutrase; (5) β -Lg Cys TG Neutrase; (6) β -Lg bromelina; (7) β -Lg bromelina e 10 U TG g⁻¹; (8) β -Lg TT TG bromelina; (9) β -Lg Cys TG bromelina (10) β -Lg TT TG; (11) β -Lg Cys TG.....52

Figura 12: Reatividade de IgE específica de pool dos soros dos animais sensibilizados com β -Lg N frente as amostras hidrolisadas com Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina) pré e pós polimerização com TG, assim como a β -Lg TT polimerizada e polimerizada na presença de Cys pré e pós polimerização com TG. **A** - (1) β -Lg N; (2) β -Lg Alcalase; (3) β -Lg Alcalase e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Alcalase; (5) β -Lg Cys TG Alcalase. **B** - (1) β -Lg N; (2) β -Lg Neutrase; (3) β -Lg Neutrase e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Neutrase; (5) β -Lg Cys TG Neutrase; (6) β -Lg bromelina; (7) β -Lg bromelina e 10 U TG g⁻¹; (8) β -Lg TT TG bromelina; (9) β -Lg Cys TG bromelina; (10) β -Lg TT TG; (11) β -Lg Cys TG.....53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Tabela 1.** Ensaio de hidrólise com as respectivas concentrações de substrato e relações enzima:substrato utilizadas.....19
- Tabela 2.** Grau de hidrólise (GH %) final da β -Lg tratada (TT) ou não termicamente hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina em quatro condições diferentes de reação (concentração de β -Lg e relação enzima:substrato).....33
- Tabela 3.** Análise de significância estatística dos fatores de concentração de substrato, relação enzima:substrato E:S e da interação entre concentração e relação E:S para a Alcalase, Neutrase ou bromelina.....35
- Tabela 4.** Grau de hidrólise (GH%), determinado pelo método de TNBS, da β -Lg hidrolisada pelas enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina e polimerizada pós hidrólise com a enzima transglutaminase (TG).....44
- Tabela 5.** Grau de hidrólise (GH%) das amostras de β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG (β -Lg TT TG) e β -Lg polimerizada com TG na presença de cisteína (β -Lg Cys TG) hidrolisados pelas enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina.....45

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. Revisão bibliográfica	4
3.1 β -Lactoglobulina	4
3.1.1 Caracterização	4
3.1.2 Antigenicidade.....	5
3.2 Modificação da antigenicidade da β -Lactoglobulina por diferentes processos.....	7
3.3 Transglutaminase e propriedades de proteínas polimerizadas.....	10
3.4 Hidrólise de proteínas polimerizadas ou não com transglutaminase	13
3.5 Enzimas proteolíticas	15
4. Material e Métodos	18
4.1 Material	18
4.2 Hidrólise da β -Lg	19
4.3 Determinação da atividade enzimática.....	20
4.4 Polimerização pós hidrólise.....	21
4.5 Polimerização pré hidrólise	22
4.6 Determinação do grau de hidrólise pelo método de TNBS	23
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina (SDS-PAGE/Tricina).....	23
4.8 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).....	24
4.9 Ensaio biológicos e imunoquímicos.....	25
4.9.1 Animais.....	26
4.9.2 Fase de sensibilização com β -Lg nativa	26

4.10	Análise estatística	29
5.	Resultados e Discussão	30
5.1	Caracterização.....	30
5.2	Hidrólise Enzimática	31
5.3	Avaliação dos hidrolisados por eletroforese	36
5.4	Obtenção e caracterização dos polímeros pós hidrólise	39
5.5	Obtenção e caracterização dos hidrolisados pós polimerização	44
5.6	Avaliação da antigenicidade por Imunoblote	50
6.	Conclusões	57
7.	Referências bibliográficas	58
8.	Anexo	69
8.1	Anexo 1: Certificado da Comissão de ética na experimentação animal CEE/Unicamp	69
8.2	Anexo 2: Tabelas de experimento fatorial de hidrólise da β -Lg com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina.	70

1. Introdução

Alergia alimentar é caracterizada por resposta imunológica anormal a um alimento ou componente nele encontrado (HELM, BURKS, 2000). Dentre os alimentos que podem causar alergia, o leite bovino é um dos mais comuns e dentre as proteínas do soro do leite, a β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactoalbumina (α -Lg) são as mais alergênicas (MONACI et al., 2006).

Diferentes tratamentos tais como hidrólise enzimática, fermentação, irradiação, lactosilação e desnaturação térmica ou por alta pressão têm sido aplicados com a finalidade de reduzir a antigenicidade de proteínas alimentares. A hidrólise de proteínas é um dos métodos mais comumente empregado para diminuir o potencial alergênico de produtos derivados do leite (MONACI et al., 2006), e a combinação deste processo com tratamento térmico (REDDY, KELLA e KINSELLA, 1988) ou alta pressão (BONOMI et al., 2003; PEÑAS et al., 2005), tem mostrado resultados satisfatórios na redução da antigenicidade da β -Lg.

A transglutaminase (TG) também tem sido estudada para a redução da antigenicidade das proteínas. A TG é uma enzima que catalisa reações de ligação cruzada covalente inter ou intramolecular em diversas proteínas, convertendo proteínas solúveis em polímeros insolúveis de alta massa molecular (MM) (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006). Redução da antigenicidade de proteínas do trigo (WATANABE et al., 1994) e da soja (BABIKER et al., 1998) foi observada após tratamento térmico e modificação com a TG. Clare et al. (2008) relataram que a adição de TG diminuiu a antigenicidade de farinha de amendoim.

Wróblewska et al (2008) avaliaram a antigenicidade de hidrolisados de proteínas do soro do leite com Alcalase polimerizados com a TG. Os autores observaram que a combinação destes tratamentos reduziu a imunoreatividade das proteínas do soro do leite, principalmente da β -Lg, quando comparado com a proteína somente hidrolisada ou polimerizada (WRÓBLEWSKA et al., 2008).

As proteínas do soro de leite não são consideradas bons substratos para ação desta enzima, a menos que haja tratamento prévio com agentes redutores como o ditioneitol (DTT) ou desnaturação térmica da proteína, que aumentam a reatividade principalmente da β -Lg (TANG e MA, 2007). Villas-Boas et al. (2010) verificaram que a polimerização da β -Lg na presença de cisteína (Cys) reduziu o seu potencial antigênico ao modificar e/ou ocultar regiões de epítomos na proteína.

Trabalhos mostraram que a hidrólise em conjunto com tratamento com TG pode modificar as propriedades funcionais de proteínas alimentares melhorando essas funções de forma diferenciada daquela resultante dos tratamentos feitos em separado. Hidrolisados de soja (BABIKER, 2000) e glúten (BABIKER et al., 1996) polimerizados por TG apresentaram aumento da solubilidade, melhora das propriedades de emulsificação e de formação de espuma. Já Flanagan e FitzGerald (2002) observaram aumento da solubilidade de caseinato de sódio submetidos a tratamento com TG tanto pré quanto pós hidrólise.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da associação dos processos de polimerização induzida pela TG e hidrólise com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina antes e após a polimerização sobre a atividade antigênica da β -Lg.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a antigenicidade de hidrolisados obtidos pré e pós polimerização da β -Lactoglobulina com a enzima transglutaminase.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar:
 - Hidrolisados da β -Lg com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina;
 - β -Lg polimerizada pela TG pré e pós hidrólise com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina.
- Avaliar a antigenicidade da β -Lg hidrolisada, polimerizada e dos hidrolisados obtidos pré e pós polimerização da β -Lactoglobulina.

3. Revisão bibliográfica

3.1 β -Lactoglobulina

3.1.1 Caracterização

O leite de vaca tem aproximadamente 30 a 35 g L⁻¹ de proteínas, divididas em caseína e proteínas do soro. A caseína representa 80% das proteínas do leite e pode ser definida como proteína precipitada por acidificação do leite desnatado com enzima renina a pH 4,6/20 °C. O líquido remanescente é o lactosoro, que contém 20% da proteína total, sendo que α -La e β -Lg perfazem 70 a 80% das proteínas desta fração. Além dessas, são encontradas a soroalbumina (BSA), lactoferrina, imunoglobulinas, protease-peptonas, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996; WAL, 2004).

As proteínas do soro de leite bovino cumprem papel importante na nutrição por serem uma fonte rica e balanceada de aminoácidos, além de apresentarem ações fisiológicas específicas *in vivo*, tais como antioxidante, antihipertensiva, antitumoral, protetora da mucosa gástrica contra agressão de agentes ulcerogênicos, virais e bacterianos (SGARBIERI, 2004). Por outro lado, elas apresentam propriedades funcionais tecnológicas excelentes que derivam principalmente da sua elevada solubilidade em ampla faixa de pH. Destacam-se o poder gelificante, a propriedade formadora de espuma e a capacidade de emulsificar quantidades significativas de lipídeos (MARSHALL e HARPER, 1988).

A β -Lg constitui 50% do total das proteínas do soro do leite (MONACI et al., 2006). É uma proteína globular que, em pH fisiológico, encontra-se como dímero (MOUÉCOUCOU et al., 2007). O monômero da β -Lg, de MM 18,3 kDa, contém 162 resíduos de aminoácidos, um grupo tiol (-SH) Cys¹²¹ e duas pontes dissulfeto intramolecular (-S-S), ligando a Cys⁶⁶ à Cys¹⁶⁰ e a Cys¹⁰⁶ à Cys¹¹⁹. Sua estrutura terciária é conhecida, consistindo de nove fitas β antiparalelas, oito das quais formam barreira hidrofóbica ao lado de uma α -hélice, o que explica a resistência desta proteína a enzimas digestivas. A β -Lg pertence à família das lipocalinas e é

considerada uma proteína ligante de retinol (SGARBIERI, 1996; SÉLO et al., 1999; NACER et al., 2004).

Existem sete variantes de β -Lg, sendo que as mais estudadas são a A e B. Elas diferem apenas nas posições 64 (Asp-Gly) e 118 (Val-Ala) e ambas são conhecidas por apresentarem potencial alergênico (SÉLO et al., 1999; WAL, 2004). Dentre as proteínas do soro do leite, a β -Lg e a α -La são as mais alergênicas (MONACI et al., 2006).

Embora isolada há mais de 60 anos, a função desta proteína, segundo WALZEN et al. (2002), ainda é desconhecida, mas sabe-se que ela se liga ao cálcio, zinco e a uma variedade de pequenas moléculas hidrofóbicas. Wit (1998) atribui à β -Lg a propriedade de transportador de retinol (pró vitamina A). De acordo com o autor, a estrutura globular da β -Lg é estável aos ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, tornando-a um carreador de retinol materno resistente para o filhote. Porém, esta função biológica parece não ser importante para bebês, uma vez que a β -Lg não está presente no leite humano (WIT, 1998).

3.1.2 Antigenicidade

Um antígeno é qualquer substância que pode ser especificamente ligada por um anticorpo. Os anticorpos podem reconhecer como antígenos praticamente qualquer tipo de molécula biológica, incluindo simples metabólitos intermediários como açúcares, lipídeos e hormônios, assim como macromoléculas como carboidratos complexos, fosfolipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Somente macromoléculas são capazes de estimular os linfócitos B para que iniciem a resposta humoral. As moléculas que estimulam as respostas imunológicas são chamadas de imunógenos. As macromoléculas são geralmente muito maiores do que a região de ligação de antígenos de um anticorpo. Consequentemente, qualquer anticorpo se liga somente a uma parte da macromolécula, que é chamada de determinante ou epítopo (ABBAS, 2005).

Existem dois tipos de epítomos: “contínuo” ou “linear”, quando os aminoácidos estão em seqüência na estrutura primária ou “conformacional”, na qual vários aminoácidos estão muito próximos devido à estrutura tridimensional da proteína (BALL et al., 1994). A estrutura complexa e estável de algumas proteínas do leite, incluindo a β -Lg e a α -La, é importante para a manutenção dos epítomos conformacionais (MONACI et al., 2006). Segundo Ball et al. (1994), moléculas complexas como a β -Lg apresentam epítomos contínuos e conformacionais. Seló et al. (1999) utilizaram digestão com tripsina para investigar a alergenicidade da β -Lg e observaram a presença de grande quantidade de epítomos alergênicos em toda extensão da estrutura da β -Lg.

Clément et al. (2002) mostraram que a estrutura terciária da β -Lg é um fator importante para sua antigenicidade, pois ao utilizarem anticorpos monoclonais contra β -Lg, verificaram na estrutura terciária da β -Lg regiões antigênicas não só na α -hélice e *loops* externos, mas também nas fitas- β . No entanto, segundo Selo, Clément e Bernard (1999), nenhuma forma estrutural em particular é responsável pela antigenicidade da β -Lg, pois os epítomos são numerosos e amplamente difundidos ao longo da proteína, podendo estar localizados nas partes hidrofóbicas da molécula, sendo inacessíveis para as IgE na conformação nativa da proteína, porém, acessíveis depois da digestão no trato gastrointestinal. Wal (2001) verificou que mais de 90% dos pacientes sensibilizados por β -Lg reconheceram os peptídeos Val⁴¹-Lis⁶⁰, Tyr¹⁰²-Arg¹²⁴ e Leu¹⁴⁹-Cys¹⁶², cada um contribuindo com aproximadamente 10-15% da imunorreatividade desta proteína.

Wal et al. (1995) verificaram que 60 a 80% dos pacientes alérgicos ao leite bovino tinham Imunoglobulina E (IgE) específica para β -Lg. Wal (2001) verificou que mais de 90% dos pacientes sensibilizados por β -Lg reconheceram os fragmentos f(41-60), f(102-124) e f(149-162), cada um contribuindo com aproximadamente 10-15% da imunorreatividade desta proteína intacta.

Os métodos imunoquímicos podem ser utilizados para monitorar e verificar a ruptura dos epítomos específicos ocasionados pela hidrólise enzimática e

processos associados. Entre eles os mais utilizados encontram-se o *Radio-Allergosorbent Test* (RAST), *Enzyme Allergosorbent Test* (EAST), *Rocket Immuno-Electrophoresis* (RIE), *Western Blotting*, *Imunoblote* e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (BESLER, 2004; POMS, KLEIN e ANKLAM, 2004; KOPPELMAN e HEFLE, 2006; MONACI et al., 2006).

A análise de Imunoblote é um procedimento padrão para separação e identificação de proteínas/alérgenos (POMS, KLEIN e ANKLAM, 2004). Esta análise envolve inicialmente a separação das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e posteriormente, a transferência destas para um suporte de nitrocelulose. A posição dos antígenos na membrana é uma reprodução de sua posição no gel. Proteínas específicas podem ser detectadas por anticorpos capazes de reagir com proteínas solubilizadas por dodecil sulfato de sódio (SDS), e os anticorpos ligados são revelados com anticorpos anti-imunoglobulina marcados com radioisótopos ou uma enzima (JANEWAY et al., 2002).

3.2 Modificação da antigenicidade da β -Lactoglobulina por diferentes processos

Diversos processos tecnológicos têm sido usados para diminuir o potencial alergênico do leite bovino, já que a remoção total dos alérgenos do leite é inviável (MONACI et al., 2006). Uma estratégia que é comumente empregada para diminuir o potencial alergênico de produtos derivados do leite é a hidrólise das proteínas (MONACI et al., 2006). Os hidrolisados protéicos enzimáticos com cadeia curta e MM definida são importantes complementos para a alimentação de indivíduos que apresentam alergia e/ou intolerância a proteínas alimentares, dificuldade na digestão de proteínas ou a outras patologias associadas ao metabolismo de aminoácidos, como nos casos de doenças crônicas do fígado (falência hepática) e fenilcetonúria (CLEMENTE, 2000).

A especificidade enzimática, além do grau de hidrólise (GH) ou da distribuição da MM dos hidrolisados parece determinar a antigenicidade residual

das proteínas do soro do leite. Pela ação enzimática alguns epítomos podem ser rapidamente degradados, enquanto outros podem permanecer até o final da hidrólise (JOST et al, 1987). A hidrólise de proteínas não deve ir além do que o necessário para a eliminação da resposta antigênica, pois a hidrólise extensiva torna o produto pouco palatável (amargo) e, além disso, aminoácidos livres são menos absorvidos do que peptídeos pequenos, portanto, o grau de hidrólise deve ser controlado (VAN BERESTEIJN et al., 1994; ENA et al., 1995; VAN WILLIGE e FITZGERALD, 1995).

Kananen et al. (2000) mostraram que pela hidrólise da fração precipitada das proteínas do soro do leite com pepsina por 180 min e com a tripsina por 30 min, obtendo-se a maioria dos peptídeos com MM <5 kDa, foi possível quase eliminar a antigenicidade destas proteínas. Svenning et al. (2000) obtiveram a menor resposta antigênica com hidrolisados de proteínas do soro do leite de alto grau de hidrólise obtidos com Corolase PP, devido, segundo os autores, às menores quantidades de β -Lg residual.

Além da hidrólise, o tratamento térmico também é utilizado para redução da antigenicidade de proteínas. O tratamento térmico é o método mais comum para reduzir patógenos e pode ser considerado como o fator mais efetivo em induzir mudanças estruturais intensas na β -Lg, podendo alterar a conformação dos epítomos e conseqüentemente reduzir o potencial alergênico (MONACI et al., 2006; PEYRON et al., 2006). Mierzejewska e Kubicka (2006) verificaram diminuição da imunorreatividade da β -Lg quando submetida a tratamento térmico entre 65 e 80 °C. Kleber et al. (2004), ao contrário, relataram que a β -Lg, quando previamente tratada a temperaturas entre 75 e 90 °C por 15 min, apresentou aumento da antigenicidade e quando tratada a 148 °C por 15 min, a β -Lg apresentou a menor resposta antigênica.

De acordo com Kleber et al. (2004), temperaturas acima de 65 °C podem promover a formação de agregados protéicos de β -Lg estabilizados por ligações covalentes, como pontes dissulfeto, que podem esconder alguns epítomos da β -Lg.

Assim, os anticorpos podem ter acesso somente aos epítomos localizados nas superfícies desta proteína agregada, o que pode levar a redução da alergenicidade (KLEBER et al., 2004).

A fermentação ácido-láctica também tem sido estudada visando à redução da antigenicidade da β -Lg. Jedrychowski e Wroblewska (1999), utilizando diferentes espécies de bactérias ácido-láticas (meso e termofílicas), reduziram a antigenicidade da β -Lg em 99%. Ehn et al. (2005), ao contrário, verificaram, que a fermentação com bactérias lácticas não diminuiu a capacidade de ligação da β -Lg a IgE.

A reação de Maillard entre a β -Lg e açúcares redutores como glicose, galactose ou lactose também pode modificar as regiões dos epítomos, contribuindo para redução da antigenicidade da proteína (MORGAN et al., 1998). Jost, Monti e Pahud (1987) relataram resposta antigênica reduzida quando a β -Lg foi lactosilada.

A utilização da TG pode também reduzir o potencial antigênico das proteínas do soro do leite, pois esta enzima, ao introduzir ligações cruzadas covalentes inter ou intramoleculares, promove a polimerização das proteínas, ocultando regiões de epítomos (VILLAS-BOAS et al., 2010). Villas-Boas et al. (2010) verificaram que a polimerização da β -Lg na presença de agente redutor Cys promoveu menor produção de níveis séricos de IgE e IgG em camundongos Balb/c, comparada aos grupos que receberam β -Lg nativa.

A modificação da soja com TG levou ao mascaramento de determinantes antigênicos e redução da alergenicidade da fração proteica menor que 34 kDa (BABIKER et al., 1998). Estudo de Wróblewska et al (2008) mostrou que o tratamento combinado de hidrólise com Alcalase e polimerização com TG reduziu significativamente a imunoreatividade das proteínas do soro do leite, principalmente da β -Lg. Fernandes (2009) concluiu que a polimerização com TG provocou mudanças estruturais que facilitaram a clivagem da β -Lg pelas enzimas

digestivas, e geraram peptídeos com baixo potencial antigênico, comparados aos digeridos da proteína nativa, quando avaliada por Imunoblote.

3.3 Transglutaminase e propriedades de proteínas polimerizadas

TG (EC 2.3.2.13) é uma enzima que pode ser encontrada em diversas fontes, como tecidos e fluidos animais (FOLK, 1980) e em microrganismos (ANDO et al., 1989). A TG tem estrutura monomérica, com 331 aminoácidos (KANAJI et al., 1993). De acordo com Ando et al. (1989), a MM da TG, avaliada por SDS-PAGE, é em torno de 40 kDa, seu ponto isoelétrico é 8,9, com faixa de pH ótimo entre 6 e 7. A TG de origem microbiana é amplamente utilizada como enzima funcional em vários setores da indústria de alimentos devido à baixa especificidade de substrato e possibilidade de obtenção em massa por um baixo custo, através do processo de fermentação (JAROS et al., 2006).

A TG é a única enzima utilizada para fins comerciais na indústria de alimentos que catalisa reações de ligação cruzada inter ou intramolecular em proteínas. Ela catalisa reação de acil transferência entre o grupo γ -carboxilamida da glutamina ligada a peptídeos (doador de acil) e aminas primárias (receptores de acil), incluindo o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina em proteína. Quando o grupo ϵ -amino de lisina ligada à proteína age como um acil receptor, ligações cruzadas covalentes, chamadas de *cross-linking*, intra e/ou intermoleculares são formadas (ligação isopeptídica ϵ -(γ -glutamil) lisina), resultando na polimerização de proteínas (LORENZEN et al., 1998; JAROS et al., 2006).

A capacidade da TG de introduzir ligações cruzadas inter e intra proteínas tem sido aplicada para aumentar o valor e as propriedades nutricionais e funcionais de proteínas de alimentos (CHISTENSEN et al., 1996; JAROS et al., 2006). As proteínas mais comumente modificadas pela TG são as provenientes do leite bovino (O'SULLIVAN et al., 2002; YILDIRIM e HETTIARACHCHY, 1998; FLANAGAN e FITZGERALD; 2002; WROBLEWSKA et al., 2008) da soja (WALSH et al., 2003; BABIKER, 2000) e do glúten (AGYARE et al., 2008). Através dessas

reações, a TG pode modificar as propriedades de solubilidade, hidratação, gelificação, coagulação, estabilidade ao calor, e propriedades reológicas de proteínas (DICKINSON, 1997; LORENZEN, SCHLIMME, 1998; MOTOKI, SEGURO, 1998; LORENZEN, 2000). Existem patentes sobre a aplicação da TG na modificação de produtos cárneos, pescados, de panificação, derivados de soja e laticínios (DE JONG, KOPPELMAN, 2002; YOKOYAMA et al., 2004; JAROS et al., 2006).

Na área de laticínios, a TG tem sido aplicada em iogurtes, queijos e sorvetes (KURAISHI et al., 2001; JAROS et al., 2006). Lorenzen et al. (2002) verificaram que iogurte tratado com TG apresentou aumento de firmeza, viscosidade e cremosidade em relação às amostras não tratadas com a enzima, além de maior capacidade de ligação com a água, que resultou em redução da sinerese. Com relação às propriedades sensoriais, os iogurtes tratados com TG apresentaram menor acidez, além de sabor e odor menos intensos que das amostras controle. O uso da TG reduziu a sinerese e melhorou a estabilidade térmica de queijos processados e de sorvetes, além de conferir maior maciez, principalmente em produtos de baixa caloria e sem açúcar (KURAISHI et al., 2001; JAROS et al., 2006).

Segundo O'Sullivan et al. (2002), o tratamento do leite com TG previne a dissociação de micelas de caseína sob condições que normalmente teriam sua integridade destruída. O tratamento com alta pressão do leite cru previamente tratado com TG foi incapaz de romper a ligação cruzada intra-micelar e as micelas não foram rompidas na mesma extensão da amostra controle (O'SULLIVAX et al., 2002).

Dentre as duas principais frações protéicas do leite, a caseína pode facilmente sofrer reações de ligação cruzada pela ação da TG, enquanto que as proteínas globulares do soro do leite são menos susceptíveis às reações induzidas por esta enzima (DE JONG e KOPPELMAN, 2002). Porém, a acessibilidade da β -Lg e da α -La à ação da TG pode ser melhorada pelo tratamento com agentes redutores como DTT, capazes de quebrar pontes dissulfídicas, levando ao

desdobramento das proteínas e resultando em uma exposição maior de vários lados da proteína para a ação da TG (DE JONG e KOPPELMAN, 2002; LEE et al., 2001). O desdobramento da β -Lg ainda pode ser induzido pelo tratamento a temperaturas superiores a 70 °C (EISSA et al., 2006).

A estrutura protéica é afetada quando o leite é pré-aquecido a 85 °C/15 min, o que parece aumentar a susceptibilidade das proteínas do leite à TG com subsequente formação de polímeros (SHARMA, LORENZEN e OVIST, 2001). Rodriguez-Nogales (2006) verificou o efeito do tratamento de pré-aquecimento do leite de ovelha em diferentes condições de temperatura (70-90 °C) e tempo (15-60 min) antes da incubação com TG. As melhores condições de pré-tratamento para formação de ligações cruzadas covalentes e formação de novos polímeros a partir da α -La e β -Lg foram 90 °C/6 min e 83,4 °C/55,7 min, respectivamente. O tratamento térmico leva à exposição de resíduos de lisina e glutamina na cadeia peptídica das proteínas de soro de leite, aumentando sua susceptibilidade à formação de ligações cruzadas pela TG (JONG E KOPPELMAN, 2002; RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; SILVA et al., 2002) . Após o tratamento térmico (80 °C/60 min), as pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura da β -Lg são rompidas, diminuindo as estruturas de α -hélice e folhas β (EISSA et al., 2006).

No estudo conduzido por Villas-Boas (2008) avaliou-se a β -Lg tratada termicamente (80 °C/60 min/pH 8) em diferentes concentrações (3, 5 ou 7%) e polimerizada com a TG (E:S de 5, 10, 25 e 50 U g⁻¹ de proteína). O maior grau de polimerização foi obtido na concentração de proteína a 7%, com 25 U de TG g⁻¹, indicando que esta relação enzima:substrato foi a que promoveu a maior formação de polímeros de MM elevada.

Como DTT não pode ser utilizado na produção de alimentos, alternativas para aumentar a reatividade da β -Lg foram investigadas. Faergemand et al. (1997) verificaram que a concentração de 0,4 mol/L de Cys resultou na polimerização da β -Lg quando incubada com TG de *Streptomyces lydicus*. Os autores concluíram que a TG pode polimerizar extensivamente proteínas do soro do leite em pH mais

alcalino (8,5-9,0), sendo que a polimerização de isolado de proteínas do soro do leite ou da β -Lg resultou na formação de géis transparentes após algumas horas a 40 °C. Foi comprovado dessa forma que a reação catalisada pela TG é um método enzimático potencial para a produção de géis de ligações cruzadas covalentes nestas proteínas (FAERGEMAND et al., 1997). Villas-Boas (2008) avaliou a polimerização da β -Lg nativa, tratada termicamente e na presença de cisteína, verificando polimerização mais acentuada na presença da Cys, com formação de polímeros de maior MM, quando comparadas às amostras de β -Lg nativa e tratada termicamente.

3.4 Hidrólise de proteínas polimerizadas ou não com transglutaminase

A hidrólise enzimática de proteínas é acompanhada por três diferentes efeitos: redução da MM, aumento no número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos (PENYAN e KILARA, 1996). Origina produtos de MM menor, com menos estrutura secundária e, em alguns casos, com melhores propriedades funcionais que as proteínas intactas (ADLER-NISSEN e OLSEN, 1979). A hidrólise está geralmente associada com melhora da solubilidade (CHOBERT et al., 1996). Proteínas do soro do leite apresentam alta solubilidade em uma extensa faixa de pH, que tende a diminuir em baixo pH, como resultado da desnaturação e agregação (MUTILANGI et al., 1996).

A concentração de enzima e de substrato são fatores importantes na cinética da reação. A especificidade da enzima determina principalmente a natureza do produto, podendo resultar em frações com diferentes MM e, conseqüentemente, diferentes características funcionais (WHITAKER, 1994). A hidrólise enzimática, realizada em condições brandas e controladas, garante a manutenção da qualidade nutricional dos hidrolisados e perfil peptídico definido. O GH é o parâmetro utilizado para comparar os hidrolisados entre si. O conhecimento da relação entre GH e alguma característica funcional específica do hidrolisado permite elaborar produtos com propriedades funcionais previamente definidas (KRISTINSSON, 2000).

A β -Lg nativa não é facilmente hidrolisada pela pepsina, mas é susceptível à hidrólise pela quimotripsina e pela tripsina (PHILLIPS et al., 1994). A baixa digestibilidade da β -Lg é considerada como uma das causas de sua alergenicidade (KANANEN et al., 2000). A resistência relativa à proteólise é geralmente explicada pela estrutura terciária compacta da proteína que protege muitas das ligações peptídicas susceptíveis às enzimas. A desnaturação por processos físicos e/ou químicos da β -Lg geralmente leva à melhora do acesso das enzimas aos sítios de especificidade das proteínas (KANANEN et al., 2000). Após a desnaturação, a β -Lg pode representar o substrato ideal para as proteases, pois amplas regiões hidrofóbicas do núcleo da proteína são desenroladas e acessíveis às enzimas, ao contrário do que acontece com a forma nativa ou de agregados devido à desnaturação provocada pelo tratamento térmico (IAMETTI et al., 2002).

Estudos têm mostrado que a hidrólise em conjunto com tratamento com TG pode modificar as propriedades funcionais de proteínas alimentares, melhorando-as de forma diferenciada daquela que seria resultante dos tratamentos em separado. Hidrolisados de soja (BABIKER et al., 2000), glúten (BABIKER et al., 1996) e caseinato de sódio (FLANAGAN e FITZGERALD, 2002) com pronase, papaína, pepsina que foram submetidos a tratamento com TG apresentaram melhora das propriedades de emulsificação e de formação de espuma.

Agyare et al. (2008) mostraram que o tratamento do glúten hidrolisado pela quimotripsina com TG de origem microbiana aumentou a solubilidade da proteína em ampla variedade de condições (pH 4,0 – 7,0, NaCl 0 ou 0,6 mol/L, incubação a 5 °C por 18 horas ou a 55 °C por uma hora). O aumento da solubilidade foi atribuído à deaminação ou formação de grupos carboxílicos ionizáveis e redução na hidrofobicidade superficial das moléculas (AGYRE et al., 2008).

Em estudo de Flanagan e FitzGerald (2002), o caseinato de sódio hidrolisado com Protamex (protease de *Bacillus*, assim como a subtilisina) a baixo GH e tratado com TG, pré e pós hidrólise, apresentou aumento da solubilidade em torno do ponto isoelétrico. Walsh et al (2003) relataram aumento do índice de

solubilidade do isolado protéico de soja entre pH 3,0 e 5,0, usando uma combinação de formação de ligação cruzada com TG e hidrólise com Alcalase.

Alguns estudos avaliaram também as propriedades de emulsificação e gelificação de proteínas hidrolisadas que polimerização pela TG. Resultados obtidos por Babiker (2000) mostraram que a polimerização da proteína da soja e seus hidrolisados com a TG foi efetiva no melhoramento das propriedades de emulsificação. As propriedades de formação de espuma da proteína de soja e seus digeridos também aumentaram após a polimerização com a TG (BABIKER, 2000).

Pinterits e Arntfield (2007) observaram que a proteólise limitada da proteína de canola com tripsina, ficina ou bromelina foi um pré-tratamento adequado para a polimerização com TG. O tratamento combinado da protease e TG antes do aquecimento resultou na formação de géis mais fortes do que somente com o tratamento com a TG. Já o tratamento somente com proteases causou impacto negativo na gelificação da proteína, diminuindo a força do gel, sugerindo que o uso das proteases sozinhas não é favorável para a melhora da gelificação da proteína da canola (PINTERITS e ARNTFIELD, 2006).

3.5 Enzimas proteolíticas

A escolha da enzima proteolítica é muito importante, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos (GAUTHIER et al., 1986; CHATAUD et al., 1988; HAQUE e MOZAFFAR, 1992).

Enzimas proteolíticas podem ser classificadas como exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, região N ou C terminal, são classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia

polipeptídica, entre as regiões N e C terminal sendo que a presença de grupos amino ou carboxila livres tem um efeito negativo na atividade da enzima. Estas enzimas são divididas em quatro subgrupos de acordo com seu mecanismo catalítico: serina proteases, aspártico proteases, cisteína proteases, e metaloproteases (RAO et al., 1998).

Algumas proteases são produzidas por microorganismos, os quais são comuns entre os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Rhizopus* (DINIZ, MARTIN, 1999). Aproximadamente 60% do total das enzimas industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Na indústria alimentícia, as proteases são utilizadas como adjuvantes no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, produtos lácteos, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteína hidrolisada e flavorizantes (FURLAN e OETTERER, 2002).

A Alcalase é uma serina protease produzida pelo *Bacillus licheniformis* que tem ampla especificidade, mas cliva principalmente o lado carboxila de aminoácidos hidrofóbicos (ADLER-NISSEN, 1986). A Alcalase pode ser empregada na modificação das propriedades funcionais de diversos substratos protéicos, incluindo isolado de proteína de soja (ADLER-NISSEN e OLSEN, 1979), proteínas do leite (MIETSCH et al., 1989), glúten (CHOHOBERT et al., 1996), assim como proteína do grão de bico (CLEMENTE et al., 1999), plasma sanguíneo (HYUN e SHIN, 2000) e proteína de peixe (KRISTINSSON e RASCO, 2000).

A Neutrase, metalo protease bacteriana produzida por fermentação submersa de cepa selecionada de *Bacillus amyloliquefaciens*, cliva preferencialmente ligações envolvendo aminoácidos hidrofóbicos. É uma endoprotease que pode ser utilizada na maioria dos casos onde se deseja degradação de proteínas moderada ou extensa (NOVOZYMES, 2002).

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo de oligossacarídeo

por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. É uma enzima sulfidrílica, ou cisteína protease, e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. É uma proteína ácida e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (MURACHI, 1976). A bromelina cliva ligações contendo tanto resíduos aromáticos (fenilalanina e tirosina) quanto básicos (lisina e arginina) (ADLER-NISSEN, 1986).

A bromelina tem diversos usos na indústria alimentícia e farmacêutica, todos baseados em sua atividade proteolítica. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, entre outros (BORRACINI, 2006).

4. Material e Métodos

4.1 Material

Utilizou-se β -Lg Bio Betalactoglobulin (variantes A e B) doada pela Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, MN, EUA). A enzima transglutaminase Activa WM (atividade declarada de aproximadamente 100 U g⁻¹), doada pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), foi utilizada na sua forma original, sem qualquer purificação. É produzida por *Streptoverticillium* sp. (Ca²⁺ independente), tem atividade ótima na faixa de pH de 5,0 a 8,0; temperatura ótima de reação de 50 a 55 °C e. As enzimas Neutrase® e Alcalase® foram fornecidas pela Novozymes (Araucária, Paraná, Brasil) e a bromelina pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil).

Os reagentes utilizados foram: aminoácido L-cisteína 97% (Aldrich, Milwaukee, EUA, cód. 32630-5, lote: 03809KD316), ácido trifluoracético para síntese (TFA) (Merck, Hohenbrunn, Alemanha), ácido tricloroacético (TCA), β -mercaptoetanol (Merck, Hohenbrunn, Alemanha), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich), tetrahydrocloreto de diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha); 2.5% tiopental sódico (Cristália, São Paulo, SP, Brasil); Tween 20 (Merck, Darmstald, Alemanha).

Os anticorpos utilizados foram: *Purified Mouse IgE antibody*, *Purified Rat Anti-mouse IgE monoclonal antibody* (BD Biosciences), Anti-Rat IgG Whole molecule, peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

Para o ensaio biológico, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas adquiridos do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica – Unicamp). O Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEEAA), protocolo nº1586-1 (Anexo 1).

4.2 Hidrólise da β -Lg

Para a hidrólise da β -Lg, foram utilizadas, separadamente, as enzimas Alcalase, Neutrase e bromelina. Para determinar as melhores condições de hidrólise com cada enzima, foram realizados experimentos fatoriais utilizando delineamento inteiramente casualizado com dois fatores independentes (concentração de substrato e relação enzima:substrato). A variável dependente foi o GH obtido após 240 min de reação. Na Tabela 1 são mostradas as condições utilizadas no estudo. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Tabela 1. Ensaios de hidrólise com as respectivas concentrações de substrato e relações enzima:substrato utilizadas.

Ensaio	Concentração Substrato (%)	Relação E:S (U g ⁻¹)
1	3	10
2	7	10
3	3	25
4	7	25

E:S: enzima/substrato

Para cada enzima, o delineamento experimental foi realizado com a β -Lg em sua forma nativa e com a proteína tratada termicamente. O tratamento térmico foi realizado com a β -Lg dispersa em água destilada na concentração de cada ensaio, em banho termostaticado a 80°C por 60 min.

O pH da reação de hidrólise foi fixado em 7,5 para todas as enzimas, pois a β -Lg, quando dispersa em água apresenta alteração de sua estrutura em função do pH da solução. Segundo Walstra (2006), em pH 5,5 a β -Lg se associa para formar octâmero, já em pH acima de 7,5 ela ocorre apenas na forma de monômero. A reação foi conduzida na temperatura ótima de cada enzima, 50, 55 e 60 °C, respectivamente, para a Neutrase, bromelina e Alcalase, de acordo com informação fornecida pelos fabricantes.

Para os ensaios de hidrólise, a β -Lg foi dispersa em água, o pH foi ajustado em 7,5 com $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH e equilibrada a temperatura adequada à enzima utilizada. A enzima previamente dissolvida em água e adicionada à suspensão. A reação de hidrólise foi monitorada utilizando-se o método pH-stat, com uso de titulador automático modelo Metler DL 21 (Schwerzenbach, Suíça) com sistema de agitação. A reação foi interrompida após 240 min por aquecimento a 90°C por 10 min para a inativação da enzima. O GH foi definido pela equação (ADLER-NISSEN, 1986):

$$\text{GH (\%)} = BN_b(1/\alpha)(1/\text{MP})(1/h_{\text{tot}}) \times 100 \quad (1)$$

onde: B = consumo de base em mL; N_b = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo $\alpha\text{-NH}_2$; MP = massa da proteína em g; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato protéico, cujo valor é de $8,8 \text{ mMol/g}$ de proteína para a β -Lg (STĂNCIUC et al., 2008).

A condição selecionada foi utilizada para obtenção dos hidrolisados utilizados na realização dos experimentos de polimerização pós e pré hidrólise.

4.3 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática de cada enzima foi realizada para padronizar em unidades a quantidade a ser utilizada em cada experimento.

A atividade proteolítica das enzimas foi determinada utilizando-se solução 1,2% caseína (m/v; Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,5 e foi conduzida a 50, 55 e 60°C , respectivamente para Neutrase, bromelina e Alcalase, por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução 30% de TCA, com concentração final de 15% (m/v). O material foi filtrado em papel Wathman 42 (Schleicher & Schüll, Dassel, Dassel, Alemanha) e a absorbância do sobrenadante foi determinada em Espectrofotômetro UV-Vis (DU® - 70 Beckman, Fullerton, CA, EUA) a 275 nm. Uma unidade (U) de atividade

enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar, em 1 min a proteína solúvel em TCA equivalente a 1 µg de tirosina (EMI et al., 1976).

Foi construída uma curva de calibração (Figura 1) com L-Tirosina (Sigma) com 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml de tirosina. As determinações foram feitas em triplicata.

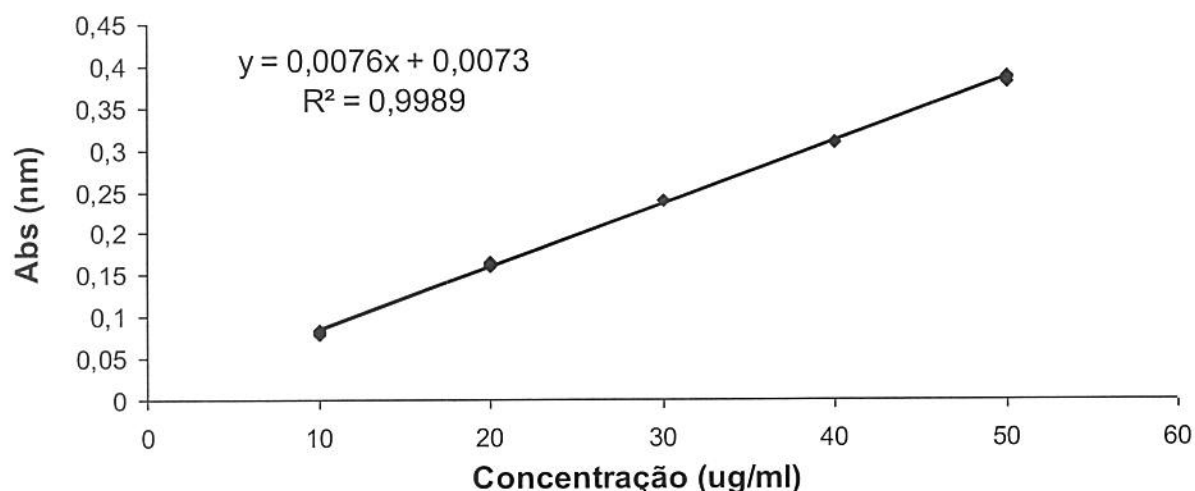


Figura 1. Curva padrão de tirosina para determinação da atividade enzimática da Alcalase, Neutrase e bromelina.

A atividade das enzimas Alcalase, Neutrase e bromelina, expressa em unidades por miligrama de enzima foi 2,63; 1,38 e 0,32 U/mg, respectivamente.

4.4 Polimerização pós hidrólise

Os hidrolisados obtidos de acordo com a condição selecionada no item 4.2, foram liofilizados para posterior utilização. A polimerização dos hidrolisados foi realizada nas condições definidas por Villas-Boas et al. (2010): 7% (m/v) de substrato 10 ou 25 U TG g⁻¹, em pH 8 (VILLAS-BOAS et al., 2010), 50 °C, por 180 min e interrompida por resfriamento das amostras a 4 °C e liofilizados. Os hidrolisados e os polimerizados pós hidrólise foram avaliados por SDS-

PAGE/tricina e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), de acordo com o descrito nos itens 4.7 e 4.8, respectivamente.

O teor de nitrogênio total das amostras foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl. Para conversão do teor de nitrogênio em proteína, utilizou-se o fator 6,38 (AOAC, 1995).

4.5 Polimerização pré hidrólise

A β -Lg polimerizada foi obtida de duas maneiras: (1) β -Lg dispersa em água destilada (7% p/v) foi tratada termicamente a 80 °C por 60 min em banho termostatizado, resfriada a 50°C e a enzima TG foi adicionada na proporção de 10 U g⁻¹ proteína; e (2) β -Lg foi dispersa (7% p/v) em solução 0,1 mol L⁻¹ Cys e a TG foi adicionada (10 U/g de proteína) (VILLAS-BOAS et al., 2010). As condições de polimerização (relação E:S e concentração de Cys) foram as descritas por Villas-Boas et al. (2010) e Fernandes (2009). A reação de polimerização, nos dois experimentos, foi conduzida a 50 °C por 180 min em banho termostatizado e resfriada a 4 °C em banho de gelo. O material foi liofilizado para posterior utilização.

Os polimerizados obtidos foram hidrolisados com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina nas condições estipuladas no item 4.3 A hidrólise foi conduzida por 240 min, monitorada pelo método de pH-stat. A reação de hidrólise foi interrompida com a elevação da temperatura a 90 °C por 10 min.

Os polimerizados e os hidrolisados obtidos a partir da β -Lg polimerizada foram avaliados por SDS-PAGE/tricina e CLAE-FR, conforme descrito nos itens 4.7 e 4.8, respectivamente.

Para as amostras que continham Cys, o nitrogênio proveniente da adição deste aminoácido foi descontado do nitrogênio total para o cálculo do teor protéico.

4.6 Determinação do grau de hidrólise pelo método de TNBS

O GH das amostras hidrolisadas e polimerizadas pós hidrólise, também foi determinado pelo método do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (ADLER-NISSEN, 1979). Este método fundamenta-se na reação colorimétrica do TNBS com os grupos α -amino terminais das proteínas e peptídeos formados durante a reação de hidrólise.

O GH foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$GH = \frac{mmolLeu}{htot} \times 100 \quad (1)$$

onde: *mmol Leu* = grupamentos amínicos livres, calculados a partir da curva padrão de leucina;

htot = número de equivalente de pontes peptídicas por unidade de massa protéica, cujo valor é de 8,8 mMol/g de proteína para a β -Lg (STĂNCIUC et al., 2008).

Para avaliação de um eventual efeito das condições de polimerização, foi determinado o GH dos hidrolisados submetidos às condições utilizadas na reação de polimerização, porém sem adição da TG.

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina (SDS-PAGE/Tricina)

O perfil eletroforético da β -Lg nativa (β -Lg N) e da β -Lg submetida à hidrólise, polimerização pré e pós hidrólise ou somente polimerização foi obtido em sistema SDS-PAGE/Tricina (SCHAGGER e VON JAGOW, 1987) em cuba vertical (Mini Protein II System, BioRad Laboratories) e espaçadores de 1,5 mm. Utilizou-se um sistema descontínuo composto de gel de separação, gel espaçador e gel de empilhamento com 15,5, 10 e 4% de acrilamida, respectivamente. As amostras foram diluídas em tampão redutor (0,0625 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 2% SDS, 20% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, Coomassie Blue G-250, pH 6,8) e aquecidas a 95 °C/10 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 μ L da solução 1% de proteína (100 μ g de proteína), com exceção da amostra de β -Lg N, que continha 0,1% de

proteína (10 µg de proteína). Após as corridas, os géis foram mantidos por 12 h em solução fixadora metanol/ ácido acético/ água (4:1:5) e corados por 48 h em solução de 0,025% de Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich) em 10% de ácido acético. Posteriormente os géis foram descorados em solução de 10% ácido acético.

A MM dos peptídeos foi estimada utilizando padrão de baixa MM (Sigma-Aldrich - cód. M3548) contendo as seguintes frações protéicas: bradiquinina (1,06 kDa); cadeia β da insulina bovina oxidada (3,496 kDa); aprotinina de pulmão bovino (6,5 kDa); α -La de leite bovino (14,2 kDa); mioglobina de coração de cavalo (17,0 kDa); isomerase triosefosfato de músculo de coelho (26,6 kDa).

4.8 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

A análise cromatográfica foi realizada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, consistindo de uma bomba Varian 9012, (Varian, Walnut Creek, CA, EUA - série 04824), um detector de absorvância de duplo comprimento de onda Varian 9050, série 02570 e munido de coluna C18 Microsorb-MVTM (250 mm x 4,6 mm DI, 5 µm - Raenin Instrument Inc Company – Woburn, MA, EUA).

A composição dos solventes foi: solvente A: 0,03% de ácido trifluoracético (TFA) (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) em água Milli-Q, solvente B: 0,03% TFA em metanol (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) de grau HPLC (High Performance Liquid Chromatography), filtrados em membrana 0,45 µm (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha). A coluna foi mantida em temperatura ambiente, com fluxo de 1 mL min⁻¹, detector fixado em 214 nm, volume de injeção de 20 µL. A coluna foi equilibrada com 80% do solvente A e 20% do solvente B e as amostras foram eluídas em gradiente linear até 80% do solvente B em 30 min, sendo mantida de forma isocrática por 10 min e reequilibrada às condições iniciais durante 10 min. As amostras, com concentração de 0,5% de proteína foram solubilizadas em

0,03% TFA e filtradas em membranas de acetato de celulose 22 μ m (Schleicher & Schüll, Dassel, Dassel, Alemanha).

Para obtenção e análise dos dados, foi utilizado o software *Star Chromatography Workstation* (Varian). Os cromatogramas dos hidrolisados e hidrolisados pré e pós polimerização foram divididos em 3 zonas: (I) alta hidrofiliabilidade, até 8 min, com solução B na concentração entre 10% e 30%; (II) media hidrofiliabilidade, entre 8 e 18 min, com solução B entre 30% e 40% e (III) baixa hidrofiliabilidade, a partir de 18 min, com concentração de solução B acima de 40%.

4.9 Ensaios biológicos e imunoquímicos

A antigenicidade da β -Lg e β -Lg hidrolisada pré e pós polimerização, assim como a β -Lg tratada termicamente polimerizada com TG ou polimerizada com TG na presença de Cys foi avaliada frente aos soros de animais sensibilizados com a β -Lg nativa por meio de Imunoblote. O fluxograma dos experimentos é apresentado na Figura 2.

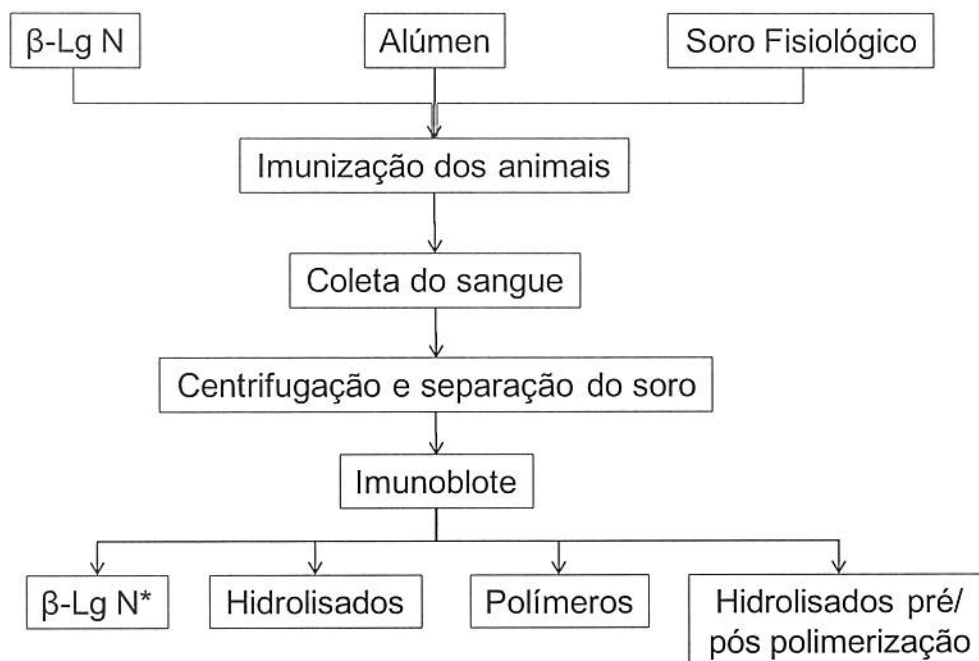


Figura 2. Fluxograma geral do ensaio biológico e imunoquímico. (* β-Lactoglobulina Nativa)

4.9.1 Animais

Foram utilizados 20 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c obtidos do CEMIB da Unicamp, com quatro semanas de vida e mantidos em gaiolas sob condições livre de patógenos (SPF) no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – FCM, da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, com umidade e temperatura controlados. Os animais receberam, *ad libitum*, água autoclavada e ração isenta de β-Lg (padrão-Nuvelab CR-1 (Nuvital Nutrients Ltda, Colombo, PR, Brasil) até a sexta semana de vida.

4.9.2 Fase de sensibilização com β-Lg nativa

A sensibilização dos animais foi realizada segundo o descrito por Copeland (1993) com adaptações de Villas-Boas et al. (2010). Os animais foram divididos

em três grupos. Um grupo 1 foi sensibilizado com β -Lg N (n=10) e os outros dois grupos foram controles, um sensibilizado com adjuvante alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$ 3%) (n=5) (2) e outro com solução salina estéril (0,9% NaCl) (=5) (3). O protocolo de sensibilização está ilustrado na Figura 3. Na primeira etapa de sensibilização (tempo 0), os camundongos do grupo 1 foram sensibilizados via intraperitoneal (i.p.) e subcutânea (s.c.) com um total de 50 μg de amostra adsorvida em 0,2 mL de alumínio por animal. Nos dias 14^o (tempo 1) e 21^o (tempo 2) os animais receberam individualmente dose reforço de 20 e 50 μg de amostra adsorvida em 0,1 mL de solução salina e alumínio, respectivamente. Os grupos controle foram sensibilizados da mesma forma, porém apenas com alumínio 3% ou com solução salina.

Após 30 dias (tempo 3) da sensibilização inicial, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 200 μL de tiopental sódico 2.5% (Cristália, SP, Brasil) para realização da punção cardíaca e coleta de sangue. Depois de retirado o sangue, este foi centrifugado a temperatura ambiente 380 x g/5 min para obtenção do soro.

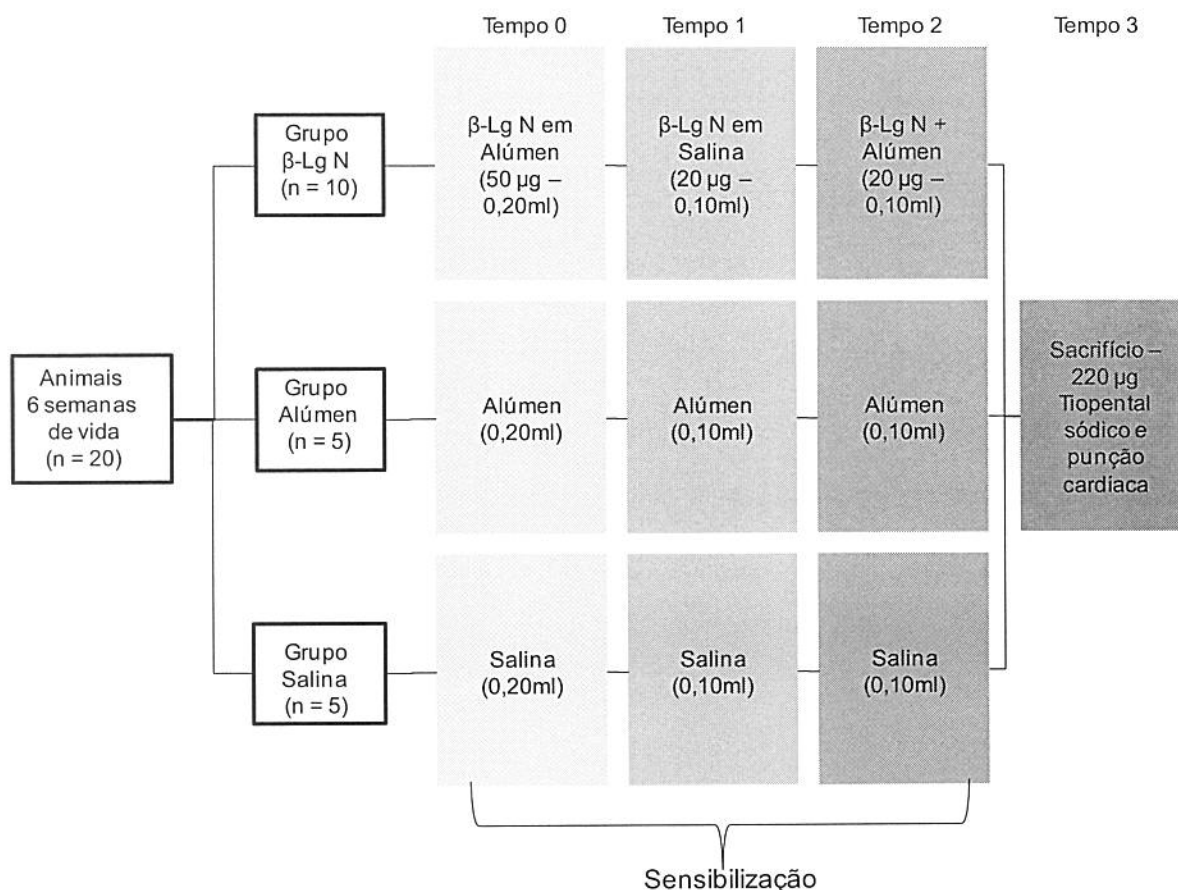


Figura 3. Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais.

4.9.3 Ensaios imunquímicos - Imunoblote

As análises por imunoblote foram realizadas de acordo com método descrito por Copeland (1993). As amostras hidrolisadas ou polimerizadas, assim como as amostras hidrolisadas pré e pós polimerização foram preparadas em tampão de solubilização com agente redutor e separados por eletroforese SDS-PAGE/tricina (SCHAGGER e VON JAGOW, 1987). Após o término da corrida, os géis foram embebidos por 30 min em tampão de transferência (20 mM Tris-HCl, 150 mM de glicina, pH 8,0 e 20% (v/v) de metanol). Para montagem do sistema sanduíche utilizou-se membrana de nitrocelulose e folhas de papel de filtro Whatman®. A transferência das amostras dos géis para a membrana de nitrocelulose foi realizada a 50 mA (amperagem constante) por 120 min. Para

bloqueio dos sítios inespecíficos, foi utilizada solução de albumina sérica bovina – BSA (3% p/v) em PBS (solução salina fosfatada tamponada, pH 7,4) por 120 min.

Para a análise de IgE, as membranas foram incubadas com 10 mL de anticorpo primário (soro) correspondentes a cada grupo de animais, na proporção 1:250 em PBS por 16 horas sob refrigeração em agitador de plataforma (Roquer, E.U.A.), seguida de incubação com 10 mL de anticorpo secundário (Purified Rat Anti-mouse IgE monoclonal antibody, BD Biosciences, EUA) em PBS. As membranas foram incubadas por 120 min com o anticorpo conjugado com peroxidase na proporção 1:50.000 (Anti-Rat IgG Whole molecule) em PBS seguida por incubação de 15 min com DAB já foi definido? (0,05%) em PBS. Utilizou-se solução reveladora ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{NiSO}_4$) e peróxido de hidrogênio para se verificar sítios de ligação da enzima.

4.10 Análise estatística

Os valores de GH foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de teste *t*, ANOVA e teste de Tukey para a análise das diferenças entre as médias. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização

A β -Lg utilizada no experimento contém $89,8 \pm 0,3\%$ de proteína. Este valor foi utilizado como referência para os cálculos da relação E:S nas etapas de hidrólise e polimerização. O perfil eletroforético obtido em sistema SDS-PAGE tricina em meio redutor e o perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR da β -Lg estão apresentados na Figura 4. No sistema SDS-PAGE tricina (Figura 4 - A) observou-se uma banda única correspondente à β -Lg na forma monomérica, com MM de 18,4 kDa. As principais variantes da β -Lg, A e B, apresentam MM de 18,362 kDa e 18,276 kDa, respectivamente, por causa de diferenças nos aminoácidos na posição 64 e 118 (DOUCET e FOEGEDING, 2005). No entanto, na eletroforese em condições desnaturantes, as cargas das variantes se igualam e originam uma única banda. Observou-se, também, uma banda com MM de aproximadamente 36,8 kDa, de intensidade baixa, que pode corresponder ao dímero de β -Lg. O perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR (Figura 4 - B) mostrou apenas um pico, referente à β -Lg, com eluição em aproximadamente 30 min.

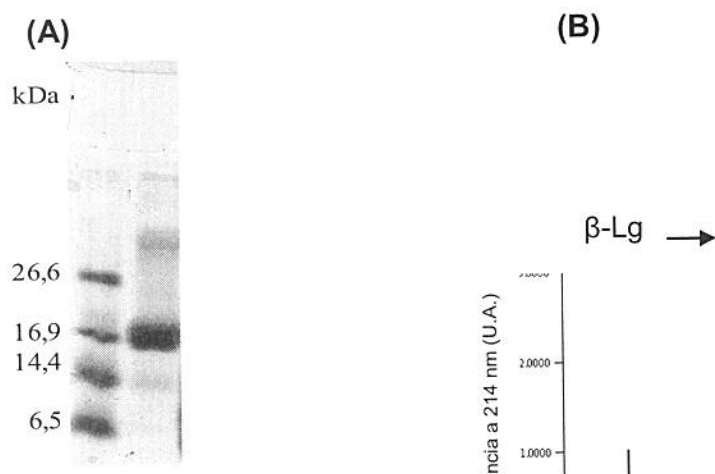


Figura 4. Perfil da β -Lg: (A) em SDS-PAGE tricina. Coluna 1: padrão de massa molecular (1 - 26 kDa), coluna 2: β -Lg. (B) em CLAE-FR, na concentração de 0,1% de proteína.

5.2 Hidrólise Enzimática

A Figura 5 mostra as curvas de hidrólise enzimática da β -Lg tratada (TT) ou não termicamente, hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina, durante 240 min, nas diferentes condições estudadas. Observou-se taxa alta de reação no início da hidrólise, quando grande número de ligações é quebrado, seguida de diminuição da taxa até alcançar um patamar onde não mais foi observado aumento do GH.

As curvas de hidrólise com Alcalase (Figura 5 - A) e bromelina (Figura 5 - C) mostraram diminuição da velocidade da reação a partir dos 50 minutos, permanecendo praticamente constante até o final dos 240 min de reação. As curvas de hidrólise obtidas com a Neutrase (Figura 5 - B) mostraram aumento do GH até aproximadamente 20 min, permanecendo, então, estável até os 240 minutos de reação. Esse perfil da curva de hidrólise pode estar associado a diversos fatores, tais como: (1) diminuição da concentração de ligações peptídicas disponíveis para clivagem; (2) competição entre o substrato original e os peptídeos formados durante a reação; (3) diminuição da atividade enzimática, devido à sua desnaturação (ADLER-NISSEN, 1986; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994; GUERRARD et al., 2002).

Kong et al. (2007) hidrolisaram glúten com Alcalase e Neutrase e obtiveram curvas de hidrólise semelhantes às do presente estudo, com a clivagem máxima observada aos primeiros 30 min de hidrólise. Trabalho de Mutilangi et al. (1995) também mostrou curva de hidrólise para proteína do soro do leite com comportamento muito semelhante ao obtido no presente trabalho.

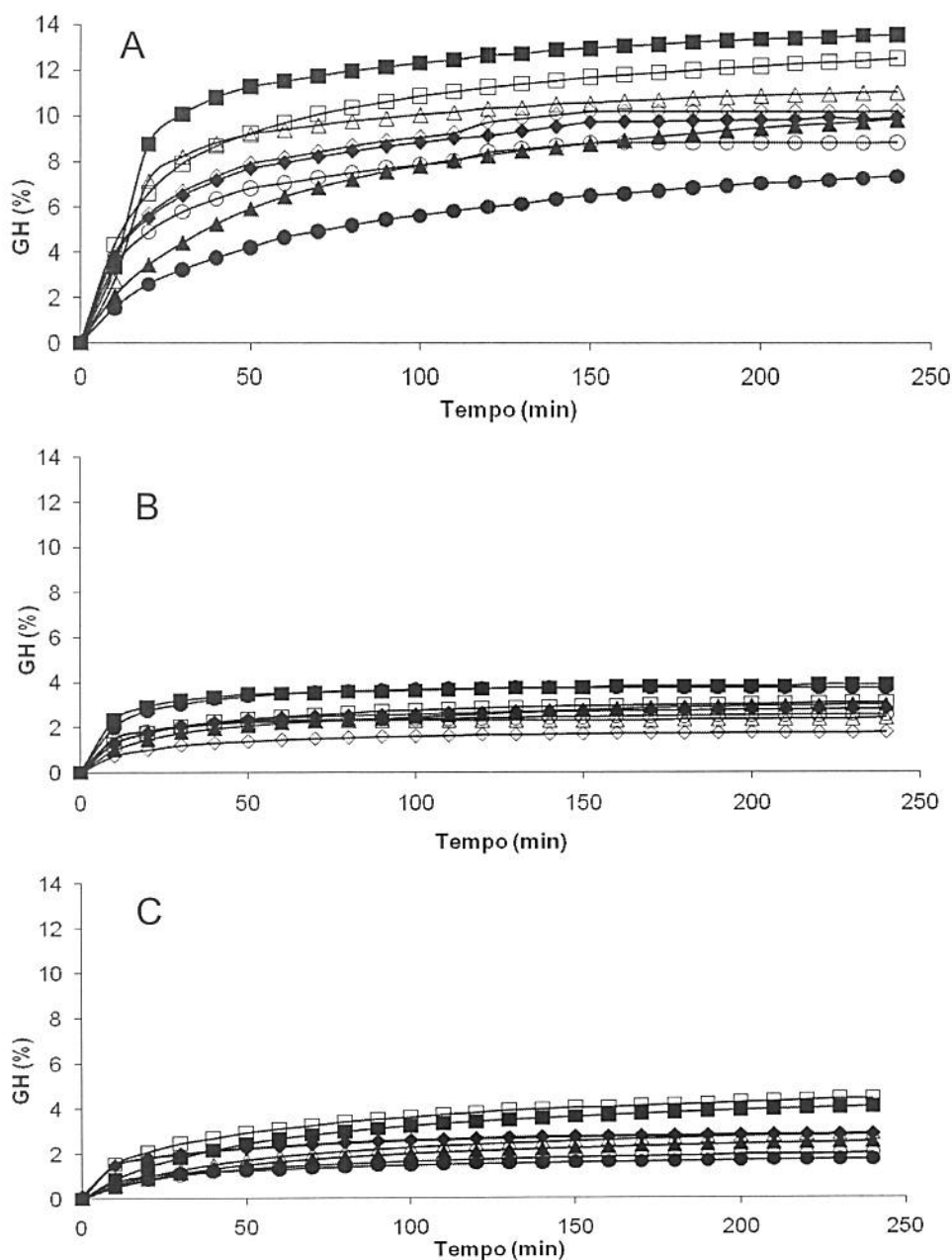


Figura 5. Curva de hidrólise da β -Lactoglobulina nativa (β -Lg) ou tratada termicamente (β -Lg TT) hidrolisada pela Alcalase (A), Neutrase (B) ou bromelina (C) em quatro condições diferentes de concentração de substrato (%) e relação enzima:substrato (U g^{-1}). Símbolos vazios: β -Lg nativa; símbolos cheios: β -Lg TT. (- $\blacktriangle$ -) 3% β -Lg e 10 U g^{-1} , (- $\triangle$ -) 3% β -Lg TT e 10 U g^{-1} , (- $\bullet$ -) 7% β -Lg e 10 U g^{-1} , (- $\circ$ -) 7% β -Lg TT e 10 U g^{-1} , (- $\blacksquare$ -) 3% β -Lg e 25 U g^{-1} , (- $\square$ -) 3% β -Lg TT e 25 U g^{-1} , (- $\blacklozenge$ -) 7% β -Lg e 25 U g^{-1} , (- $\lozenge$ -) 7% β -Lg TT e 25 U g^{-1} .

Na Tabela 2 estão apresentados os valores finais de GH, obtidos após 240 min de reação, da β -Lg tratada ou não termicamente e hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina, em quatro condições diferentes de concentração de substrato e relação E:S, de acordo com o delineamento fatorial utilizado.

Tabela 2. Grau de hidrólise (GH%) final da β -Lg tratada (TT) ou não termicamente hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina em quatro condições diferentes de reação (concentração de β -Lg e relação enzima:substrato).

	Alcalase		Neutrase		Bromelina	
	não tratada	tratada termicamente	não tratada	tratada termicamente	não tratada	tratada termicamente
3% β-Lg 10 U g⁻¹	9,88 $\pm$ 0,46 ^{Ab}	11,10 $\pm$ 0,57 ^{Ab}	3,00 $\pm$ 0,13 ^{Aab}	2,43 $\pm$ 0,39 ^{Aa}	2,48 $\pm$ 0,25 ^{Abc}	2,86 $\pm$ 0,21 ^{Ab}
7% β-Lg 10 U g⁻¹	7,37 $\pm$ 0,52 ^{Bc}	8,89 $\pm$ 0,27 ^{Bc}	2,80 $\pm$ 0,28 ^{Ab}	1,80 $\pm$ 0,42 ^{Aa}	1,71 $\pm$ 0,13 ^{Ac}	2,00 $\pm$ 0,14 ^{Ab}
3% β-Lg 25 U g⁻¹	12,64 $\pm$ 0,76 ^{Ca}	13,55 $\pm$ 0,78 ^{Ca}	3,90 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	3,10 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	4,05 $\pm$ 0,35 ^{Aa}	4,42 $\pm$ 0,4 ^{Aa}
7% β-Lg 25 U g⁻¹	10,04 $\pm$ 0,21 ^{Db}	10,31 $\pm$ 0,28 ^{Dbc}	3,77 $\pm$ 0,18 ^{Aa}	2,55 $\pm$ 0,35 ^{Aa}	2,86 $\pm$ 0,22 ^{Ab}	2,80 $\pm$ 0,28 ^{Ab}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos por cada enzima. A diferença entre as amostras tratadas ou não termicamente foi avaliada por teste *t* e a diferença entre as quatro condições de hidrólise utilizadas foi avaliada por Anova seguido por teste de

Observa-se que para as três enzimas, o maior valor de GH foi obtido utilizando 3% β -Lg e 25 U enzima g⁻¹ e o menor com 7% β -Lg e 10 U enzima g⁻¹. Independente da condição estudada, o maior grau de hidrólise foi obtido com Alcalase, entre 7,27 e 13,55% (Tabela 2). Esses valores foram similares aos encontrados por outros autores (WRÓBLEWSKA et al., 2008; SEVERIN e XIA, 2006; SPELLMAN et al, 2003). O GH obtido com Neutrase ou bromelina variou de 1,71 a 4,05%. Kong et al. (2007) obteve GH próximo de 6% após 240 min de reação de hidrólise do glúten utilizando a Neutrase.

De forma geral, apesar de haver ligeiro aumento no GH quando a β -Lg foi tratada termicamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados ($p > 0,05$) (Tabela 2). O pré-tratamento do substrato pelo calor pode influenciar no grau de hidrólise, devido à desnaturação protéica. Por um lado pode alterar a estrutura tridimensional, expondo ligações e aumentando a acessibilidade do substrato às enzimas (KATO et al., 1985; SCHMIDT e MARKWIJK, 1993), por outro lado a formação de agregados em decorrência da desnaturação pode ter efeito oposto (ROEFS e DE KRUIF, 1994). O tratamento térmico da β -Lg com temperaturas acima de 70 °C leva à exposição de grupos hidrofóbicos e grupos sulfidril livres (SH), que podem se associar formando agregados (IAMETTI et al., 1996; HOFFMANN et al., 1997). A formação de agregados por ligações dissulfeto e/ou interações hidrofóbicas pode, então, dificultar o acesso de enzimas aos sítios de especificidade da proteína.

Schmidt e Markwijk (1993) verificaram que o tratamento (82 °C/ 8 min) não teve influência significativa no tempo de proteólise da α -La e da β -Lg tratadas com pepsina, porém, com a papaína, a β -Lg foi mais rapidamente hidrolisada.

Para definição da condição de hidrólise para cada enzima, foram avaliados os efeitos da concentração de substrato e da relação E:S, assim como o efeito da interação entre esses fatores no GH obtido após 240 min de reação. Essa análise foi realizada somente para as amostras não tratadas termicamente, já que não houve diferença estatística entre as amostras tratadas ou não termicamente. A significância de cada um dos fatores está apresentada na Tabela 3. É possível observar que a concentração de substrato teve efeito significativo no GH tanto com Alcalase quanto com bromelina, não sendo significativa, no entanto, quando a hidrólise foi realizada com a Neutrase. O efeito observado foi negativo, pois ao aumentar a concentração de 3 para 7% de substrato, houve redução no GH para as três enzimas. Já o aumento da relação E:S de 10 para 25 U g⁻¹ teve efeito significativo positivo no GH da β -Lg para as três enzimas. A interação entre os dois fatores (concentração de substrato e relação E:S) não apresentou efeito

significativo no GH para nenhuma das três enzimas. Os quadros com as análises estatísticas estão apresentados no Anexo 2.

Tabela 3. Análise de significância estatística dos fatores de concentração de substrato, relação enzima:substrato (E:S) e da interação entre estes dois fatores para a Alcalase, Neutrase ou bromelina.

Fator	Alcalase	Neutrase	Bromelina
Concentração de Substrato	p < 0,05 (p = 0,0216)	p > 0,05 (p = 0,3745)	p < 0,05 (p = 0,0052)
Relação E:S	p < 0,05 (p = 0,0017)	p < 0,05 (p = 0,0045)	p < 0,05 (p = 0,0015)
Interação concentração e relação E:S	p > 0,05 (p = 0,9489)	p > 0,05 (p = 0,8514)	p > 0,05 (p = 0,2976)

Quando Alcalase foi utilizada, o aumento da concentração de substrato de 3 para 7% levou à diminuição de aproximadamente 22% no GH, já o aumento de 10 para 25 U de enzima g⁻¹ levou ao aumento de aproximadamente 30% do GH. Na hidrólise com a Neutrase também houve aumento de aproximadamente 30% do GH quando a relação E:S passou de 10 para 25 U g⁻¹. No entanto, o GH teve redução de aproximadamente 4%, quando a concentração de substrato passou de 3 para 7%. Com a bromelina foi observado resultado semelhante ao obtido com Alcalase, o aumento da concentração de 3 para 7% levou à diminuição de aproximadamente 30% no grau de hidrólise, já o aumento de 10 para 25 U de enzima g⁻¹ levou ao aumento de 65% no grau de hidrólise. Ao aumentar a concentração de substrato de 3 para 7% de β -Lg na hidrólise com Neutrase, não houve aumento significativo no GH, por isso o efeito substrato não foi significativo para essa enzima (Tabela 3).

Centenaro e Mellado (2008) ao realizar análise fatorial de hidrólise de proteína de pescado com Alcalase observaram que a concentração de enzima influi positivamente no GH, enquanto a concentração de substrato influi negativamente no GH, assim como o observado no presente estudo.

5.3 Avaliação dos hidrolisados por eletroforese

O perfil eletroforético (SDS-PAGE/tricina) das amostras de β -Lg na concentração de 3 ou 7%, tratada ou não termicamente hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina com 10 ou 25 U enzima g⁻¹ está apresentado na Figura 6.

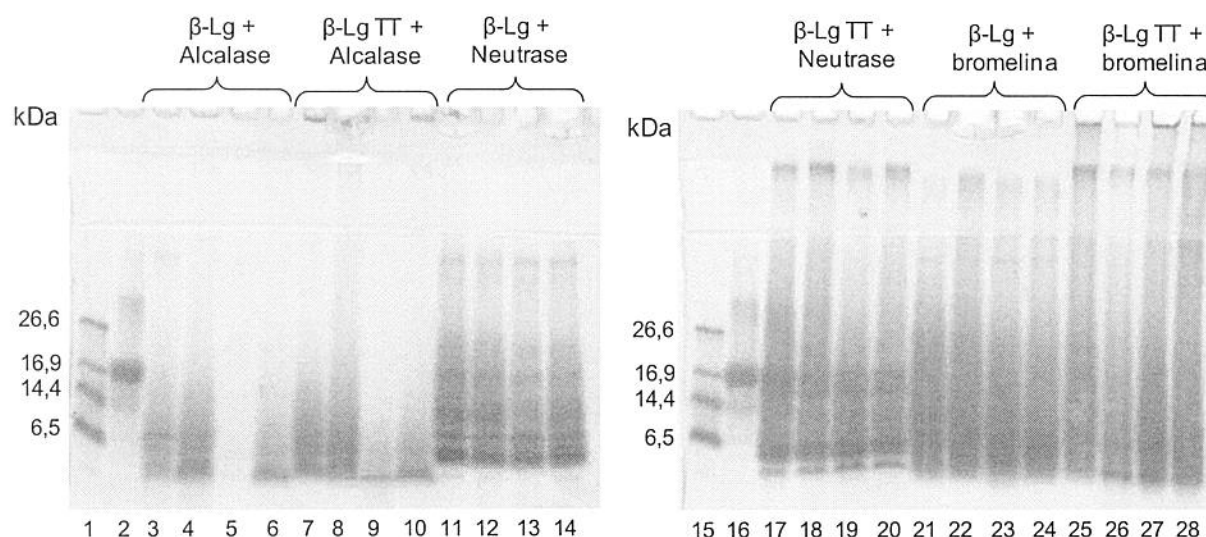


Figura 6. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina em meio redutor, de β -Lg N, β -Lg N ou TT hidrolisada com as enzimas Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina). Colunas: (1) e (15) Padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) e (16) β -Lg N; Hidrolisados com **Alcalase**: (3) 3% β -Lg 10 U g⁻¹; (4) 7% β -Lg 10 U g⁻¹; (5) 3% β -Lg 25 U g⁻¹; (6) 7% β -Lg 25 U g⁻¹; (7) 3% β -Lg TT 10 U g⁻¹; (8) 7% β -Lg TT 10 U g⁻¹; (9) 3% β -Lg TT 25 U g⁻¹; (10) 7% β -Lg TT 25 U g⁻¹; Hidrolisados com **Neutrase** (11) 3% β -Lg 10 U g⁻¹; (12) 7% β -Lg 10 U g⁻¹; (13) 3% β -Lg 25 U g⁻¹; (14) 7% β -Lg 25 U g⁻¹; (17) 3% β -Lg TT 10 U g⁻¹; (18) 7% β -Lg TT 10 U g⁻¹; (19) 3% β -Lg TT 25 U g⁻¹; (20) 7% β -Lg TT 25 U g⁻¹; Hidrolisados com **bromelina** (21) 3% β -Lg 10 U g⁻¹; (22) 7% β -Lg 10 U g⁻¹; (23) 3% β -Lg 25 U g⁻¹; (24) 7% β -Lg 25 U g⁻¹; (25) 3% β -Lg TT 10 U g⁻¹; (26) 7% β -Lg TT 10 U g⁻¹; (27) 3% β -Lg TT 25 U g⁻¹; (28) 7% β -Lg TT 25 U g⁻¹.

Nos perfis dos hidrolisados com Alcalase, observa-se produtos de MM baixa (< 6,5 kDa) e o quase completo desaparecimento de bandas com MM acima desta região, exceto para a condição 7% β -Lg tratada ou não termicamente e 10 U enzima g⁻¹ (Figura 6, colunas 4 e 8), que apresentou peptídeos de MM maior ao longo do gel. Este perfil está de acordo com os valores de GH obtidos para essa condição de experimento, que foram os menores valores obtidos dentre as quatro condições para Alcalase (Tabela 2).

Os hidrolisados com Neutrase apresentaram bandas correspondentes ao monômero da β -Lg, e também ao que parece corresponder ao seu dímero (Figura

6, colunas 11 - 14). Bandas de MM alta, que não penetraram no gel espaçador, foram observadas nos hidrolisados obtidos da β -Lg tratada termicamente antes da hidrólise (Figura 6, colunas 17 - 20), sugerindo que agregados formados no tratamento térmico foram resistentes à ação desta enzima.

Nos perfis dos hidrolisados com bromelina, foi observada uma mancha difusa por toda a extensão do gel e uma banda possivelmente correspondente ao dímero da β -Lg visualizada nas amostras que não foram tratadas termicamente antes da hidrólise (Figura 6, colunas 21 - 24). Assim como para a Neutrase, foi observado material de MM alta que não penetrou no gel espaçador nos hidrolisados obtidos da β -Lg tratada termicamente antes da hidrólise (Figura 6, colunas 25 - 28).

Schmidt e Poll (1991) verificaram fragmentos em torno de 15 kDa em hidrolisados de β -Lg com bromelina. Otte et al. (1997), ao contrário, relataram que a β -Lg é resistente à bromelina, pois não observaram bandas com MM menor que a da β -Lg no perfil eletroforético dos hidrolisado com esta enzima.

Para realização dos experimentos de polimerização pós e pré hidrólise da β -Lg, apenas uma condição de hidrólise foi selecionada, tendo em vista tanto o maior GH assim como o perfil eletroforético. Assim, para o estudo da polimerização pós hidrólise, optou-se por utilizar 3% de β -Lg, não tratada termicamente, e 25 U enzima g⁻¹ de proteína, que foi a condição que apresentou, para todas as enzimas, menor quantidade de proteína não hidrolisada (avaliada pelo perfil eletroforético) e maior GH final ($p < 0,05$) para as enzimas Alcalase e bromelina (Tabela 2), dentre as condições avaliadas no estudo.

5.4 Obtenção e caracterização dos polímeros pós hidrólise

Os hidrolisados da β -Lg com as enzimas Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina), obtidos sob a condição selecionada anteriormente, 3% de substrato e 25 U de enzima g^{-1} , foram tratados com a enzima TG. As condições utilizadas na polimerização foram: 7% de substrato e 10 ou 25 U TG g^{-1} . Os perfis eletroforéticos da β -Lg polimerizada pós hidrólise com Alcalase, Neutrase ou bromelina estão apresentados na Figura 7.

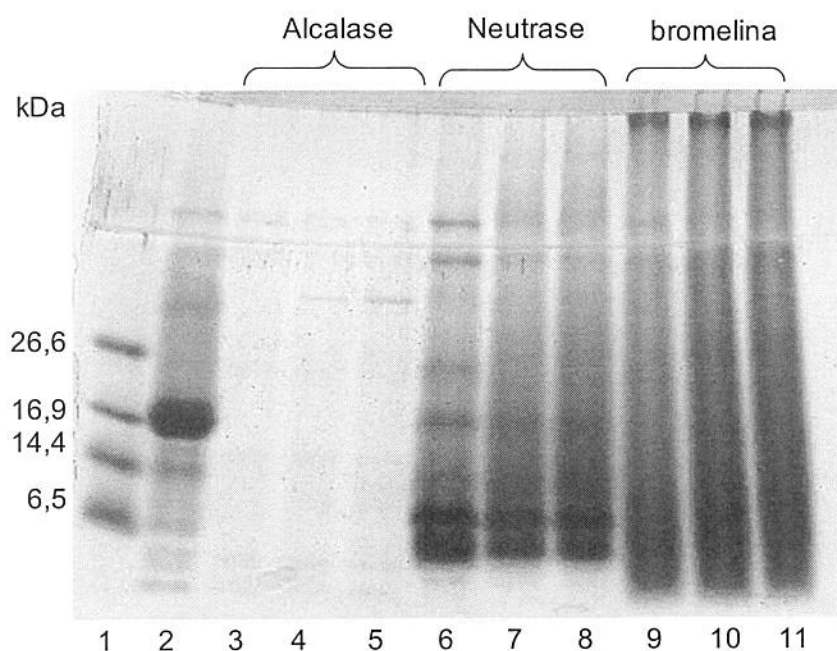


Figura 7. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina em meio redutor da β -Lg nativa (β -Lg N) e β -Lg hidrolisada com as enzimas Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina) e polimerizada pela TG com 10 ou 25 U g^{-1} de proteína. Colunas: (1) Padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg N; (3) β -Lg Alcalase; (4) β -Lg Alcalase e 10 U TG g^{-1} ; (5) β -Lg Alcalase e 25 U TG g^{-1} ; (6) β -Lg Neutrase; (7) β -Lg Neutrase e 10 U TG g^{-1} ; (8) β -Lg Neutrase e 25 U TG g^{-1} ; (9) β -Lg bromelina; (10) β -Lg bromelina e 10 U TG g^{-1} ; (11) β -Lg bromelina e 25 U TG g^{-1} .

Comparando-se os perfis dos hidrolisados com Alcalase ou bromelina antes e após a polimerização com a TG, não foi observado aumento da MM (Figura 7,

colunas 3 – 5 e 9 – 11). No entanto, no perfil do hidrolisado com Neutrase após polimerização com a TG, observou-se diminuição da intensidade das bandas correspondentes ao monômero da β -Lg, sugerindo que apesar de grande parte da β -Lg que restou não ter sido modificada pela TG, possivelmente houve a formação de produtos polimerizados com diferentes massas moleculares (Figura 7, colunas 6 - 8).

Estes resultados estão em concordância com o descrito por Flanagan e Fitzgerald (2002), que não observaram aumento da MM ao submeterem hidrolisado de caseinato de sódio com a enzima Protamex à polimerização com a TG. Os autores, porém, não descartaram a possibilidade de ter havido formação de ligação cruzada entre os produtos de baixa MM, que continuaram dentro da faixa de MM dos hidrolisados. Lorenzen et al. (1998) verificaram aumento discreto na MM de hidrolisados de caseinato de sódio com tripsina, submetidos à polimerização com TG.

Os perfis cromatográficos (CLAE-FR) das amostras polimerizadas pós hidrólise com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina estão apresentados na Figura 8.

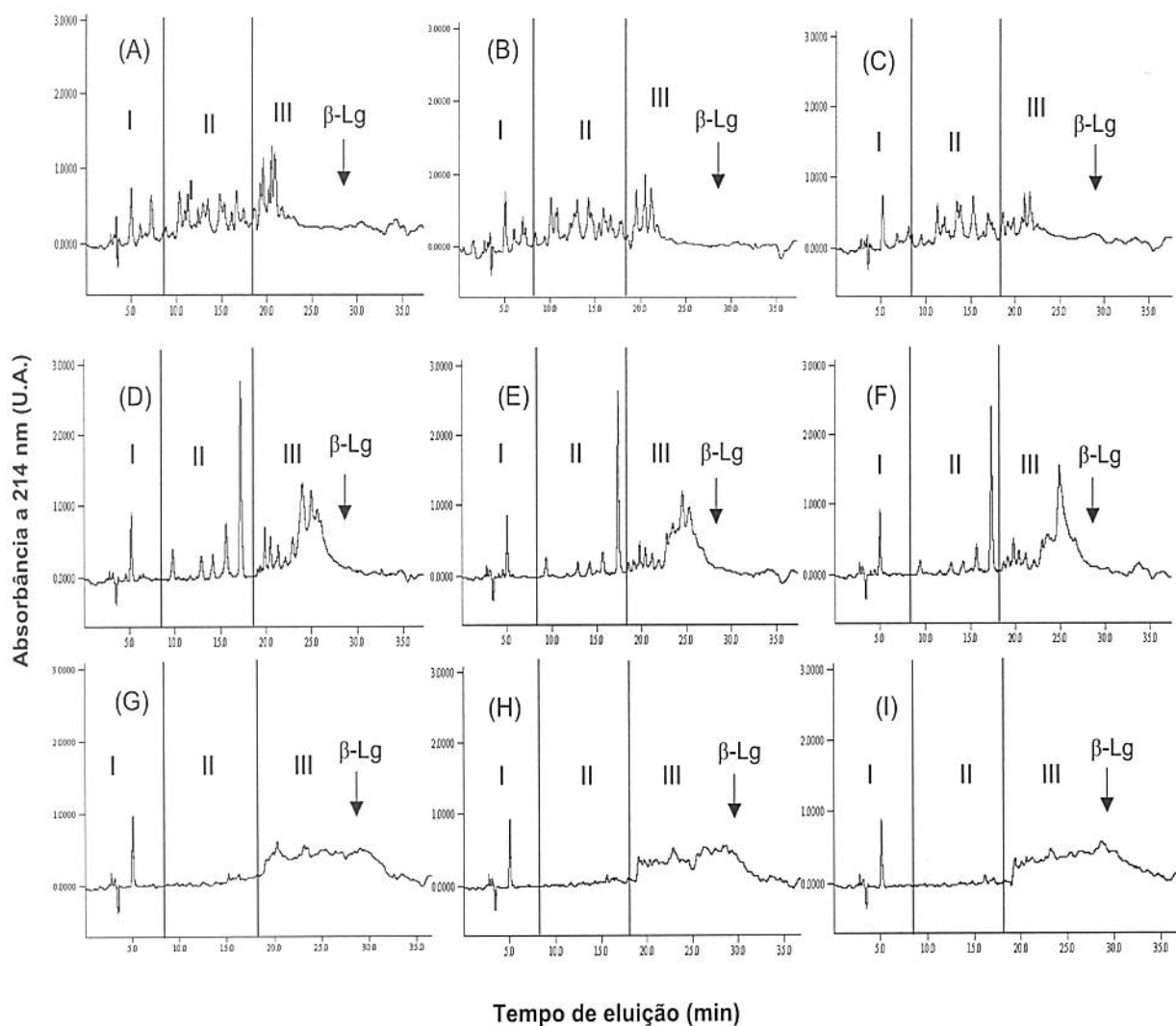


Figura 8: Perfil cromatográfico de β -Lg hidrolisada com as enzimas Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina) e polimerizada pós hidrólise: (A) β -Lg Alcalase; (B) β -Lg Alcalase e 10 U TG g⁻¹; (C) β -Lg Alcalase e 25 U TG g⁻¹; (D) β -Lg Neutrase; (E) β -Lg Neutrase e 10 U TG g⁻¹; (F) β -Lg Neutrase e 25 U TG g⁻¹; (G) β -Lg bromelina; (H) β -Lg bromelina e 10 U TG g⁻¹; (I) β -Lg bromelina e 25 U TG g⁻¹. Região I: alta hidrofiliicidade, região II: média hidrofiliicidade, região III: baixa hidrofiliicidade.

No cromatograma do hidrolisado com Alcalase observa-se grande número de picos distribuídos nas três regiões do cromatograma, de alta, média e baixa hidrofiliicidade (Figura 8 - A). Este perfil deve-se à ampla especificidade da Alcalase, que cliva ligações peptídicas nas regiões correspondentes aos resíduos

de serina, glicina e aminoácidos aromáticos (PENÃS et al., 2006). A β -Lg possui 21 possibilidades de clivagem pela Alcalase, sete serinas, quatro glicinas e dez aminoácidos aromáticos, podendo gerar peptídeos de diversos tamanhos, com maior hidrofiliidade, no caso de peptídeos menores.

Os cromatogramas do hidrolisado com Alcalase polimerizado com 10 U TG g^{-1} (Figura 8 - B) ou 25 U TG g^{-1} (Figura 8 - C) apresentam-se semelhantes ao da amostra não polimerizada, sugerindo que a TG teve pouca ou nenhuma ação sobre a β -Lg hidrolisada com a Alcalase para formação de produtos de MM maior. Os hidrolisados da β -Lg com a Neutrase (Figura 8 - D) apresentaram caráter menos hidrofílico do que o obtido pela ação da Alcalase (Figura 8 - A). Estes resultados devem-se possivelmente à maior especificidade da Neutrase, com sítios de clivagem que abrangem preferencialmente ligações envolvendo aminoácidos hidrofóbicos (PENÃS et al., 2006). Após a polimerização do hidrolisado pela Neutrase com a TG, houve diminuição da intensidade dos picos da região II dos cromatogramas (Figura 8 - E e F) em relação à amostra somente hidrolisada (Figura 8 - D), indicando polimerização.

O hidrolisado com bromelina apresentou picos somente nas regiões de baixa hidrofiliidade (Figura 8 - G), indicando a presença de peptídeos de maior MM e/ou mais hidrofóbicos que os obtidos com Alcalase ou Neutrase. A bromelina cliva ligações contendo tanto resíduos aromáticos (fenilalanina e tirosina) quanto básicos (lisina e arginina) (ADLER-NISSEN, 1986), que somam um total de 26 resíduos na β -Lg. No entanto, estes sítios possivelmente não estavam todos acessíveis para a ação da bromelina, visto que a hidrólise gerou poucos picos (Figura 8 - G) se comparada à hidrólise com Alcalase (Figura 8 - A). Os perfis cromatográficos dos polímeros do hidrolisado com bromelina são semelhantes ao perfil da amostra somente hidrolisada (Figura 8 - H e I).

Nos cromatogramas dos hidrolisados com Neutase tratados ou não com TG (Figura 8 - D, E e F), não foi observado pico referente à β -Lg, ao contrário do que foi observado no perfil eletroforético (Figura 7), que mostrou a presença de β -Lg

na forma monomérica, no perfil do hidrolisado com Neutrase (Figura 7, coluna 6). Possivelmente, na preparação destas amostras para a análise cromatográfica, a β -Lg residual não foi solubilizada ou formou agregados, não eluindo na posição da β -Lg.

Como apenas pequenas ou nenhuma alterações foram observadas nos perfis eletroforéticos e cromatográficos dos hidrolisados com Alcalase, Neutrase ou bromelina devido à ação da TG (10 ou 25 U TG g⁻¹), decidiu-se avaliar se houve alteração do GH dessas amostras pela determinação dos grupos amino livres (método TNBS), pois com a polimerização deveria ocorrer a diminuição destes grupos, e consequentemente do valor de GH.

Os resultados (Tabela 4) mostram que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) do GH de todas as amostras hidrolisadas tratadas com TG, quando comparadas com as amostras somente hidrolisadas, indicando que houve polimerização. Estes resultados foram mais evidentes para as amostras tratadas com bromelina, que tiveram o GH diminuído em 63 e 53% quando as amostras foram polimerizadas com 10 ou 25 U TG g⁻¹, respectivamente. A diferença no GH foi significativa ($p < 0,05$) apenas para as amostras hidrolisadas com Alcalase pré polimerização com 10 ou 25 U TG g⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4. Grau de hidrólise (GH%), determinado pelo método de TNBS, da β -Lg hidrolisada pelas enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina e polimerizada pós hidrólise com a enzima transglutaminase (TG).

Tratamento	GH (%)		
	Alcalase	Neutrase	Bromelina
Hidrólise	34,34 $\pm$ 1,47 ^a	9,73 $\pm$ 0,37 ^a	3,7 $\pm$ 0,89 ^a
Polimerização pós hidrólise (0 U TG g ⁻¹)	33,17 $\pm$ 1,23 ^a	8,51 $\pm$ 0,63 ^a	3,9 $\pm$ 0,38 ^a
Polimerização pós hidrólise (10 U TG g ⁻¹)	25,9 $\pm$ 0,02 ^b	5,5 $\pm$ 0,52 ^b	1,36 $\pm$ 0,07 ^b
Polimerização pós hidrólise (25 U TG g ⁻¹)	31,02 $\pm$ 0,91 ^c	5,57 $\pm$ 0,22 ^b	1,73 $\pm$ 0,36 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$), avaliado por teste de Tukey. (TG) transglutaminase.

Estes resultados mostram que apesar dos perfis eletroforéticos e cromatográficos das amostras polimerizadas pós hidrólise não apresentarem diferenças em relação às amostras hidrolisadas, a diminuição do GH sugere que houve a formação de ligação cruzada catalisada pela TG.

Em vista dos resultados obtidos no presente estudo e do estudo de Fernandes (2009), que também observou que o aumento da concentração de TG de 10 para 25 U g⁻¹ não resultou em aumento significativo do grau de polimerização da β -Lg, nas etapas de hidrólise pós polimerização (item 5,4), e avaliação da antigenicidade (item 5,5), optou-se pela utilização de 10 U de TG g⁻¹.

5.5 Obtenção e caracterização dos hidrolisados pós polimerização

Algumas proteínas como a β -Lg, que é compacta e globular, precisam de um pré-tratamento para abrir a estrutura e facilitar a ligação cruzada (DE JONG E KOPPELMAN, 2002). A desnaturação térmica ou química da β -Lg pode facilitar a

atuação da TG (EISSA et al., 2006). Portanto, no presente estudo, para obtenção da β -Lg polimerizada, a β -Lg foi desnaturada previamente por tratamento térmico (80 °C/60 min) ou pela ação da Cys (0,1 mol L⁻¹), condições já utilizadas por Villas-Boas (2008) e Fernandes (2009). As amostras polimerizadas foram posteriormente submetidas à hidrólise pelas enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina na mesma condição escolhida anteriormente, 3% de substrato e 25 U enzima g⁻¹.

O GH das amostras hidrolisadas pós polimerização com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Grau de hidrólise (GH%) das amostras de β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG (β -Lg TT TG) e β -Lg polimerizada com TG na presença de cisteína (β -Lg Cys TG) hidrolisados pelas enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina.

Polímeros	GH (%)		
	Alcalase	Neutrase	Bromelina
β-Lg TT TG	11,12 $\pm$ 0,17 ^a	3,35 $\pm$ 0,78 ^a	4,12 $\pm$ 0,12 ^a
β-Lg Cys TG	16,05 $\pm$ 0,64 ^b	2,8 $\pm$ 0,14 ^a	6,09 $\pm$ 0,41 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$), avaliado por teste *t*.

O maior GH foi obtido com a β -Lg polimerizada com TG na presença de Cys (β -Lg Cys TG) com Alcalase, 16,05%, que foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o obtido com a β -Lg tratada termicamente polimerizada (β -Lg TT TG), 11,12% (Tabela 5). Possivelmente, isso ocorreu devido ao diferente acesso da enzima aos sítios expostos pelo tratamento térmico ou adição de Cys. O GH da β -Lg Cys TG com Alcalase ou bromelina foi maior do que o obtido com a β -Lg não polimerizada (Tabela 3).²

Os perfis eletroforéticos da β -Lg TT TG, ou da β -Lg Cys TG, assim como os das amostras hidrolisadas pós polimerização com Alcalase, Neutrase ou bromelina estão apresentados na Figura 9.

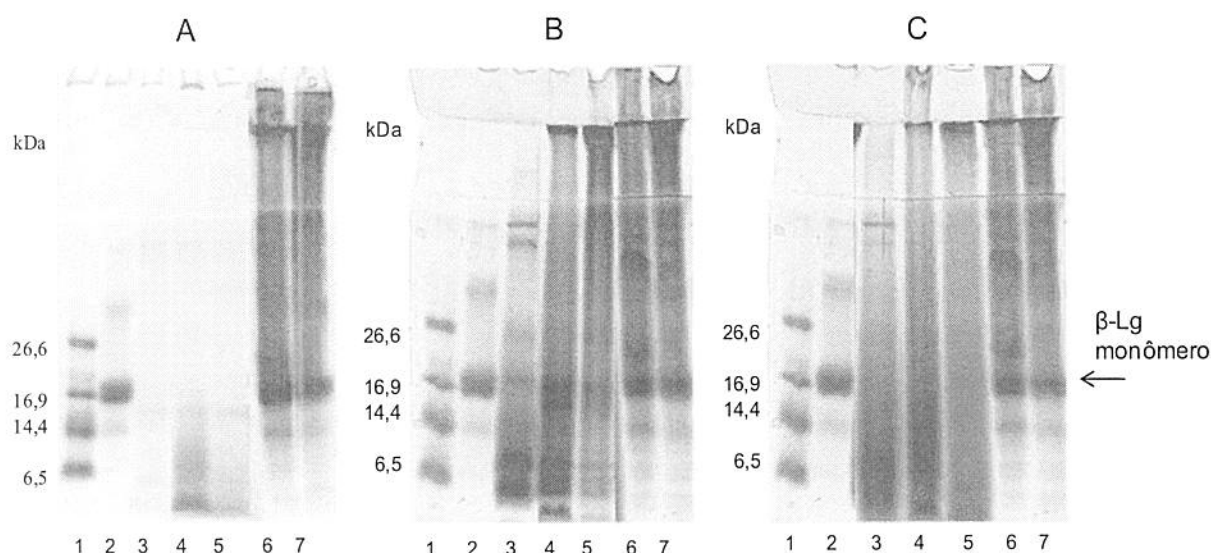


Figura 9. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina em meio redutor, de β -Lg N, β -Lg polimerizada com TG e hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina: colunas (1) padrão de massa molar (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg N; (6) β -Lg TT TG; (7) β -Lg Cys TG. **A** – (3) β -Lg Alcalase; (4) β -Lg TT TG Alcalase; (5) β -Lg Cys TG Alcalase. **B** - (3) β -Lg Neutrase; (4) β -Lg TT TG Neutrase; (5) β -Lg Cys TG Neutrase. **C** - (3) β -Lg bromelina; (4) β -Lg TT TG bromelina; (5) β -Lg Cys TG bromelina.

As amostras polimerizadas por ambos os processos - β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG (Figura 9, colunas 6 e 7) - apresentaram diminuição da intensidade da banda referente ao monômero da β -Lg e o aparecimento de material que não conseguiu penetrar no gel de empilhamento, além de outras bandas localizadas no início do gel de separação, que indicam a formação de polímeros de MM alta. Em toda a extensão do gel de separação, observou-se a presença de bandas largas e difusas, indicando produtos polimerizados com MM diferentes (Figura 9, colunas 6 e 7). Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Villas-

Boas et al. (2010) e Fernandes (2009), que polimerizaram a β -Lg nestas mesmas condições. Fort et al. (2007) verificaram também que o aminoácido Cys foi efetivo para aumentar a ação da TG em proteínas globulares como as do plasma, levando à formação de polímeros de MM alta por ligações cruzadas covalentes. A desnaturação por agente redutor altera a estrutura da β -Lg ao clivar as duas pontes dissulfeto presentes na molécula nativa: (Cys₆₆ – Cys₁₆₀) que liga o arco C – D à região carboxi-terminal e, (Cys₁₀₆ – Cys₁₁₉) que liga os filamentos G – H na molécula, facilitando a ação da enzima TG para formação de polímeros (EISSA et al., 2006).

Quando a β -Lg polimerizada foi hidrolisada com Alcalase, houve o completo desaparecimento de produtos de MM alta (Figura 9 - A, colunas 4 e 5). A hidrólise desses polímeros com Alcalase resultou na formação de peptídeos menores que 17 kDa. As amostras de β -Lg polimerizadas submetidas à hidrólise com Neutrase ou bromelina continuaram apresentando material de MM alta, principalmente quando hidrolisadas com Neutrase, que mostraram ainda grande quantidade de produtos no início do gel espaçador (Figura 9 - B, colunas 4 e 5) além de produtos de MM menor que 17 kDa.

No presente estudo amostras polimerizadas pré ou pós hidrólise apresentaram perfis eletroforéticos diferentes. Lorenzen et al. (1998) relataram a presença de material de MM alta, indicando residual de polímeros não hidrolisados ou parcialmente hidrolisados nos cromatogramas de hidrolisados com tripsina de polimerizados de caseinato de sódio com TG, mostrando que a proteólise de produtos polimerizados com TG foi apenas parcial. O mesmo foi observado no presente estudo no caso dos polímeros hidrolisados com Neutrase ou bromelina. Flanagan e Fitzgerald (2002), ao contrário, observaram que a polimerização com TG, pré ou pós hidrólise, de caseinato de sódio resultou em peptídeos de MM aparentemente semelhantes, avaliado por eletroforese. Os autores atribuíram essa semelhança ao fato de que a ligação isopeptídica ϵ -(γ -glutamil)lisina formada

nas amostras polimerizadas não dificultou a atividade proteolítica das enzimas utilizadas, no caso de hidrólise pós polimerização.

Na Figura 10 estão apresentados os perfis dos cromatográficos (CLAE-FR) das amostras hidrolisadas pós polimerização com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina.

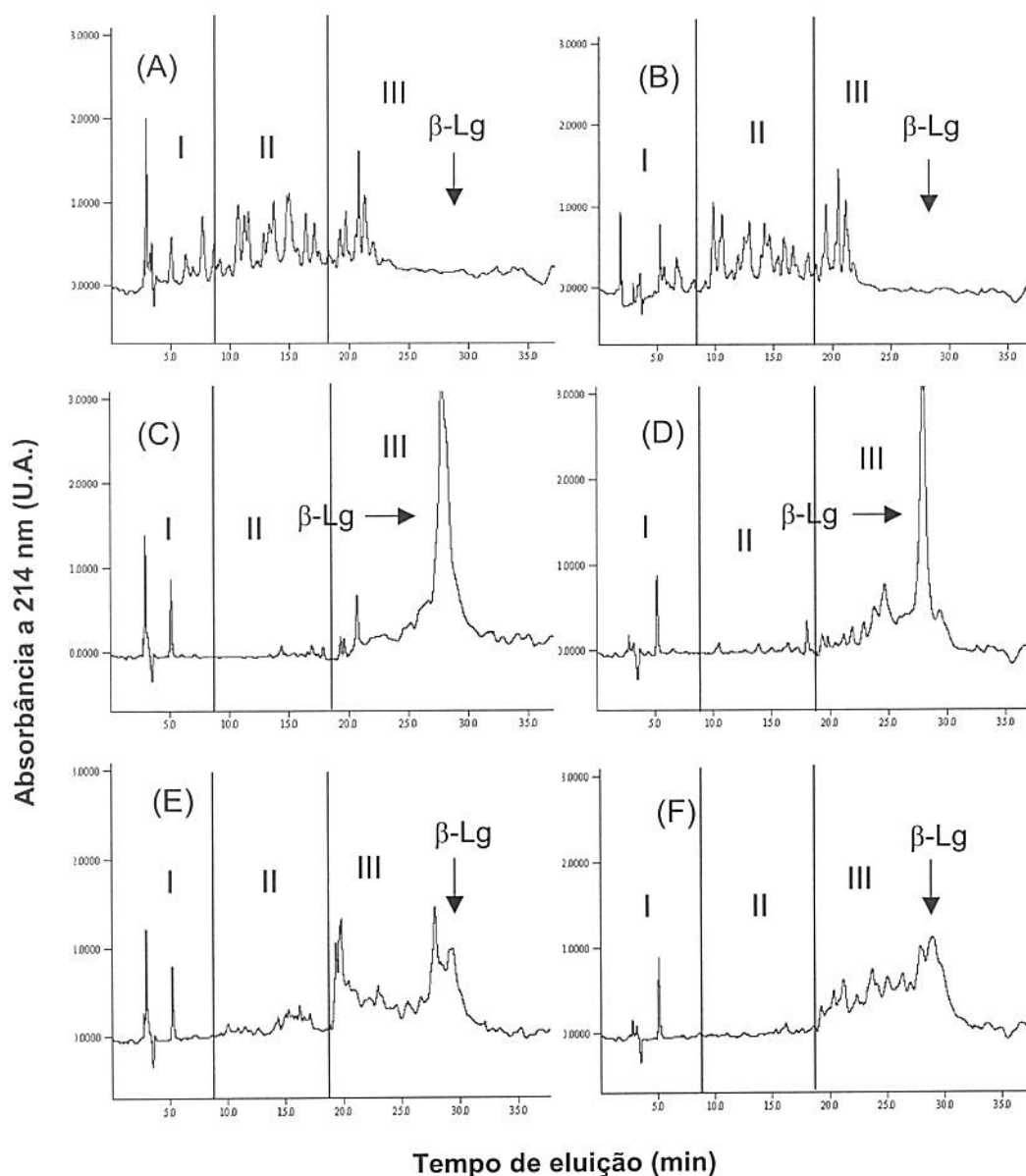


Figura 10: Perfil cromatográfico de β -Lg hidrolisada com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina pós polimerização com TG. (A) β -Lg TT TG Alcalase; (B) β -Lg Cys TG Alcalase; (C) β -Lg TT TG Neutrase; (D) β -Lg Cys TG Neutrase; (E) β -Lg TT TG bromelina; (F) β -Lg Cys TG bromelina. Região I: alta hidrofiliicidade, região II: média hidrofiliicidade, região III: baixa hidrofiliicidade.

Os cromatogramas dos hidrolisados com Alcalase pós polimerização (Figura 10 – A e B) apresentaram inúmeros picos nas regiões de hidrofiliicidade

alta e média, indicando que houve hidrólise extensa dos polímeros, tanto da β -Lg TT TG, quanto da β -Lg Cys TG. Não foi observado em nenhum dos dois cromatogramas (Figura 10 – A e B) pico referente à β -Lg, assim como no cromatograma da amostra somente hidrolisada pela Alcalase (Figura 8 – A).

Os polímeros hidrolisados com Neutrase apresentaram pico bem definido da β -Lg em seus perfis cromatográficos (Figura 10 - C e D), com menor quantidade de picos nas regiões I e II, comparado ao perfil obtido com Alcalase, indicando hidrólise menos eficiente.

Os cromatogramas das amostras polimerizadas e hidrolisadas com a bromelina (Figura 10 – E e F) apresentam maior número de picos na porção menos hidrofílica e com maior intensidade e mais bem resolvidos do que o perfil da amostra somente hidrolisada com esta enzima (Figura 8 - G). Os hidrolisados pós polimerização, tanto na presença de Cys quanto após tratamento térmico, apresentam pico referente à β -Lg (Figura 10 – E e F).

Os cromatogramas das amostras hidrolisadas pré polimerização apresentaram perfis diferentes em relação às amostras que sofreram hidrólise pós polimerização. Flanagan e FitzGerald (2002) observaram que a hidrólise do caseinato de sódio pré ou pós incubação com TG resultou em picos que eluíram mais rapidamente, indicando diminuição na hidrofobicidade das amostras. Como mostrado anteriormente, a polimerização pós hidrólise não resultou em produtos com perfis eletroforéticos e cromatográficos diferentes do hidrolisado. Já a hidrólise pós polimerização levou à formação de peptídeos com perfis diferentes daqueles da β -Lg somente hidrolisada.

5.6 Avaliação da antigenicidade por Imunoblote

A antigenicidade das amostras β -Lg N, hidrolisados, polimerizados pré ou pós hidrólise e somente polimerizados foi avaliada por Imunoblote quanto à resposta de IgE específica anti- β -Lg, utilizando *pool* de soro de animais

sensibilizados com β -Lg N. Os soros dos animais sensibilizados com alúmen ou solução salina estéreis foram utilizados como controle. O reconhecimento das amostras pelas IgE específicas foi avaliado visualmente pela intensidade das bandas marcadas na membrana de nitrocelulose (JANEWAY et al., 2002).

A resposta dos anticorpos dos soros dos animais sensibilizados com alúmen ou solução salina frente às amostras citadas no parágrafo anterior estão apresentadas na Figura 11. Observou-se que nenhuma banda foi marcada nas membranas, indicando que os *pool* de soro dos grupos controle não mostraram resposta contra as amostras testadas (Figura 11).

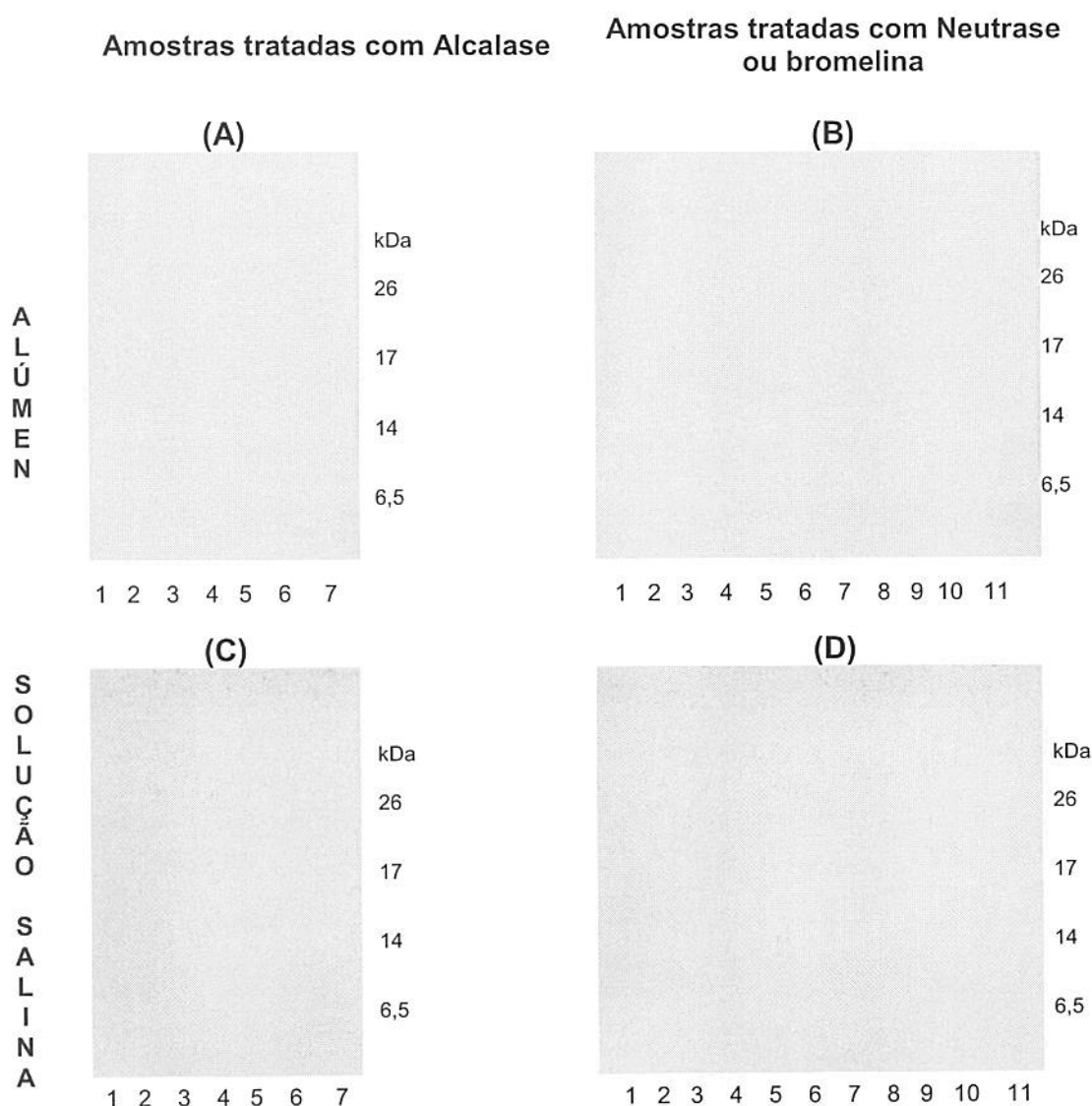


Figura 11. Reatividade de IgE específica do pool de soro dos animais sensibilizados com: Alúmen (A e B); Solução salina (C e D), frente as amostras hidrolisadas com Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrased (β -Lg Neutrased) ou bromelina (β -Lg bromelina) pré e pós polimerização com TG, assim como a β -Lg TT polimerizada e polimerizada na presença de Cys. Figura A e C - colunas: (1) β -Lg N; (2) β -Lg Alcalase; (3) β -Lg Alcalase e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Alcalase; (5) β -Lg Cys TG Alcalase (6) β -Lg TT TG; (7) β -Lg Cys TG. Figuras B e D – colunas: (1) β -Lg N; (2) β -Lg Neutrased; (3) β -Lg Neutrased e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Neutrased; (5) β -Lg Cys TG Neutrased; (6) β -Lg bromelina; (7) β -Lg bromelina e 10 U TG g⁻¹; (8) β -Lg TT TG bromelina; (9) β -Lg Cys TG bromelina (10) β -Lg TT TG; (11) β -Lg Cys TG.

A análise de IgE específica proveniente do soro dos animais sensibilizados com β -Lg N (anti- β -Lg) frente as amostras hidrolisadas com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina e polimerizadas pré e pós hidrólise com TG, assim como as amostras somente polimerizadas está apresentada na Figura 12.

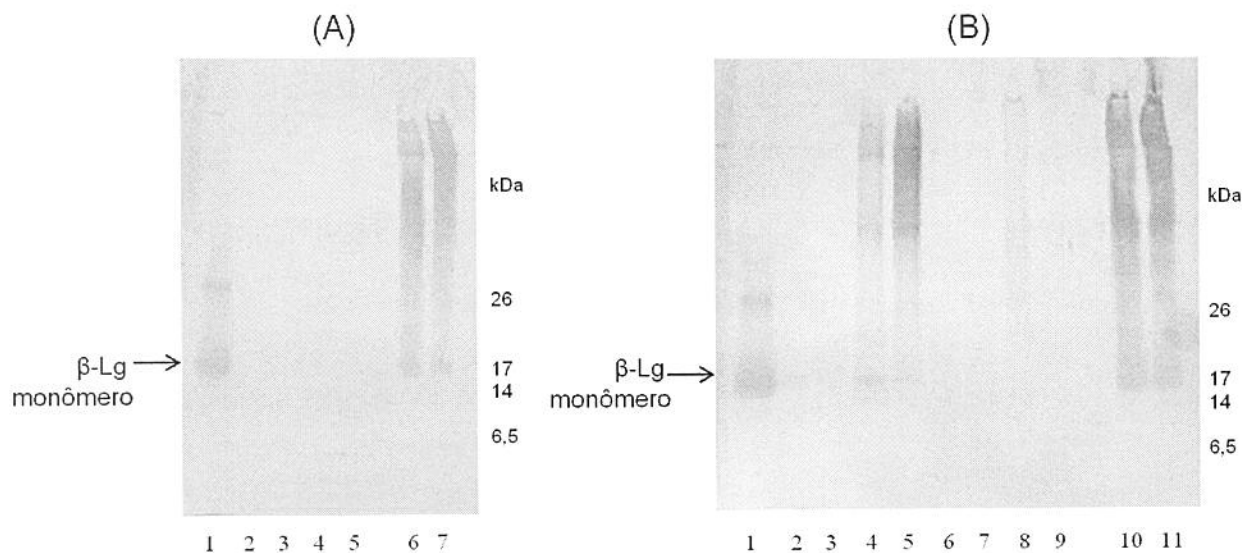


Figura 12. Reatividade de IgE específica de pool dos soros dos animais sensibilizados com β -Lg N frente as amostras hidrolisadas com Alcalase (β -Lg Alcalase), Neutrase (β -Lg Neutrase) ou bromelina (β -Lg bromelina) pré e pós polimerização com TG, assim como a β -Lg TT polimerizada e polimerizada na presença de Cys pré e pós polimerização com TG. **A** - (1) β -Lg N; (2) β -Lg Alcalase; (3) β -Lg Alcalase e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Alcalase; (5) β -Lg Cys TG Alcalase. **B** - (1) β -Lg N; (2) β -Lg Neutrase; (3) β -Lg Neutrase e 10 U TG g⁻¹; (4) β -Lg TT TG Neutrase; (5) β -Lg Cys TG Neutrase; (6) β -Lg bromelina; (7) β -Lg bromelina e 10 U TG g⁻¹; (8) β -Lg TT TG bromelina; (9) β -Lg Cys TG bromelina; (10) β -Lg TT TG; (11) β -Lg Cys TG.

Para a β -Lg hidrolisada com Alcalase (Figura 12A, coluna 2) não foi observada marcação de banda na membrana, indicando que essa amostra não reagiu com o soro anti- β -Lg, sugerindo baixa antigenicidade. Possivelmente a formação de peptídeos de MM baixa levou à clivagem dos epítomos. Wróblewska et al. (2004) também verificaram diminuição na imunoreatividade tanto da α -La

como da β -Lg com hidrólise das proteínas do soro de leite realizada sequencialmente com Alcalase e papaína, avaliada por Imunoblote e ELISA, com utilização de anticorpos anti- α -La e anti- β -Lg. Porém os autores observaram que, embora a antigenicidade tivesse diminuído, epítopos alergênicos ainda estavam presentes em todas as frações analisadas.

Para o hidrolisado com Neutrase, observou-se que embora os peptídeos estejam distribuídos em uma ampla faixa de MM, com predominância na faixa menor que 18,4 (Figura 9B, coluna 3), apenas a banda na posição referente ao monômero da β -Lg foi marcada (Figura 12B, coluna 2). Peptídeos com MM alta não foram reconhecidos, indicando que os epítopos foram modificados e/ou mascarados. Embora alguns estudos indiquem que peptídeos com MM < 5 kDa sejam menos antigênicos (VAN BERESTEIJN et al., 1994; SVINNENG et al., 2000), outros fatores estão envolvidos na resposta como estrutura molecular, sequência aminoácida e rearranjo molecular decorrente de algum processo (CHICÓN et al., 2008a; CHICÓN et al., 2008b).

Resultados semelhantes ao presente estudo foram relatados em outros trabalhos com proteínas hidrolisadas com Alcalase ou Neutrase. Peñas et al. (2006) verificaram redução da antigenicidade das proteínas do soro de leite com a hidrólise com Alcalase e Corolase PN-L em todas as condições utilizadas no estudo, já com a Neutrase, a maior redução na antigenicidade foi obtida quando utilizada juntamente pressão de 300 MPa. Peñas et al. (2006), ao avaliarem a antigenicidade por Imunoblote, de soja submetida a tratamento combinado de alta pressão e hidrólise com Neutrase, Alcalase ou Corolase PN-L, mostraram que os hidrolisados com Alcalase e os com Neutrase não apresentavam reação antigênica, sendo que os últimos apresentavam peptídeos com ampla faixa de MM (14 a 66 kDa).

O hidrolisado com bromelina não apresentou reação com o soro anti- β -Lg ao longo de toda a extensão da membrana (Figura 12B, coluna 6). Essa amostra, assim como a hidrolisada com Neutrase, apresentou peptídeos de MM alta (> 16

kDa) que não foram reconhecidos como antígenos. Hindi-Tamelierecht et al. (1997) relataram que a proteólise das proteínas de grão de bico com bromelina levou à redução de aproximadamente 50% da reação antígeno-anticorpo, avaliada pelo método ELISA utilizando soro de coelho, devido à destruição de epítomos pela ação da enzima.

As amostras de β -Lg hidrolisada tanto pela Neutrase quanto pela bromelina liberaram peptídeos com ampla faixa de MM (Figuras 9 B e C, coluna 3) que não foram reconhecidos pelas IgEs específicas, pois não reagiram com o soro anti- β -Lg (Figura 12 B e C, coluna 3). Isso sugere que essas enzimas, mesmo não clivando extensivamente a proteína, levaram à alteração estrutural, modificando as regiões dos determinantes antigênicos.

Os hidrolisados com Alcalase, Neutrase ou bromelina e submetidos à polimerização com a TG não apresentaram diferenças em relação às amostras somente hidrolisadas quanto à reatividade ao soro anti- β -Lg (Figuras 12A, coluna 3; 12B, colunas 3 e 7). A exceção foi a amostra hidrolisada com Neutrase que teve a intensidade de reação com o soro anti- β -Lg diminuída em relação à amostra somente hidrolisada (Figura 12B, coluna 3). Este fato pode ser explicado pela formação de ligações cruzadas com a β -Lg pela TG, resultando em menor concentração residual de β -Lg N e os produtos formados por esta reação não foram reconhecidos como antígenos.

Para as amostras polimerizadas (β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG) observou-se reação com anticorpos anti- β -Lg na região de MM > 26 kDa, porém a reação foi inespecífica, já que não há marcação de bandas (Figuras 12A, colunas 6 e 7; 12B, colunas 10 e 11). Villas-Boas et al. (2010) e Fernandes (2009) observaram que a polimerização da β -Lg (7% p/v) com TG (25 U g⁻¹) após tratamento térmico (80 °C) não reduziu a antigenicidade da proteína, porém quando polimerizada na presença de Cys (0,25 mol L⁻¹), foi observada diminuição da resposta antigênica, avaliada por imunoblote e ELISA.

Quanto às amostras hidrolisadas pós polimerização, as tratadas com Alcalase (Figura 12 A, colunas 4 e 5) não apresentaram nenhuma marcação na membrana de imunoblote, indicando que os hidrolisados não reagiram com o soro anti- β -Lg. A Alcalase foi eficiente na redução da antigenicidade isoladamente ou como tratamento pré ou pós polimerização.

Nos perfis dos hidrolisados com Neutrase pós polimerização (Figura 12B, colunas 4 e 5), observa-se que as amostras continuam reagindo com o soro anti- β -Lg, principalmente na porção correspondentes à MM > 26 kDa. No entanto, a marcação foi menos intensa com o hidrolisado da β -Lg TT TG do que com o hidrolisado da β -Lg Cys TG (Figura 12B, colunas 4 e 5). Isso sugere que, apesar dos hidrolisados dos polímeros com Neutrase apresentarem perfis eletroforéticos semelhantes (Figura 9B, colunas 4 e 5), os polímeros foram clivados diferentemente por essa enzima, sendo que a hidrólise da β -Lg TT TG resultou em material menos antigênico que a hidrólise da β -Lg Cys TG.

O hidrolisado da β -Lg Cys TG com bromelina (Figura 12 B, coluna 9) não reagiu com o soro anti- β -Lg, nem mesmo as frações retidas no topo do gel de eletroforese (Figura 9, coluna 4), sugerindo a redução da antigenicidade desta amostra. No entanto o hidrolisado da β -Lg TT TG mostrou reação ao longo de todo o comprimento da membrana, sugerindo que os tratamentos realizados não modificaram ou expuseram os epítomos responsáveis pela reação com as IgEs específicas.

6. Conclusões

Ao hidrolisar a β -Lg com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina em diferentes condições, a que resultou em maior GH, para as três enzimas, foi 3% de substrato e 25 U enzima g⁻¹. O maior GH foi obtido com a Alcalase, 12,6%, enquanto que com a Neutrase foi obtido 3,9% e com bromelina, 4,1%.

A polimerização pós hidrólise com a TG não levou ao aumento da MM dos hidrolisados observada por eletroforese e HPLC, embora estas amostras tenham apresentado menor GH (determinado pelo método de TNBS) do que antes da reação com a TG, sugerindo que houve polimerização.

A Alcalase foi a enzima que hidrolisou mais eficientemente tanto a β -Lg como seus polímeros. Os hidrolisados com Neutrase, pré e pós polimerização, apresentaram β -Lg residual, observada no perfil eletroforético e no cromatograma, assim como os hidrolisados pela bromelina, porém com maior intensidade.

A hidrólise com Alcalase gerou peptídeos que não foram reconhecidos como antigênicos, assim como os obtidos pela bromelina, mesmo estes apresentando maior MM que os obtidos pela Alcalase. A polimerização não reduziu a antigenicidade da β -Lg, no entanto, quando as amostras polimerizadas foram submetidas à hidrólise, a antigenicidade foi diminuída. A redução na antigenicidade, neste caso, foi maior com a utilização da Alcalase, seguida pela bromelina e Neutrase, devido principalmente, à menor quantidade de β -Lg residual.

O processo de hidrólise com as três enzimas resultou na redução da antigenicidade, independente do uso da polimerização. Estudos complementares são interessantes, para melhor caracterização dos materiais obtidos e avaliação da viabilidade da utilização do processo de hidrólise, associado ou não a polimerização em diferentes matrizes alimentares.

7. Referências bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.

ADLER-NISSEN, J. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. **ACS Symposium Series**, v. 92, p. 125-146, 1979.

ADLER-NISSEN, J; OLSEN, H.S. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

AGYARE, K. K.; XIONG, Y. L.; ADDO, K. Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1131-1137, 2008.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 2613-2617, 1989.

A. O. A. C. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**, 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.

BABIKER, E. E.; FUJISAWA, N.; MATSUDOMI, N.; KATO, A. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3746-3750, 1996.

BABIKER, E. E. et al. Effect of Polysaccharide Conjugation or Transglutaminase Treatment on the Allergenicity and Functional Properties of Soy Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.3, p. 866-871, 1998.

BABIKER, E. E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. **Food Chemistry**, v. 70, p. 139-145, 2000.

BALL, G.; SHELTON, M. J.; WALSH, B. J.; HILL, D. J.; HOSKING, C. S.; HOWDEN, M. E. H. A major continuous allergenic epitope of bovine β -lactoglobulin recognized by human IgE binding. **Allergy**, v. 24, p. 758-764, 1994.

BESLER, M. Determination of allergens in foods. **Trends in analytical chemistry**, v. 20, n. 11, 2001.

BONOMI, F. et al. Reduction of immunoreactivity of β -Lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. **Journal of Dairy Research**. v.70, p. 51-59, 2003.

BORRACINI, H. M. P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo**. 2006, 84 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n.1, p. 61-70, 2008.

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

CHICÓN, R. et al. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 367-376, 2008a.

CHICÓN, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, E.; BELLOQUE, J. Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of beta-lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 928-938, 2008b.

CHRISTENSEN, B. M.; SORENSEN, E. S.; HOJRUP, P.; PETERSEN, T.E., RASMUSSEN, L.K. Localization of potential transglutaminase cross-linking sites bovine caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.1943-1947, 1996.

CHOBERT, J.M.; BRIAND, L.; GUÉGUEN, J.; POPINEAU, Y.; LARRÉ, C.; HAERTLÉ, T. Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functional properties. **Nahrung**, v. 40, p. 177-182, 1996.

CLARE, D.A.; GHARST, G.; SANDERS, T.H. Transglutaminase polymerization of peanut proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 432-438, 2007.

CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; PEDROCHE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 67, p. 269-274, 1999.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 254-262, 2000.

CLÉMENT, G. et al. Epitopic characterization of native β -Lactoglobulin. **Journal of Immunological Methods**, v.266, p. 67-78, 2002.

COPELAND, R.A. **Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols**, Chapman & Hall, 1993.

DE JONG, G. A. H.; KOPPERMAN, S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2798-2806, 2002.

DICKINSON, E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 334-339, 1997.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Hidrolisado protéico de pescado In: OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de Pesca**. São Paulo: Varela, 1999.

DOUCET, E.; FOEGEDING, E. A. Gel formation of peptides produced by extensive enzymatic hydrolysis of β -Lactoglobulin. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1140-1148, 2005.

EISSA, A. S.; PUHL, C.; KADLA, J. F.; KHAN, S. A. Enzymatic Cross-Linking of β -Lactoglobulin: Conformational Properties Using FTIR Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v.7, n.6, p.1707-1713, 2006.

EHN, B. M. et al. Modification of IgE binding to β -lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3743-3748, 2005.

EMI, S.; MYERS, D. V.; IACOBUCCI, G. A. Purification and properties of the thermostable acid protease of *Penicillium duponti*. **Biochemistry**, v. 15, n. 4, p. 842, 1976.

ENA, J. M. VAN BERESTEIJN, E. C. H.; ROBBEN, A. J. P. M.; SCHMIDT, D. G. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatic combination. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 104-166, 1995.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K. B. Enzymatic cross-linking of whey protein by Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v.11, n. 1, p. 19-25, 1997.

FERNANDES, Michele Augusto. **Efeito da enzima transglutaminase na digestibilidade e antigenicidade da β -Lactoglobulina**. 2009, 94 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FLANAGAN, J.; FITZGERALD, R. J. Physicochemical and nitrogen solubility properties of bacillus proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post- hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5429-5436, 2002.

FOLK, J.E. Transglutaminases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 517-531, 1980.

FORT, N. et al. Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: effects on the heat-induced gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n.3, p. 463-471, 2007.

FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado Protéico de Pescado. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

GAUTHIER, S. F.; VACHON, C.; SAVOIE, L. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 3, p.960-964, 1986.

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

GERRARD, J. A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 391-399, 2002.

HAQUE, Z. U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 6, p. 559-71, 1992.

HELM, R. M.; BURKS, A. W. Mechanism of food allergy. **Current Opinion in Immunology**. v.12, p.647-653, 2000.

HINDI-TAMELIKECHT, F.; DAUPHIN, C.; HAMON, M.; GRANGAUD, J. P.; PRADEAU, D. Analytic and Immunologic Characterization of Chickpea (*Cicer arietinum*) Protein Hydrolysates Obtained by Bromelain and α -Chymotrypsin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 4758-4762, 1997.

HOFFMAN, M. A. M.; VAN MIL, P. J. J. M. Heat-induced aggregation of beta-lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2942-2948.

HYUN, C. K.; SHIN, H. K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v.36, n.1-2, p.65-71, 2000.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, p. 106-112, 1996.

IAMETTI, S. et al. Proteolysis of bovine β -Lactoglobulin during thermal treatment in subdenaturing conditions highlights some structural features of the temperature-modified protein and yields fragments with low immunoreactivity. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1362-1372, 2002.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**, 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JAROS, D.; PARTSCHEFELD, C.; HENLE, T.; ROHN, H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, n. 2, p. 113-155, 2006.

JEDRYCHOWSKI, L.; WROBLEWSKA, B. Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic and fermentation. **Food and Agricultural Immunology**. v. 11, p.91-99, 1999.

JOST, R.; MONTI, J. C.; PAHUD, J. J.; Whey proteins allergenicity and its reduction by technological means. **Food Technology**, v. 41, p. 128-129, 1987.

KANAJI, T.; OZAKI, H.; TAKAO, T.; KAWAJIRI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M.; SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovercillium* sp. **Journal of Biological Chemistry**, n. 277, p. 11565-11572, 1993.

KANANEN, A.; SAVOLAINEN, J.; MAKINEN, J.; PERTTILA, U.; MYLLYKOSKI, L.; PIHLANTO-LEPPALA, A. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal**, v. 10, p.691-697, 2000.

PENYAM, D.; KILARA, D. P. A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 120-125, 1996.

- KLEBER, N.; KRAUSE, I.; ILLGNER, J. H.; HINRICHS, J. The antigenic response of β -Lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research Technology**, v. 219, p. 105-110, 2004.
- KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 102, p. 759-763, 2007.
- KOPPELMAN, S. J.; HEFLE, S. L. **Detecting allergens in food**. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolysed with various alkaline proteinases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 657-666, 2000.
- KURAISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSA, Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.
- LEE, J. W.; KIM, J. H.; YOON, H. S.; KANG, K. O.; LEE, S. Y.; HWANG, H. J.; BYUN, M. W. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. **Journal of Food Protein**, v. 64, p. 272-276, 2001.
- LORENZEN, P. CHR.; SCHILIMME, E.; ROOS, N. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. **Nahrung**, v. 42, p. 151-154, 1998.
- LORENZEN, P. C. Techno-functional properties of transglutaminase treated milk proteins. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 667-670, 2000.
- LORENZEN, P. C., NEVE, H., MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, p. 152-157, 2002.
- MARSHALL, K. R.; HARPER, R. J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 233, p. 21-32, 1988.
- MIERZEJEWSKA, D.; KUBICKA, E. Effect of temperature on immunoreactive properties of the cow milk whey protein β -lactoglobulin. **Milchwissenschaft**, v. 61, n. 1, p. 69-72, 2006.
- MIETSCH, F.; FEHÉR, J.; HALÁSZ, A. Investigation of functional properties of partially hydrolyzed proteins. **Die Nahrung**, v. 33, p. 9-15, 1989.

MONACI, L.; TREGOAT, V.; VAN HENGEL, A. J.; ANKLAM, E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, 2006.

MORGAN F. et al. Lactolation of beta-lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry. **International Dairy Journal**, v.8, n.2, p. 95-98, 1998.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends Food Science Technology**, n. 9, p. 204-210, 1998.

MOUÉCOUCOU, J.; FRÉMONT, S.; VILLAUME, C.; SANCHEZ, C.; MÉJEAN, L. Polysaccharides reduce *in vitro* IgG/IgE-binding of β -lactoglobulin after hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1242-1249, 2007.

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

MUTILANGI, W. A. M. PANYAM, D.; KIILARA, A. Hidrolisates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 1104-1109, 1995.

MUTILANGI, W.; PANYAM, D.; KILARA, A. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 61, 1996.

NACER, A. S.; SANCHEZ, C.; VILLAUME, C.; MEJEAN, L.; MOUECOUCOU, J. Interactions between β -lactoglobulin and pectins during *in vitro* gastric hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 355-360, 2004.

NOVOZYMES. **Neutrase®**: Descrição e especificações. 4 p. 2002.

O'SULLIVAX, M. M.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 433-442, 2002.

OTTE, J.; ZAKORA, M.; QVIST, K. B.; OLSEN, C. E.; BARKHOLT, V. Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 835-848, 1997.

PEÑAS, E.; ENEL, H.; FLORIS, R.; PRÉSTAMO, G.; GOMEZ, R. High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 969-975, 2006.

PEÑAS, E.; RESTANI, P.; BALLABIO, C.; PRÉSTAMO, G.; FIOCCHI, A.; GÓMEZ, R. Assessement of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. **European Food Res Technology**, v. 222, p. 286-290, 2006.

PENYAM, D.; KILARA, D. P. A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 120-125, 1996.

PEYRON, S.; MOUÉCOUCOU, J.; FRÉMONT, S.; SANCHEZ, C.; GONTARD, N. Effects of heat treatment and pectin addition on β -lactoglobulin allergenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5643-5650, 2006.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. **Structure-function properties of food proteins**, Ed. Academic Press, Inc., San Diego, California, 1994.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Biocative peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n.9-10, p.347-356, 2001.

PINTERITS, A.; ARNTFIELD, S. D. The effect of limited proteolysis on canola protein gelation. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1337-1343, 2007.

POMS, R. E.; KLEIN, C. L.; ANKLAN, E. Methods for allergen analysis in food: a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, n. 1, p. 1-31, 2004.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v, 62, n, 3, p. 597-635, 1998.

REDDY, I. M.; KELLA, K. D.; KINSELLA, J. E. Structural and conformational basis of resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotrytic digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 737-741, 1988.

RODRIGUES, M. A.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cow's milk: A statistical approach. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

ROEFS, S. P. F. M.; DE KRUIF, K. G. A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 226, p. 883-889, 1994.

SÉLO, L.; CLÉMENT, G.; BERNARD, H. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 12, p. 1696-1704, 1999.

SEVERIN, S.; XIA, W. S. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 77-97, 2006.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológico-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.

SHARMA R.; ZAKORA M.; QVIST, K. B. Susceptibility of an industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 12, p. 1005-1012, 2001.

SHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-KDa to 100-KDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHMIDT, D. G.; POLL, J. K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 45, p. 225-240, 1991.

SCHMIDT, D. G.; MARKWIJK, B. W. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, p. 15-22, 1993.

SPELLMAN, D.; MCEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the TNBS, OPA, and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 447-453, 2003.

STĂNCIUC, N.; PLANCKEN, I. V. D.; ROTARU, G.; HENDRICKX, M. Denaturation impact in susceptibility of beta-lactoglobulin to enzymatic hydrolysis: a kinetic study. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 53, n. 10, p. 921-929, 2008.

SVENNING, C.; BRYNHILDSVOLD, J.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. Antigenic response of whey proteins and genetic variants of β -lactoglobulin – the effect of proteolysis and processing. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 699-711, 2000.

TANG, C. H.; MA, C. Y. Modulation of the thermal stability of β -lactoglobulin by transglutaminase treatment. **European Food Research Technology**, v. 225, n. 5, p. 649-652, 2007.

VAN BERESTEIJN, E. C. H.; PEETERS, R. A.; KAPER, J. G. M.; MEIJER, R.; ROBBEN, A. J. P. M.; SCHMIDT, D. G. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 619-625, 1994.

VAN WILLIGE, R. W. G; FITZGERALD, R. J. Tryptic and chymotryptic hydrolysis of β -lactoglobulin A, B and AB at ambient and high pressure. **Milchvissenschaft**, v. 50, p. 183-186, 1995.

VILLAS-BOAS, Mariana Battaglin. **Efeito da enzima transglutaminase na antigenicidade da β -Lactoglobulina**. 2008, 94 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VILLAS-BOAS, M. B.; VIEIRA-FERRO, K. P.; TREVIZAN, G.; ZOLLNER, R. L.; NETTO, F. M. The effect of transglutaminase-induced polymerization in the presence of cysteine on β -lactoglobulin antigenicity. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 6, p. 386-392, 2010.

WAL, J. M.; BERNARD, H.; YVON, M.; PELTRE, G.; DAVID, B. et al. Enzyme immunoassay of specific human IgE to purified cow's milk allergens. **Food and Agricultural Immunology**, v. 7, p. 175-187, 1995.

WAL, J. M. Structure and function of milk allergens. **Allergy**, v. 56, n. 67, p. 35-38, 2001.

WAL, J. M. Bovine milk allergenicity. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, p. 2-11, 2004.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking, **Crit. Review of Food Science and Nutritional**, v. 42, p. 353 - 375, 2002.

WALSH, D. J.; CLEARY, D.; MCCARTHY, E.; MURPHY, S.; FITZGERALD, R. J. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following

proteolysis and transglutaminase cross-linking. **Food Research International**, v. 36, p. 677-683, 2003.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2 ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

WATANABE, M.; SUZUKI, T.; IKEZAWA, Z.; ARAI, S. Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hypoallergenic flour. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 388-390, 1994.

WIT J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal Dairy Science.**, v. 81, p. 597-608, 1998.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2^a ed. New York: Marcel Dekker, 1994.

WRÓBLEWSKA, B.; KARAMAC, M.; AMAROWICZ, R.; SZYMKIEWICZ, A.; TROSZYNSKA, A.; KUBICKA, E. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 839–850, 2004.

WRÓBLESWSKA, B.; JEDRYCHOWSKI, L.; HAJÓS, G.; SZABÓ, E. Influence of alcalase and transglutaminase on immunoreactivity of cow milk whey proteins. **Czech. Journal of Food Science**, v. 26, n. 1, p. 15-23, 2008.

YILDIRIM, M.; HETTIARACHCHY, N. S. Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 248-252, 1998.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applications in Microbiological biotechnology**, v. 64, p. 447-454, 2004.

8. Anexo

8.1 Anexo 1: Certificado da Comissão de ética na experimentação animal CEE/Unicamp



CEE/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1586-1, sobre "Efeitos da hidrólise pré e pós polimerização catalisada pela transglutaminase na antigenicidade da β -lactoglobulina", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Flávia Maria Netto / Isabele Serimarco Sabadin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 05 de agosto de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1586-1, entitled "Effect of hydrolyses pre and post polimerization catalized by transglutaminase on antigenicity of β -lactoglobulin", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 5, 2008.

Campinas, 05 de agosto de 2008.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEE – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/cee/>

8.2 Anexo 2: Tabelas de experimento fatorial de hidrólise da β -Lg com as enzimas Alcalase, Neutrase ou bromelina.

Tabela 1. Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com Alcalase, segundo concentração de substrato e relação enzima:substrato.

Fatores		Tratamento	Repetições		Totais	Médias
Conc. S (%)	E:S (U g ⁻¹)		1	2		
3	10	1	9,6	10,2	19,8	9,9
7	10	A	7,7	7,0	14,73	7,37
3	25	B	12,1	13,2	25,28	12,64
7	25	ab	9,9	10,2	20,08	10,04

Conc.: concentração; S: substrato; E:S: relação enzima:substrato; U g⁻¹: unidade por grama de substrato

Tabela 2. Médias de Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com Alcalase, segundo a concentração de substrato e a relação enzima:substrato.

Relação E:S	Níveis de conc. S		Médias marginais segundo E:S	Efeito da Conc. S
	3	7		
10	9,9	7,37	8,635	-2,565
25	12,64	10,04	11,34	
Médias marginais segundo a conc.	11,27	8,705	9,9875	

Tabela 3. Médias de Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com Alcalase, segundo a relação enzima:substrato e a concentração de substrato

Conc. S	Níveis de relação E:S		Médias marginais segundo []	Efeito da E:S
	10	25		
3	9,9	12,64	11,27	2,705
7	7,37	10,04	8,7	
Médias marginais segundo relação E:S	8,635	11,34	9,9875	

Tabela 4. Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com Neutrase, segundo concentração de substrato e relação enzima:substrato.

Fatores		Tratamento	Repetições		Totais	Médias
Conc. S (%)	E:S (U g ⁻¹)		1	2		
3	10	1	3,1	2,9	6,0	3,0
7	10	A	2,6	3	5,6	2,8
3	25	B	3,7	4,1	7,8	3,9
7	25	ab	3,6	3,9	7,5	3,8

Tabela 5. Médias de Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com Neutrase, segundo a concentração de substrato e a relação enzima:substrato

E:S	Níveis de conc. S		Médias marginais segundo E:S	Efeito da conc. S
	3	7		
10	3	2,8	2,9	-0,1625
25	3,9	3,8	3,85	
Médias marginais segundo a conc. S	3,4475	3,285	3,36625	

Tabela 6. Médias de Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com Neutrase, segundo a relação enzima:substrato e a concentração de substrato

Conc. S	Níveis de E:S		Médias marginais segundo conc. S	Efeito da E:S
	10	25		
3	3	3,9	3,45	0,9375
7	2,8	3,8	3,3	
Médias marginais segundo a relação E:S	2,8975	3,835	3,36625	

Tabela 7. Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com bromelina, segundo concentração de substrato e relação enzima:substrato.

Fatores		Tratamento	Repetições		Totais	Médias
Conc. S (%)	E:S		1	2		
3	10	1	2,7	2,3	5,0	2,5
7	10	a	1,6	1,8	3,4	1,7
3	25	b	4,3	3,8	8,1	4,1
7	25	ab	3,0	2,7	5,7	2,9

Tabela 8. Médias de Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com bromelina, segundo a concentração de substrato e a relação enzima:substrato

E:S	Níveis de conc. S		Médias marginais segundo E:S	Efeito da conc. S
	3	7		
10	2,5	1,7	2,1	-0,9825
25	4,1	2,9	3,5	
Médias marginais segundo a conc. S	3,2625	2,28	2,77125	

Tabela 9. Médias de Grau de hidrólise (GH%) da β -Lg com bromelina, segundo a relação enzima:substrato e a concentração de substrato

Conc. S	Níveis de E:S		Médias marginais segundo conc. S	Efeito da E:S
	10	25		
3	2,5	4,1	3,3	
7	1,7	2,9	2,3	
Médias marginais segundo a relação E:S	2,09	3,4525	2,77125	
				1,3625

Tabela 10. Análise de significância de cada um dos fatores para a Alcalase, Neutrase ou bromelina.

Efeito	Alcalase	Neutrase	bromelina
Conc. S	$p < 0,05$ ($p = 0,0216$)	$p > 0,05$ ($p = 0,3745$)	$p < 0,05$ ($p = 0,0052$)
Relação E:S	$p < 0,05$ ($p = 0,0017$)	$p < 0,05$ ($p = 0,0045$)	$p < 0,05$ ($p = 0,0015$)
Interação conc. S e relação E:S	$p > 0,05$ ($p = 0,9489$)	$p > 0,05$ ($p = 0,8514$)	$p > 0,05$ ($p = 0,2976$)