

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

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E IMUNOLÓGICA PARCIAL DE
PLASTEÍNA PRODUZIDA A PARTIR DE HIDROLISADOS
DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA E CASEÍNA

MYRIAN THEREZA SERRA MARTINS
Nutricionista

ORIENTADOR: Prof.^a. Dr.^a. MARIA ANTONIA MARTINS GALEAZZI

Parâmetros

*Este resumo corresponde
a versão final da
tese defendida por
Myrian Thereza Serra
Martins e aprovada
pela Comissão Julgadora
em 18.11.94*

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre
em Ciência da Nutrição.

[Assinatura]

Campinas - SP
1994

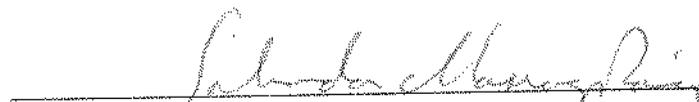
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Banca Examinadora


Prof. Dr. Maria Antonia Martins Galeazzi
(orientadora)



Prof. Dr. Flávia Maria Netto
(membro)


Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(membro)


Prof. Dr. Roberto Herminio Moretti
(membro)

Campinas, 18 de novembro de 1994.

Aos meus pais,
ao Vitoriano e meus filhos Vitinho e Lucas.

AGRADECIMENTOS

- À Profª. Drª. Maria Antonia Martins Galeazzi pela amizade, apoio e orientação dedicados a este trabalho.
- Ao Departamento de Ciência, Tecnologia de Alimentos e Nutrição Básica da UFMT pela liberação de minhas atividades docentes para a realização deste trabalho.
- A CAPES pela bolsa de estudo, e à FAPESP, pelo financiamento de equipamentos e reagentes indispensáveis para a execução do projeto.
- A SANBRA S/A pelo fornecimento do isolado protéico de soja.
- Ao Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, em especial ao Prof. Dr. Lewis Joel Greene, pela concessão da realização das análises de composição aminoacídica.
- Ao Laboratório de Pesquisas da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP, em especial ao prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini e ao técnico Adalberto Vallares Venize, pelo apoio e colaboração no ensaio imunológico.
- Ao Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA - UNICAMP) pelo apoio e colaboração necessários para a concretização deste trabalho.
- À Ilana e Cecília pelo carinho e amizade.
- À Liana e Eliete pela dedicação, amizade e colaboração nestes momentos importantes.
- Ao Luiz pela amizade e apoio valioso na redação deste trabalho.
- Aos amigos Mabel, Marie, Ricardo, Elaine, Vera, Norma, Hilda, Semíramis, Marcio, Rodrigo, Edma, Laércio, Luciana, Lucas e Arlinda pelo apoio constante e muito especial.

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------|-----|
| ÍNDICE..... | i |
| LISTA DE TABELAS..... | iii |
| LISTA DE FIGURAS..... | v |
| RESUMO..... | vii |
| SUMMARY..... | ix |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 42 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 52 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 79 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 2.1. ALERGIA ALIMENTAR | 5 |
| 2.1.1. Introdução | 5 |
| 2.1.2. Mecanismos imunológicos envolvidos na alergia alimentar | 7 |
| 2.1.3. Principais alérgenos alimentares..... | 14 |
| 2.1.4. Efeitos do processamento na imunogenicidade das proteínas alimentares..... | 21 |
| 2.1.5. Fatores que influem na alergia alimentar | 23 |
| 2.1.6. Avaliação da utilização de diversas fontes protéicas na terapia da alergenidade | 26 |
| 2.2. REAÇÃO DE PLASTEÍNA..... | 30 |
| 2.2.1. Introdução | 30 |
| 2.2.2. Fatores que influem na reação de plasteína..... | 31 |
| 2.2.3. Mecanismos de formação da plasteína..... | 33 |
| 2.2.4. Enriquecimento da plasteína através da incorporação covalente de aminoácidos..... | 37 |
| 2.2.5. Considerações finais..... | 40 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| 3.1. MATERIAIS..... | 42 |
| 3.1.1. Matérias primas e sistema enzimático..... | 42 |
| 3.1.2. Reagentes..... | 42 |
| 3.1.3. Instrumental | 42 |
| 3.2. MÉTODOS..... | 43 |
| 3.2.1. Composição centesimal aproximada das matérias primas | 43 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2. Preparo dos hidrolisados enzimáticos de caseína e IPS | 44 |
| 3.2.3. Obtenção da plasteína..... | 45 |
| 3.2.4. Determinação de aminoácidos | 46 |
| 3.2.5. Determinação de peso molecular | 48 |
| 3.2.6. Avaliação Nutricional..... | 49 |
| 3.2.7. Atividade do inibidor de tripsina | 50 |
| 3.2.8. Avaliação imunológica..... | 50 |
| 3.2.9. Análise estatística..... | 51 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 52 |
| 4.1. Composição centesimal aproximada | 52 |
| 4.2. Hidrólise enzimática do IPS e caseína com pancreatina..... | 53 |
| 4.3. Obtenção da plasteína. | 59 |
| 4.4. Composição em aminoácidos..... | 62 |
| 4.5. Determinação do peso molecular dos hidrolisados e plasteínas. | 69 |
| 4.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS..... | 69 |
| 4.5.2. Cromatografia de exclusão. | 71 |
| 4.6. Digestibilidade..... | 74 |
| 4.7. Inibidor de tripsina..... | 75 |
| 4.8. Avaliação imunológica..... | 76 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 79 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Comparação das propriedades das imunoglobulinas clássicas e IgE (BARRET, 1988) | 9 |
| Tabela 2. Condições da hidrólise enzimática para o preparo dos hidrolisados pancreáticos de IPS (HI) e caseína (HC)..... | 44 |
| Tabela 3. Condições realizadas para obtenção de plasteínas a partir de hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína | 45 |
| Tabela 4. Composição centesimal aproximada das matérias primas | 52 |
| Tabela 5. Grau de hidrólise dos hidrolisados pancreáticos de caseína (HC) e IPS (HI) sob condições variáveis de concentração de substrato (S) e relação enzima/substrato (E/S) | 56 |
| Tabela 6. Produtividade das plasteínas obtidas sob diferentes condições..... | 60 |
| Tabela 7. Valores de pH ótimo para hidrólise e síntese de plasteína de um hidrolisado de proteínas de soja utilizando as mesmas proteínases (WATANABE & ARAI, 1988)..... | 61 |
| Tabela 8. Composição em aminoácidos totais (AAT) dos hidrolisados de caseína (HC) e IPS (HI) e das plasteínas PL50 e PL75, em g/16g N..... | 62 |
| Tabela 9. Composição em aminoácidos livres (AAL) dos hidrolisados de caseína (HC) e IPS (HI) e das plasteínas PL50 e PL75 e os respectivos percentuais em relação aos aminoácidos totais..... | 63 |
| Tabela 10. Distribuição percentual dos aminoácidos essenciais totais (AAT) e livres (AAL) nos hidrolisados pancreáticos de caseína (HC) e IPS (HI) e das plasteínas PL50 e PL75 | 67 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 11. Distribuição percentual dos aminoácidos não essenciais totais (AAT) e livres (AAL) nos hidrolisados pancreáticos de caseína (HC) e IPS (HI) e das plasteínas PL50 e PL75 | 68 |
| Tabela 12. Escore químico dos hidrolisados de caseína (HC) e IPS (HI) e das plasteínas PL50 e PL75 | 69 |
| Tabela 13. Digestibilidade (D) <i>in vitro</i> das matérias primas, hidrolisados pancreáticos (HC e HI) e das plasteínas PL50 e PL75 | 74 |
| Tabela 14. Atividade do inibidor de tripsina (UTI) nas amostras de IPS, HI, PL50 e PL75..... | 75 |
| Tabela 15. Reação de anafilaxia cutânea passiva de soros de animais imunizados com caseína e IPS, frente às preparações antigênicas..... | 75 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Interação de fatores mediante influência da proteína dietética sobre a resposta imune (WALKER, 1992)..... | 25 |
| Figura 2. Mecanismos envolvidos na reação de plasteína (ARAI & FUJIMAKI, 1978)..... | 33 |
| Figura 3. Grau de hidrólise (GH) do hidrolisado pancreático de caseína | 57 |
| Figura 4. Grau de hidrólise (GH) do hidrolisado pancreático de IPS | 57 |
| Figura 5. Comparação entre o grau de hidrólise (GH) dos hidrolisados pancreáticos de caseína (HC) e isolado protéico de soja (HI) | 58 |
| Figura 6. Distribuição percentual dos aminoácidos essenciais totais (AAT) e livres (AAL) no hidrolisado de caseína..... | 64 |
| Figura 7. Distribuição percentual dos aminoácidos essenciais totais (AAT) e livres (AAL) no hidrolisado de IPS..... | 65 |
| Figura 8. Distribuição percentual dos aminoácidos essenciais totais (AAT) e livres (AAL) na plasteína PL50 | 65 |
| Figura 9. Distribuição percentual dos aminoácidos essenciais totais (AAT) e livres (AAL) na plasteína PL75 | 66 |
| Figura 10. Curva padrão de pesos moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS | 70 |
| Figura 11. Eletroforese de placa. 1. IPS; 2. Caseína; 3. HI; 4. HC; 5. PL50; 6. PL75; 7. Padrões moleculares | 71 |
| Figura 12. Curva padrão de pesos moleculares por filtração em gel | 72 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 13. Curva dos hidrolisados pancreáticos submetidos à filtração em gel..... | 73 |
| Figura 14. Curva das plasteínas submetidas à filtração em gel..... | 73 |
| Figura 15. Representação fotográfica do mapa cutâneo realizado nos cobaias. Controle negativo para a reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) | 77 |
| Figura 16. Representação fotográfica do mapa cutâneo realizado nos cobaias. Controle positivo para a reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) | 78 |
| Figura 17. Representação fotográfica do mapa cutâneo realizado nos cobaias após a reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) frente aos hidrolisados e plasteínas | 78 |

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização química e imunológica parcial da plasteína produzida a partir de hidrolisados pancreáticos de caseína e isolado protéico de soja (IPS). A aplicação deste produto foi considerada na terapia da alergenicidade às proteínas do leite de vaca e à outros alimentos, cuja hipersensibilidade seja do tipo imediata. Estudo sistemático das condições de hidrólise enzimática do IPS e caseína foi realizado, onde variou-se a concentração do substrato e a relação enzima/substrato mantendo constante o pH, o tempo e a temperatura do sistema de reação. Para a produção da plasteína foram utilizados os hidrolisados de IPS (HI) e caseína (HC), variando-se a concentração do substrato, a relação HI : HC e o pH do meio de reação. Os rendimentos das reações de hidrólise e de síntese de plasteína foram determinados, respectivamente, com base na solubilidade e insolubilidade do nitrogênio em solução de ácido Tricloroacético a 10%. A melhor condição para obtenção dos hidrolisados de IPS e caseína foi de 5% de substrato, relação E/S de 1/20, pH 7,5; incubação a 37°C durante 6 horas, sob agitação constante. O melhor rendimento das plasteínas foi obtido quando utilizado 40% de substrato em pH 7,0 nas relações de HI : HC de 50 : 50 (PL50) e 75 : 25 (PL75), durante 24 horas sob repouso. O sistema enzimático, a relação enzima/substrato e a temperatura do meio de reação foram mantidos constantes em relação à hidrólise. Os pesos moleculares dos hidrolisados e plasteínas, determinados por Filtração em Gel Bio Rad P-60, apresentaram faixas de 58.000; 35.000 e 420 daltons para HC, 45.000 e 420 daltons para HI, 45.000; 32.000; 12.500; 8.600 e 350 daltons para PL50 e 47.000; 32.000; 11.000; 9.600; 6.700 e 420 daltons para PL75. O comportamento eletroforético (SDS-PAGE) dos hidrolisados e plasteínas não apresentaram diferenças, evidenciando apenas a elevada extensão da hidrólise quando comparado às proteínas intactas. A qualidade protéica das matérias primas, hidrolisados e plasteínas avaliada por métodos *in vitro*, apresentou para o IPS digestibilidade significativamente diferente de 91,48% ($p < 0,05$) em relação à caseína (96,85), HI (98,33%), HC (99,06%), PL50 (98,02%) e PL75 (97,89%). Os resultados do escore químico (%) para a plasteína PL50 (103,82) e para PL75 (87,29) revelaram melhor qualidade para o produto PL50. Os teores de aminoácidos livres das plasteínas foram semelhantes ($\cong 12\%$) e intermediário ao obtido para os hidrolisados HC (6,19%) e HI (16,48%). Os aminoácidos essenciais Lisina, Metionina, Fenilalanina e Triptofano foram liberados em maior grau em relação aos não essenciais, sendo a Prolina não detectada, na forma livre, nas amostras estudadas.

A atividade do inibidor de tripsina do IPS (42,78 UTI/mg de proteína) foi reduzida em 50,5% no hidrolisado HI e 80,7% e 71,0% nas plasteínas PL50 e PL75, respectivamente. A avaliação imunológica das plasteínas e hidrolisados, realizada por Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) indicou não indução da resposta imune específica. Os resultados obtidos sugerem que a plasteína PL50 é a indicada para a realização de estudos posteriores necessários a sua futura aplicação na alimentação humana.

SUMMARY

Plasteins produced from pancreatic hydrolysates of casein and soy protein isolate (SPI) were characterized using both chemical and partial immunological assays. These products were considered to be potentially useful in the diet of persons suffering from an allergy or hypersensitivity to the proteins in various foods such as cow's milk. A systematic study to the enzymatic hydrolysis conditions of SPI and casein was conducted, with the concentration of the substrate and the ratio of enzyme to substrate varied while the pH, time and temperature of the reaction system were maintained constant. The hydrolysates of SPI (HI) and casein (HC) were used for the production of plastein, and the concentration of the substrate, the ratio of HI : HC and the pH of the reaction medium were systematically controlled. The yield of the hydrolysis reaction and that of the synthesis of plastein were determined on the basis of solubility and insolubility of nitrogen in a 10% trichloroacetic acid solution, respectively. The optimum conditions for the obtention of hydrolysates (of SPI and casein) were the use of a substrate concentration of 5% and a ratio of 1 : 20 enzyme to substrate at a pH of 7,5, with an incubation temperature of 37°C for 6 hours under constant stirring. The optimum yield of plasteins was obtained with a 40% substrate concentration at a pH of 7,0 for 24 hours without stirring for two equivalent HI : HC ratios 50 : 50 (PL50) and 75 : 25 (PL75); the enzymatic system, the ratio of enzyme to substrate and the temperature of the reaction medium were maintained constant. The molecular weights of the hydrolysates and plasteins were determined by filtration in Bio Rad Gel P-60; these substances revealed bands of 58,000; 35,000 and 420 daltons for HC; 45,000 and 420 daltons for HI; 45,000; 32,000; 12,500; 8,600 and 350 daltons for PL50 and 47,000; 32,000; 11,000; 9,600; 6,700 and 420 daltons for PL75. The electrophoretic behaviour (SDS-PAGE) of the hydrolysates and plasteins did not reveal any differences except for a high degree of hydrolysis in comparison to that for intact proteins. The protein quality of the raw materials, hydrolysates and plastein was evaluated *in vitro* and the SPI digestibility was significantly less (91,48%; $p < 0,05$) than casein (96,85%), HI (98,33%), HC (99,06%), PL50 (92,02%) and PL75 (97,89%). Chemical analysis (score) showed PL50 plastein to be superior to that of PL75 (103,82% e 87,29%, respectively). The free amino acid content of the two types of plasteins was similar ($\cong 12\%$), and intermediate to that of the hydrolysates (6,19% and 16,48% for HC and HI, respectively). The amino acids Lysine, Methionine, Phenylalanine and Tryptophan were liberated in greater amounts than were the non-

essential amino acids; Proline was not detected in free form in the samples studied. The Trypsin Inhibiting Factor of the SPI (42.78 UTI/mg of protein) was reduced 50.5% in the HI hydrolysate and 80.7% and 71.0% in PL50 and PL75 plastein, respectively. Immunological evaluation of the plasteins and hydrolysates carried out by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) indicated the lack of a specific immune response. The results obtained suggest that PL50 plastein is the most appropriate candidate for the conduction of the further studies necessary for eventual use in human food.

1. INTRODUÇÃO

A importância dos alimentos como agentes responsáveis por distúrbios alérgicos tem sido relatada desde o início dos registros históricos (Hippócrates 460-370 A.C., citado por SIMPOULOS, 1986). Contudo, estudos rigorosos vem sendo realizados somente nas duas últimas décadas, apresentando controvérsias que devem-se, em parte, aos dados conflitantes e contraditórios dos estudos clínicos realizados, bem como à ausência de termos precisos e regulamentados (ESTEBAN, 1992).

A "reação adversa ao alimento" é a resposta anormal exibida por certos indivíduos após ingestão de alimentos que são usualmente tolerados pela maioria dos indivíduos de uma mesma comunidade. A "alergia alimentar" é um tipo de reação adversa que envolve o sistema imunológico e que afeta tanto adultos quanto crianças, as quais apresentam maior incidência.

O mecanismo imunológico primário envolvido nas reações alérgicas aos alimentos é principalmente a reação de hipersensibilidade imediata, a qual é mediada pelo complexo alergeno-IgE (TAYLOR, 1992). Os órgãos afetados incluem a pele e mucosas, o sistema respiratório e o trato gastrointestinal (MERRIT et alii, 1990).

Os principais alérgenos alimentares que tem sido identificados são de natureza protéica. Destes, as proteínas de origem animal constituem os principais alérgenos na população infantil, destacando-se as proteínas do leite de vaca, ovos e peixes. Entre as fontes protéicas de origem vegetal, as leguminosas são as mais importantes.

Embora qualquer alimento possa ser potencialmente um sensibilizador, a quantidade de alimento consumida adicionada de seu potencial alergênico intrínscio, afetam a manifestação da alergia na população (ESTEBAN, 1992). Além disso, fatores adicionais incluem: história familiar de alergia, idade, fatores intestinais (digestibilidade e permeabilidade) e influência da alimentação e meio ambiente (ELLIS et alii, 1991; BISHOP et alii, 1990).

As propriedades específicas que tornam uma proteína alergênica e que são responsáveis pela sua habilidade em estimular a produção de IgE incluem basicamente o peso molecular, sequência dos aminoácidos, conformação do peptídeo e sua solubilidade em fluidos biológicos (BARRET, 1988).

A terapia convencional da alergia alimentar consiste da eliminação, na dieta, dos alimentos fontes dos alergenos envolvidos (OGAWA et alii, 1991). Entretanto, dependendo da idade do indivíduo e do grupo de alimento afetado tal eliminação poderá ocasionar em má nutrição quando o período de tratamento é prolongado.

Considerando serem os alergenos alimentares resistentes à vários tratamentos durante o processamento, inclusive o calor e pH ácido, formulados contendo fontes protéicas modificadas tem sido desenvolvidos visando sua aplicação na terapia da alergenicidade. Estes formulados incluem basicamente o uso de hidrolisados enzimáticos de caseína e, mais recentemente, hidrolisados de soro lácteo.

Para uma fórmula ser designada "hipoalergênica" deverá apresentar a base protéica modificada e com antigenicidade reduzida em 90% dos indivíduos afetados (ACADEMIA AMERICANA DE PEDIATRIA, 1991). Ademais, devem apresentar adequacidade nutricional e boa aceitabilidade sensorial.

A utilização destes hidrolisados como fórmulas "hipoalergênicas" tem gerado controvérsias. SAYLOR & BAHNA (1991); BISHOP et alii (1990) e BOCK et alii (1989) descreveram a ocorrência de anafilaxia em crianças alérgicas ao leite de vaca após a ingestão de uma fórmula contendo hidrolisado de caseína. ELLIS et alii (1991) reportaram reação anafilática após ingestão de hidrolisado de soro lácteo, em crianças alérgicas ao leite de vaca e tolerantes à fórmula contendo hidrolisado de caseína. Em adição, MERRIT et alii (1990) consideram que este formulado contendo hidrolisado de soro lácteo poderia ser uma alternativa aceitável para as crianças com intolerância, mas não com alergia severa mediada por IgE.

Assim, julgamos necessário o desenvolvimento de um produto protéico obtido por modificação enzimática que apresente propriedades químicas e

imunológicas diferentes dos hidrolisados até então obtidos. Nesse contexto, procedemos a obtenção da plasteína considerando que este processo permite alterações na proteína intacta à nível de estrutura, à qual está relacionada a gênese da alergia alimentar.

A plasteína é um produto protéico obtido por processo enzimático que ocorre de modo reverso à hidrólise usual por proteinases. Durante o processo pode ocorrer formação de ligação peptídica por condensação e/ou transpeptidação ou ainda a formação de agregados devido às interações não covalentes, principalmente do tipo hidrofóbicas (WATANABE & ARAI, 1988; SUKAN & ANDREWS, 1982).

As propriedades e o rendimento da plasteína dependem do grau de degradação do hidrolisado aplicado, tipo e concentração do substrato, espécie enzimática e condições específicas da reação, como pH, tempo e temperatura da reação (LUDWIG et alii, 1986).

A reação de plasteína pode ser aplicada aos produtos alimentares para a melhoria da aceitabilidade de hidrolisados protéicos, eliminando o sabor amargo destes. O valor nutritivo das proteínas também pode ser melhorado através da incorporação de etil éster de aminoácidos ou pela aplicação de misturas de hidrolisados utilizados como substrato (BELIKOV & GOLOLOBOV, 1986).

Neste trabalho, pretendemos obter as condições mais adequadas para a realização das reações de hidrólise e síntese de plasteína a partir dos hidrolisados pancreáticos de isolado protéico de soja e caseína. Os hidrolisados e plasteínas selecionados serão então submetidos à caracterização química e imunológica parcial, visando sua futura aplicação clínica na terapia da alergenicidade.

Pretende-se também obter um produto de qualidade nutricional adequada e de baixo custo quando comparado aos hidrolisados de caseína e soro lácteo existentes no mercado, através da mistura de proteínas do IPS e caseína. Estas matérias primas apresentam boa disponibilidade no mercado nacional, sendo o IPS um importante produto de exportação.

A realização deste estudo propicia o desenvolvimento de tecnologia nacional promovendo a integração universidade-indústria visando a resolução de um problema clínico aplicado, utilizando conhecimentos e metodologias básicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ALERGIA ALIMENTAR

2.1.1. Introdução

A importância dos alimentos como agentes responsáveis por distúrbios alérgicos tem sido há muito tempo objeto de debates, embora estudos rigorosos tenham sido realizados somente nos últimos vinte anos. As controvérsias existentes atualmente devem-se, em parte, aos dados conflitantes e contraditórios dos estudos clínicos realizados, bem como à ausência de termos precisos e regulamentados (ESTEBAN, 1992).

O termo "reação adversa ao alimento" tem sido usado para descrever a resposta anormal exibida por certos indivíduos após a ingestão de alimentos que são usualmente tolerados pela maioria dos indivíduos de uma mesma comunidade. Esta resposta anormal tem sido relatada desde o início dos registros históricos. Hipócrates (460-370 A.C.) foi um dos primeiros a reconhecer que o leite de vaca poderia causar distúrbios gástricos e urticária (SIMOPOULOS, 1986). Um dos primeiros registros americanos sobre alergia ao leite de vaca foi feito por Talbot em 1916 (SIMOPOULOS, 1986).

O termo alergia é assim usado para descrever uma reação imunológica alterada à um material estranho, o qual é então denominado de alérgeno. Muitos destes alérgenos são comumente proteínas, embora uma variedade de outros compostos tenham sido implicados (TAYLOR, 1992).

A "alergia alimentar" ou "hipersensitividade alimentar" é um tipo de reação adversa ao alimento que envolve o sistema imune. Outros tipos de reações adversas podem incluir àquelas mediadas por mecanismos farmacológicos, tóxicos, metabólicos e neuropsicológicos. A alergia e a intolerância alimentar podem se confundir devido aos sintomas similares produzidos, especialmente as manifestações clínicas localizadas no trato gastrointestinal (POLANCO, 1992). Visando eliminar

confusões quanto aos termos utilizados, tem sido sugerido o termo "intolerância alimentar" às condições de patogênese não imunológica (ANDERSON, 1986).

Considerando a quantidade de alimentos processados que o sistema gastrointestinal recebe durante a vida de um indivíduo, não é surpreendente, sob certas circunstâncias, que este material estranho possa produzir uma reação adversa e/ou servir como veículo para agentes nocivos (ESTEBAN, 1992). A frequência destas reações e a diversidade dos agentes causadores parecem ter aumentado durante este século, e mais precisamente, durante as últimas duas décadas. Entre os fatores que provavelmente contribuíram para este fenômeno se inclui as mudanças drásticas no meio ambiente e estilo de vida e os hábitos alimentares dos indivíduos. As modificações durante a produção da fonte alimentar, processamento e preservação, tem introduzido ao trato gastrointestinal novos componentes dietéticos. Ao mesmo tempo, há um aumento no número de indivíduos com imunodeficiência genética ou adquirida, como provável sinal de imaturidade ou involução de nosso sistema digestivo ou metabólico (ESTEBAN, 1992; WALKER, 1992).

Além dos alimentos, uma ampla variedade de aditivos e contaminantes são encontrados nos produtos alimentares e que podem desenvolver reações adversas. Dentre eles, destacam-se o metabissulfito de sódio, glutamato monossódico e os corantes azotados, principalmente o tartrazina (SAMPSON, 1986). Uma ampla variedade de alimentos contém aminas vasoativas e outros agentes farmacológicos capazes de induzir diversos sintomas gastrointestinais e neurológicos. O agente farmacológico mais consumido é a cafeína. Entre as aminas vasoativas, a histamina e tiramina estão presentes em uma variedade de alimentos. Queijos, carne de porco, salsichas e alimentos fermentados contém quantidades significativas de histamina (> 225 µg/mg de alimento). Vários tipos de queijos, abacate e arenque em conserva constituem fontes da tiramina (>100 µg/mg de alimento). Além destes compostos, vários alcalóides como a solanina também podem produzir distúrbios gastrointestinais (SAMPSON, 1986).

A alergia alimentar é um problema nutricional que afeta tanto crianças quanto adultos, sendo que a maior incidência está presente entre os primeiros. A

prevalência de alergia à proteína de leite de vaca é estimada entre 1,0 e 7,0% da população infantil (MERRIT et alii, 1990).

A eliminação dos alimentos responsáveis pela alergia tem sido recomendada como terapia convencional. Entretanto, se ocorre sensibilidade por múltiplos alimentos ou se alimentos nutricionalmente importantes estão implicados, tal eliminação poderá ocasionar em má nutrição quando o período de tratamento é prolongado (OGAWA et alii, 1991).

Embora qualquer alimento possa ser potencialmente um sensibilizador, a quantidade de alimentos consumida adicionada de seu potencial alergênico intrínscio, afetam a manifestação da alergia na população (ESTEBAN, 1992). A grande frequência de alergia à soja no Japão (SHIBASKI et alii, 1980), às nozes em geral nos Estados Unidos (SACHS et alii, 1981) e aos peixes na Escandinávia (ESTEBAN, 1992) é associada às quantidades destes alimentos consumidos nos respectivos países.

CRESPO et alii (1992) ao ordenar, pela distribuição de frequência, os alergenos mais importantes durante o primeiro ano de vida, demonstrou ser o leite de vaca o alérgeno inicial mais importante, abrangendo 97,5% do total do número de casos, sendo a maior frequência verificada durante o primeiro e segundo trimestre do 1º ano de vida. Os alimentos seguintes compreenderam ovos e peixes, com 64,4% e 47,9% do total do número de casos, respectivamente. Em oposição, estes alimentos apresentaram maior frequência alérgica durante o terceiro e quarto trimestre do 1º ano de vida.

2.1.2. Mecanismos imunológicos envolvidos na alergia alimentar

No homem estão presentes 5 classes moleculares de imunoglobulinas, designadas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Destas, a IgG é a mais conhecida e representa cerca de 80% do total dos anticorpos no antisoro (1275 ± 500 mg/dl). Este elevado nível sérico é o resultado dos elevados valores de síntese (cerca de 28 mg/kg de peso corpóreo/dia) e meia-vida de aproximadamente um mês. Possui peso molecular de 150.000, dos quais 2,5% estão sob a forma de carboidratos. Sua molécula consiste

basicamente de duas cadeias H e L, unidas por ligações dissulfeto (H_2L_2) (BARRET, 1988).

A IgA representa somente 5 a 15% de todas as γ -globulinas séricas (225 ± 55 mg/dl). Estudos estruturais tem revelado que a IgG e a IgA possuem várias características em comum. Ambas são compostas de quatro cadeias peptídicas, duas cadeias L e duas H. As cadeias L (κ - e λ -cadeias) em ambas as moléculas são idênticas. As cadeias H da IgA diferem da IgG por conter um grande conteúdo de carboidratos, aproximadamente 10% do total da molécula e apresentarem diferenças na sequência dos aminoácidos. A relação de IgG : IgA no soro é de 6 : 1; isto também é verdadeiro para os fluídos sinoviais, fluido cérebroespinal, humor aquoso e outras secreções internas. Em contraposição, nas secreções externas como o colostro e leite de transição, muco nasal e respiratório, muco intestinal e saliva, a IgA esta presente em concentrações muito mais elevadas que a IgG ou IgM. O componente secretório é encontrado como parte da IgA em várias espécies animais examinadas, inclusive em humanos. Este componente existe como cadeia peptídica simples e é pobre em metionina e rico em glicina. Cerca de 11% de seu peso está sob a forma de carboidratos (BARRET, 1988).

A IgM é a imunoglobulina de maior peso molecular (~ 950.000) e constitui cerca de 5 a 10% (125 ± 45 mg/dl) das imunoglobulinas do soro no homem adulto. Devido o seu peso molecular ser cinco vezes maior que o da IgG, tem sido considerado que a IgM é constituída de 10 cadeias L e 10 H também unidas por ligações dissulfeto (BARRET, 1988).

A IgD é uma imunoglobulina típica (H_2L_2) e está presente no soro cerca de 150 vezes menos que a IgG ($30 \mu\text{g/ml}$). A IgE está presente em pequenas quantidade no soro ($<$ de 1%) e apresenta peso molecular de 190.000. Os carboidratos representam cerca de 10,7 a 11,7% do total da molécula. As propriedades destas imunoglobulinas estão esquematizadas na Tabela 1 (BARRET, 1988).

Tabela 1. Comparação das propriedades das imunoglobulinas clássicas e IgE (BARRET, 1988).

| Propriedades | Imunoglobulinas clássicas | IgE |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Imunoglobulinas incluídas | IgG, IgA, IgM, IgD | IgE |
| Estabilidade a 56 - 60°C pelo período de 30 minutos a 4 horas | estável | lábil |
| Reações com antígeno in vitro | precipitação, aglutinação, fixação de complemento, etc | combinação não observada diretamente na reação |
| Classes de alergia associada | citotóxica e complexo imune | imediate ou atópica |
| Passagem placentária | IgG | não |

Os mecanismos imunológicos envolvidos na alergia às proteínas alimentares podem ser categorizados conforme proposto por GELL & COOMBS, 1978 (citado por BARRET, 1988) em: (a) Hipersensibilidade imediata (IgE); (b) Anticorpos citotóxicos (IgG); (c) Complexo antígeno-anticorpo com ativação do complemento e (d) Hipersensibilidade tardia (células T).

O mecanismo imunológico primário envolvido nas reações alérgicas aos alimentos é provavelmente a reação de hipersensibilidade imediata, a qual é mediada pelo complexo alergeno-IgE (TAYLOR, 1992). Neste caso, os sintomas aparecem em poucos minutos, usualmente não mais que uma hora após a exposição ao alergeno. Os órgãos afetados incluem primariamente a pele e mucosas, o sistema respiratório e o trato gastrointestinal. Assim, os sintomas deste distúrbio podem ser expressos como eczema, urticária, angioedema, rinite, asma, dor abdominal, vômito, diarreia e outros (MERRIT et alii, 1990; CATSIMPOLAS, 1979).

MINFOR et alii (1982) ao revisarem o quadro clínico de 68 crianças com intolerância ou alergia alimentar, verificaram que das crianças afetadas, 79%

apresentaram os primeiros sintomas durante primeiro ano de vida. Quarenta e oito (70%) crianças apresentaram sintomas gastrointestinais (vômito, diarreia, cólica e distensão abdominal), 16 (24%) manifestações cutâneas (eczema, urticária), e 4 (6%) sintomas no sistema respiratório (asma).

Estes sintomas são ocasionados por compostos denominados mediadores, os quais são constituídos por aminas vasoativas e polipeptídios, sendo a histamina o mais importante por ser identificado aos sintomas clínicos típicos. Estes mediadores são liberados por mastócitos e basófilos sensibilizados (PERLMAN, 1977). Esta sensibilização resulta da interação entre o alérgeno e a IgE específica na superfície destas células. Esta ligação impõe certos requerimentos estruturais ao alérgeno, o qual deveria ser capaz de se ligar à duas moléculas de anticorpos IgE na superfície da membrana destas células. Conseqüentemente, o alérgeno deve apresentar extensão apropriada para permitir tal ligação, podendo possuir mais de um sítio de ligação. Esta extensão parece estar relacionada a três fatores básicos: a imunogenicidade da proteína, a permeabilidade intestinal a ao requerimento de ligação (TAYLOR, 1992).

O sistema de transporte de peptídios, diferentemente dos aminoácidos, tem sido descrito a nível das membranas nas vilosidades e desempenham um papel importante na assimilação de proteínas (MATTHEWS, 1977). A hidrólise intracelular de pequenos peptídios é, assim, um importante estágio da digestão protéica. Atualmente, tem sido aceito o conceito de que quantidades significantes destes peptídios possam escapar desta digestão final e passar à circulação sob forma intacta (GARDNER, 1988).

A assimilação dos peptídios plasmáticos foi recentemente demonstrada por KUROSAWA et alii (1991). Os autores verificaram que dipeptídios administrados por via intravenosa ou através de perfusão no fígado eram rapidamente hidrolisados em seus aminoácidos constituintes. Os resultados mostraram também que todos os órgãos testados (com exceção do cérebro) possuem habilidade intrínseca para assimilar os dipeptídios. Assim, do ponto de vista nutricional, os peptídios plasmáticos de tamanho apropriado podem ser considerados equivalentes aos seus aminoácidos constituintes.

O intestino tem sido reconhecido como importante órgão do sistema imune. Além de conter, a nível de mucosa, uma população substancial de linfócitos e macrófagos, o intestino delgado contém numerosas placas de Peyer, claramente discernidas como nódulos do tecido linfóide. Estas placas parecem exercer duas funções distintas: imunização aos antígenos que tenham cruzado o epitélio, e inibição do antígeno pela promoção da digestão intraluminal (ou na superfície das vilosidades)(GARDNER, 1988).

As células M (ou células membranosas) desempenham papel importante no intestino como órgão imunológico. A hipótese é de que estas células permitem o acesso direto do antígeno luminal aos linfócitos sub-epiteliais, podendo elicitar uma resposta imune (GARDNER, 1988). Outro resultado do acesso de antígenos aos tecidos linfóides associados é a síntese de IgA secretória. Este anticorpo na forma dímera combinado a uma proteína secretoria são encontrados em grande quantidade no glicocálix na superfície epitelial. Tem sido relatado sua função na redução da ligação bacteriana à superfície epitelial, inibindo a toxina cholera, assim como a formação de complexo imune antígeno-IgA, o que promove a migração do antígeno às membranas de superfície dos enterócitos e a endocitose (FERGUSON, 1984).

SHAH et alii (1982) ao determinarem os níveis de anticorpos (IgA e IgM) no fluido duodenal de indivíduos sensibilizados às proteínas do leite de vaca, demonstraram que estes aumentam em paralelo à atividade proteolítica seguida de estimulação pela pancreozinina e secretina. Este estudo sugere que a ingestão dos alimentos por si só aumentam os anticorpos disponíveis.

Outros polímeros biológicos que, em sua forma química pura não são considerados antígenos, podem se acoplar covalentemente às proteínas ou polissacarídeos para formar neoantígenos *in vivo* sendo denominados haptenos. Os ácidos nucleicos (RNA e DNA) assim como os lipídios podem desempenhar função haptênica. Compostos como sais livres de diazônio e compostos dinitrofenil flúor e cloro substituídos são representativos de haptenos altamente reativos (BERZOFSKY, 1985).

O peso molecular de 10.000 daltons representa o limite mínimo para uma resposta imunogênica, embora pequenos peptídios e outras moléculas podem se ligar aos peptídios maiores e induzir a resposta haptênica (TAYLOR et alii, 1987). Proteínas como insulina (PM 5.700), protaminas e histonas (PM 6.000) e frações da gelatina de baixo peso molecular (PM 10.000) são considerados antígenos fracos. Os polissacarídeos de peso molecular equivalente ao das proteínas são frequentemente menos antigênicos devido ao fato de serem, usualmente, constituídos de somente 4 ou 5 unidades diferentes de monossacarídeos, enquanto as proteínas contém de 18 a 20 aminoácidos diferentes. A heparina (PM 17.000), por exemplo, não é imunogênica (BARRET, 1988).

O limite superior para o peso molecular de um alergeno pode ser ditado pela sua retenção na mucosa intestinal. Proteínas com peso molecular maior que 70.000 daltons provavelmente não são absorvidas pela mucosa intestinal, não tendo acesso às células produtoras de IgE do organismo (TAYLOR et alii, 1987). FERGUSON (1984) observou que a maioria dos alérgenos alimentares apresentam peso molecular na faixa de 18.000 a 36.000 daltons; enquanto TAUDORF et alii (1984) os considera na faixa de 10.000 - 50.000 daltons.

Em cada alergeno há regiões específicas de tamanho limitado que funcionam como sítio antigênico determinante, também conhecidos como epitopos. O número de determinantes antigênicos por molécula de antígeno é referido como a "valência do antígeno". A valência antigênica de uma molécula pode ser considerada em dois contextos: a valência total e a valência funcional. A primeira é considerada em função do peso molecular, considerando-se que existe um sítio de valência para cada fração de PM 10.000. Os sítios de valência funcional podem ser medidos pelas moléculas de anticorpos que se ligam ao antígeno através de ensaios sorológicos. A valência total de uma molécula compreende a soma dos sítios de valência funcional e não funcional (BARRET, 1988). A albumina sérica, por exemplo, que possui peso molecular ao redor de 70.000, contém 6 sítios de valência funcional. Quando esta é submetida a digestão enzimática produz 9 peptídios, cada qual capaz de precipitar um anticorpo. Considerando que esta precipitação requer dois sítios de valência, um total mínimo de 18 sítios determinantes estão presentes na molécula original. Assim, a valência total da albumina bovina sérica é de 3 vezes a sua valência funcional (BARRET, 1988).

A composição e sequência da unidade estrutural individual da macromolécula é referida como estrutura primária. Quando a sequência destas unidades confere antigenicidade sobre uma molécula, esta é denominada determinante sequencial antigênico. Em contrapartida, os determinantes antigênicos conformacionais são o resultado das estruturas secundária, terciária e quaternária das moléculas. Certas moléculas lineares, como a fibroína da seda possui somente determinantes sequenciais. Entretanto, moléculas mais complexas apresentam ambos os determinantes sequencial e conformacional (BARRET, 1988).

As propriedades específicas que tornam uma proteína alergênica e que são responsáveis pela sua habilidade em estimular a produção de IgE não estão bem esclarecidas. Além do peso molecular, a imunogenicidade de uma proteína é relatada, em geral, pela sua solubilidade em fluidos biológicos, sequência de aminoácidos, conformação do peptídeo e pela flexibilidade da região correspondente dentro da proteína intacta (FIESE et alii, 1987; BARRET, 1988; TAYLOR, 1992). GOODMAN (1980) sugere que a complexidade química é um fator que favorece a imunogenicidade de um peptídeo.

Estudos realizados por CAMPOS-NETO et alii (1978) referentes à imunogenicidade de polipeptídeos sintéticos, demonstraram que o número de aminoácidos na cadeia peptídica desempenham um papel importante, sendo que moléculas com menos de 7 resíduos de aminoácidos (1080 daltons para a DNP-poli-lisina) não apresentaram imunogenicidade.

SINGH et alii (1980) ao realizarem estudos em camundongos, utilizando peptídeos sintéticos e antígenos polipeptídicos de sequência de aminoácidos conhecida, determinaram as sequências polipeptídicas mínimas necessárias para desencadear respostas imunes humoral e mediada por células. Entre os resultados obtidos, observou-se que os peptídeos contendo de 3 a 6 resíduos de aminoácidos não apresentaram imunogenicidade. Os antígenos que apresentavam 9 resíduos de aminoácidos originavam respostas de anticorpos (células T), mas não hipersensibilidade tardia. Os autores demonstraram ainda que peptídeos contendo 12 resíduos de aminoácidos podem desencadear resposta humoral, proliferativa de células e hipersensibilidade tardia.

Em oposição, dados obtidos por BARRET (1980) a partir de cristalografia por raio X resultaram em um grande número de resíduos de aminoácidos na superfície da ligação antígeno-anticorpo. Ao utilizar radioimunoensaio no caso da ligação lisozima-anti-lisozima, 16 resíduos de antígeno apresentaram-se em contato com 17 resíduos do anticorpo, formando a interface de interação entre estas duas proteínas.

Considerando que os fatores moleculares associados à resposta de anticorpos não se encontram completamente elucidados, é muito importante verificar que a alergenicidade de uma proteína alimentar nem sempre se correlaciona com sua imunogenicidade total. Uma proteína alimentar que induz uma resposta de IgG tanto em modelos animais como em humanos, não necessariamente induz à resposta de IgE. O determinante alergênico da proteína que estimula a produção destes anticorpos podem estar localizados em sítios diferentes (TAYLOR, 1992).

2.1.3. Principais alergenios alimentares

Alguns dos principais alergenios alimentares identificados são de natureza protéica (PERLMAN, 1977). Muitas destas proteínas parecem conter múltiplos alergenios. Entretanto, na maioria dos casos, um ou dois destes funcionam como alergeno principal. Este é definido como aquele alergeno que afeta 50% ou mais dos indivíduos com alergia. Obviamente, indivíduos diferentes podem apresentar respostas adversas às diferentes proteínas (TAYLOR, 1992).

Os avanços no isolamento e identificação de alergenios alimentares ocorreram basicamente a partir da última década. Este progresso tem sido possível devido às combinações entre técnicas de separação de proteínas, particularmente a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio, com ensaios imunológicos que utilizam o antisoro específico ao alergeno (TOVEY e BALDO, 1987).

O leite de vaca é o alergeno mais comum na população infantil (CATSIMPOLAS, 1979; SAVILAHTI, 1992). A concentração protéica no leite de vaca é cerca de três vezes maior que a do leite humano, em torno de 33 mg/L, sendo

que aproximadamente 80% destas proteínas constituem as caseínas (SAVILAHTI, 1992). A propriedade comum às caseínas é a sua baixa solubilidade em pH 4.6, sendo que neste valor de pH as proteínas do soro estão em solução. Estas representam ao redor de 19% da quantidade de proteínas totais do leite de vaca (6,3 mg/L). A proteína mais abundante do soro lácteo é a β -lactoglobulina (60%), a qual existe naturalmente na forma dímica. O peso molecular de cada monômero é de 18.400 daltons. A α -lactoalbumina (20%) promove a transferência da galactose à glucose para formar a lactose. A albumina bovina sérica não é sintetizada pelas glândulas mamárias, mas está presente no leite sob a forma de secreção e compreende cerca de 1,2% das proteínas totais do leite. Os glóbulos de gordura do leite de vaca contém em torno de 1% das proteínas totais do leite de vaca, sendo que várias frações podem ser separadas das membranas solubilizadas. Em adição, o leite de vaca contém pequenas quantidades de β -microglobulina (2mg/L), e duas ferroproteínas: a transferrina e a lactoferrina. A concentração da transferrina é cerca de 100 mg/L no leite maduro.

O leite bovino contém imunoglobulinas, às quais estão na proporção de 3% do total de proteínas. A principal imunoglobulina do leite de vaca, em contraste ao leite humano, é a IgG1, a qual também é transferida para o colostro em quantidades elevadas. A IgA, no leite de vaca, assim como no leite humano, está presente sob a forma secretória (SAVILAHTI, 1992). O leite humano não contém α -caseína nem β -lactoglobulina. As principais proteínas do soro lácteo humano são a α -lactoalbumina, lactoferrina e imunoglobulinas (LEE, 1992).

As fórmulas contendo proteínas de leite de vaca comumente usadas para crianças nascidas a termo contém 15 mg/L de proteínas do leite de vaca, sendo a concentração mais elevada (18 a 20 mg/L) usada em fórmulas para crianças pré-termo. Nas fórmulas, também denominadas "adaptadas" ou "maternizadas", a proporção de caseínas é de 40% (6mg/L) do total de proteína, o qual é equivalente ao leite humano. Estas fórmulas comerciais são elaboradas a partir de leite de vaca tratados termicamente (HILL et alii, 1989). As fórmulas são preparadas a partir de leite desnatado, óleos vegetais, e carboidratos adicionados na proporção adequada para simular a distribuição calórica e digestibilidade do leite humano (BRADY et alii, 1986).

A habilidade do sistema imune em responder aos antígenos como as proteínas do leite de vaca depende, dentre outros fatores, do genótipo e idade do indivíduo, da natureza, dose e frequência de administração do antígeno. A sensibilização prévia ao antígeno, presença de inibidores ou protetores da resposta de anticorpos e o estado imunológico do indivíduo também podem afetar esta habilidade (STROBEL, 1992). Entre os fatores não imunológicos que auxiliam a regular a defesa gastrointestinal aos antígenos podemos incluir a flora e a permeabilidade intestinal, motilidade gastrointestinal, digestão proteolítica e a produção de ácido gástrico e muco protetor (WALKER, 1983).

As proteínas do leite de vaca provocam uma resposta imune do tipo humoral, mediada por células, ou ambas, quando estas atravessam o epitélio do trato gastrointestinal (SAVILAHTI, 1992). A reatividade imune às proteínas do leite de vaca é reduzida com a idade (TAINIO, 1988). Os anticorpos IgG anti-leite de vaca circulantes começam a diminuir após o primeiro ano de vida, enquanto os anticorpos IgA o fazem somente mais tarde, ainda durante a infância (MAY, 1977; TAINIO, 1988). Os anticorpos IgE específicos circulantes e reações de testes cutâneos positivos podem estar presentes em pacientes os quais clinicamente tornaram-se tolerantes ao leite de vaca (SAMPSON, 1985; HILL, 1989). ISOLAURI (1992) sugeriu que o desenvolvimento desta tolerância pode estar associada à maturação do intestino e sua habilidade para reduzir a passagem dos antígenos alimentares. A grande variabilidade nos níveis destes anticorpos em indivíduos diferentes tornam os testes desta natureza de difícil diagnóstico (TAINIO, 1990).

O leite de vaca contém múltiplos alérgenos sendo a α -lactoalbumina considerada como alérgeno principal. A β -lactoglobulina e a caseína tem sido implicados em menor escala (TAYLOR et alii, 1987). O leite de outros animais parece também ser alérgico para os indivíduos com alergia ao leite de vaca. A alérgenicidade às proteínas do leite de cabra foi estabelecida por DARTON-HILL et alii (1987). HILL (1939) verificou através de sintomas clínicos, que dos 73% pacientes com alergia a proteína do leite de vaca, 57% não toleravam o leite de cabra. Crianças com alergia às proteínas do leite de vaca e que apresentam danos intestinais adquirem, frequentemente, hipersensibilidade clínica a outras fontes protéicas utilizadas em dietas de eliminação. SAVILAHTI (1989) relatou reações às proteínas da soja, trigo, ovo, carne de cordeiro e de frango.

O ovo constitui outro alérgeno alimentar proeminente na população pediátrica. Por muitos anos, a clara foi considerada a única responsável pelos processos alérgicos causados pelo ovo; sendo a ovomucóide o principal alérgeno. Estudos recentes têm identificado a ovalbumina e a ovotransferrina como outros dois alérgenos importantes na clara (HOFFMANN, 1983; ELSAYED et alii, 1991). A gema também parece apresentar múltiplos alérgenos com capacidade de ligação à IgE (ANET et alii, 1985). Ovos produzidos de todas as espécies parecem conter proteínas alérgênicas (LANGELAND, 1983).

Entre as leguminosas, a soja constitui fonte alimentar de consumo crescente, representando importante fonte protéico-calórica usada na nutrição infantil de chineses e japoneses por muitos séculos (BUSINCO et alii, 1992). Nos países ocidentais, o uso da soja como substituto do leite de vaca e em casos de crianças com alergia alimentar ocorreram em 1909 por Ruhrah e em 1929 por Hill, respectivamente (BUSINCO et alii, 1992). A partir desta época as fórmulas contendo proteínas de soja tem sido amplamente utilizadas na alimentação infantil .

As fórmulas protéicas de soja contém proteínas purificadas, sendo os isolados protéicos de soja amplamente utilizados. Os lipídeos constituem uma mistura de óleos vegetais, e os carboidratos são representados pelas maltodextrinas, amido de milho, ou sacarose. A alimentação de crianças nascidas a termo com fórmulas de soja é associada com crescimento e balanço nitrogenado normal (JUTO et alii, 1978; KOHLER et alii, 1984). Todas estas fórmulas são isentas de lactose, fortificadas com L-metionina, e adicionadas de taurina, carnitina e ferro (ZOPPI et alii, 1983). O uso destas fórmulas são indicadas no tratamento de crianças com alergia às proteínas do leite de vaca, intolerância à lactose e galactose e gastroenterites (BUSINCO et alii, 1992).

Recentemente a antigenicidade das proteínas de soja tem sido melhor estudada. A fração globulina representa o principal componente protéico (90%) e é basicamente composto pela β -conglucina e glicina. A β -conglucina é uma glicoproteína com peso molecular aproximado de 180.000. Existe sob a forma trímica composta de 3 sub-unidades principais: α -1, α e β , as quais possuem peso molecular de 76.000, 72.000 e 53.000, respectivamente. A glicina tem peso molecular de 320.000

a 360.000 sendo composta de 6 sub-unidades; os polipeptídios são heterogêneos e apresentam peso molecular na faixa de 19.000 a 45.000. As globulinas apresentam 4 componentes principais de sedimentação na ultracentrifugação, designadas por 2S, 7S, 11S e 15S, respectivamente (BROOKS, 1985; BURKS et alii, 1988).

HERIAN et alii (1990) encontrou vários alergenos da soja com subunidades de peso molecular 50.000 - 60.000 daltons, utilizando o soro de indivíduos adultos com histórias de reações adversas à soja e nozes em geral. Este mesmo grupo identificou um alergeno de peso molecular 20.000, utilizando o soro de pacientes que eram sensíveis somente a soja. SHIBASAKI et alii (1980) observou que as maiores frações das proteínas de soja, a 2S, 7S e 11S, apresentavam atividade alergênica, sendo que a fração 2S foi reportada ser a mais alergênica entre os componentes da proteína de soja.

BURKS et alii (1988), utilizando o soro de crianças com dermatite atópica induzida pela soja investigou a ligação de anticorpos específicos (IgE e IgG) às proteínas da soja e suas frações (7S, 11S e proteínas solúveis) utilizando as técnicas de ELISA e imunoblotting. Verificou-se que os níveis de IgE e IgG estavam elevados nestes indivíduos, contudo nenhuma fração apresentou-se mais antigênica. Em contraposição, TAUDORF et alii (1984) ao realizarem um estudo imunológico em 12 pacientes atópicos comparando a proteína de soja consumida diariamente (30g) sob a forma intacta e hidrolisada durante um período de 3 meses, constatou que não houve mudanças nos parâmetros imunológicos realizados (IgE e IgG específicas, radioimunoeletroforese cruzada e teste cutâneo).

A proteína de soja apesar de não ser tão alergênica quanto a proteína do leite de vaca, pode ocasionar distúrbios alérgicos em aproximadamente 25% dos lactentes alérgicos a proteína do leite de vaca (POWELL, 1978). FRIES (1971) ao estudar um grupo de 30 crianças na faixa etária de 3 a 13 anos, todos alérgicos do tipo atópico e com sintomas clínicos do tipo respiratório, verificou que os testes intracutâneos foram positivos para leite de soja em pacientes que eram sensíveis ao leite de vaca.

A possibilidade de que a alimentação da criança afeta o risco da alergia subsequente pode ser expressa por 3 hipóteses alternativas. Primeiro, o leite de vaca introduzido nos primeiros meses de vida pode ser especificamente alergênico; segundo, qualquer outro alimento, diferente do leite materno, pode promover distúrbios alérgicos; e terceiro, o leite materno pode ser especificamente protetor (MISKELLY et alii, 1988). Estudos realizados por estes autores através da triagem controlada e ao acaso demonstraram ser verdadeira a primeira hipótese e resultados permitiram que os autores sugerissem evidências também sobre a 3ª hipótese.

As características estruturais dos alergenos que controlam estas reações cruzadas são desconhecidas. Uma possibilidade é a de que estes alergenos possuam epitopos similares (BARNETT et alii, 1987). Foi realizado um estudo *in vitro* para examinar a possível ocorrência e extensão da reação alergênica cruzada entre leguminosas comumente consumidas (BARNETT, 1987). A alergenicidade cruzada foi demonstrada entre os extratos de nozes, ervilhas e soja. Estes resultados tem implicações importantes para a seleção de dietas hipoalergênicas efetivas como também para o diagnóstico de pacientes com hipersensibilidade alimentar.

Em oposição, BERNHISEL-BROADBENT et alii (1989_{a,b}) , demonstraram que somente 2 de 69 pacientes com um ou mais testes cutâneos positivos às leguminosas (nozes, soja, feijão, ervilha e feijão lima) eram sintomaticamente alérgicas a mais de uma leguminosa. Estes dados foram confirmados através dos métodos químicos de separação (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) e identificação da ligação antígeno-anticorpo (immunoblotting). SAMPSON (1988) ao comparar os extratos comerciais de antígenos alimentares, considerou que ocorrem variações nos diferentes lotes bem como a nível intrapacientes em relação aos resultados de testes cutâneos

Os peixes também podem conter potentes alergenos alimentares (PASCUAL et alii, 1992). A prevalência de alergia aos peixes é elevada quando o seu consumo ocorre em proporções elevadas na dieta de uma comunidade. Na Noruega, onde uma grande porcentagem da população trabalha na indústria do pescado e seus derivados e onde o peixe (particularmente o bacalhau) faz parte da dieta básica, a prevalência deste tipo de alergia alcança 1/1000 da população em geral. Na Suécia,

39% dos pacientes pediátricos com alergia alimentar tem alergia aos peixes em geral (PASCUAL et alii, 1992). Estudos realizados na Espanha por PASCUAL et alii (1992) determinaram a prevalência de 22% de alergia ao peixe, considerando todos os pacientes com diagnóstico de hipersensibilidade alimentar, aparecendo na sequência o ovo e o leite de vaca.

A maioria dos alergenios presentes nos peixes não tem sido identificado, com exceção do alergenio M presente no bacalhau. Este alergenio é uma proteína sarcoplasmática pertencente a um grupo de proteínas conhecidas como parvalbuminas, contendo 113 resíduos de aminoácidos e 1 molécula de glucose. Apresenta ainda peso molecular de 12.328 daltons e ponto isoelétrico 4,75 (AAS, 1980). Estudos sugerem que o alergenio M possui vários sítios de ligação IgE distribuídos ao longo da cadeia polipeptídica (ELSAYED, 1975).

PASCUAL et alii (1992) utilizando técnicas de focalização isoelétrica, eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e immunoblotting, observaram que vários alergenios são comuns a todas as espécies de peixes estudadas. Em adição constatou-se que estes alergenios são capazes de se ligar à IgE específica do soro de pacientes sensibilizados. Estes resultados devem ser considerados quando da introdução de alimentação suplementar contendo peixe e seus derivados às crianças, em particular àquelas que possuem risco elevado de atopia.

SACHS & YUNGINGER (1991) recomendam que, caso não seja possível realizar testes cutâneos com várias espécies de peixes, todos devem ser removidos da dieta de pessoas sensíveis.

Outras fontes de alergenios alimentares incluem os cereais, crustáceos e moluscos, carnes, vegetais (inclusive frutas) e bebidas. Os aditivos alimentares, bactérias e fungos; e artrópodos são responsáveis pela ocorrência de uma ampla variedade de alergias "alimentares", as quais têm pouca relação com a natureza do alimento em si (CATSIMPOLAS, 1979).

2.1.4. Efeitos do processamento na imunogenicidade das proteínas alimentares

As proteínas alergênicas alimentares podem ser resistentes à vários tratamentos durante o processamento, dentre os quais destacam-se o calor e pH ácido (TAYLOR, 1992). Devido a denaturação térmica ocasionar mudanças conformacionais nas proteínas, a antigenicidade das proteínas do leite de vaca podem ser alteradas pelo calor (TAYLOR, 1986; LEE, 1992). Estudos realizados por LEE (1992) a fim de verificar as principais mudanças conformacionais das proteínas do leite de vaca durante o tratamento térmico sugeriu as seguintes hipóteses: (a) na temperatura de pasteurização (65 a 71°C), a mobilidade de certas partes da cadeia polipeptídica é aumentada favorecendo a abertura da estrutura secundária como as α -hélices e β -estruturas. O aumento da energia cinética poderá quebrar algumas ligações dissulfeto intramoleculares; (b) acima de 70°C, durante a mistura das gorduras, minerais e ingredientes do leite, as moléculas protéicas abrem-se mais, podendo formar ligações dissulfeto intermoleculares. As interações hidrofóbicas podem ocorrer e associar partes da cadeia peptídica.

As fórmulas comerciais são geralmente esterilizadas em torno de 120 °C por 10 minutos. Nestas condições, a maioria da estrutura secundária é destruída. As cadeias polipeptídicas existem primariamente como cadeias ao acaso. Durante o processamento destas fórmulas, o pH do produto é mantido neutro ou ligeiramente ácido. Assim, as reações químicas que podem ocorrer em pH alcalino, como a formação de lisinoalanina, não ocorrem em extensão significantes.

Dentre as proteínas do leite de vaca, a albumina bovina sérica é a mais lábil ao calor, a α -caseína é a mais estável e a β -lactoglobulina também considerada relativamente estável ao calor (TAYLOR, 1986). De fato, as caseínas estão naturalmente denaturadas considerando que elas são constituídas de cadeias ao acaso (um estado "denaturado") e de poucas estruturas secundárias. No leite, a caseína está presente basicamente sob a forma de dispersão coloidal formando complexos com minerais, sendo que várias moléculas de caseína atuam como "solvente" para as outras, proporcionando uma proteção às influências externas (LEE, 1992). A porção inorgânica das micelas de caseína consiste de fosfato de cálcio coloidal e citrato. Estes neutralizam as cargas negativas das caseínas fosforiladas e auxiliam na estabilidade da micela.

A caseína no leite pode resistir à temperatura de 130°C por 1 hora sem coagulação (KILSHAW et alii, 1982). Eventualmente, a caseína coagulará, não em função da denaturação térmica, mas devido à redução do pH, como resultado da decomposição da lactose (LEE, 1992). A denaturação das proteínas do soro ocorrem em temperaturas mais baixas, sendo de 78°C para a β -lactoglobulina, 62°C para a α -lactoalbumina, 72°C para as imunoglobulinas e 64°C para a albumina bovina sérica (KILSHAW et alii, 1982).

MAY (1982) ao realizar estudos para verificar a imunogenicidade do leite integral e de suas diversas frações, constatou que a caseína retém sua antigenicidade quando submetida ao tratamento de 120°C por 15 minutos, enquanto para a β -lactoglobulina e α -lactoglobulina é necessário a temperatura de 100 °C e para a albumina bovina sérica e γ -globulina entre 70 e 80°C. Este autor verificou ainda que o leite quando submetido à temperatura de 126,7°C durante 8,5 minutos induz a redução da resposta imunogênica ao ser comparado com o leite pasteurizado. HEPPEL et alii (1984) ao estudarem a influência do tratamento térmico nas proteínas do soro lácteo, verificaram que sob condições de 100° ou 115°C por 30 minutos, estas proteínas foram extensivamente denaturadas quando comparadas às proteínas do soro lácteo pasteurizadas. Constatou-se ainda que, após este tratamento, não houve sensibilização para anafilaxia cutânea (PCA) em cobaias. É importante ressaltar que o tratamento térmico desta magnitude reduz, e muito, a qualidade nutricional do leite (TAYLOR, 1986).

DEMONTI (1993) ao realizar um estudo imunoquímico sobre a fração glicinina da soja em condições nativas e submetida a variações de temperatura e pH, verificou que estes fatores, isoladamente, não indicaram alteração na antigenicidade desta fração. Entretanto, a associação destes tratamentos comprovaram que a temperatura de 100°C e pH 2,0 interferem na antigenicidade, diminuindo-a. A autora sugere, então, que esta capacidade está primeiramente associada a sua configuração nativa.

2.1.5. Fatores que influem na alergia alimentar

As alergias às proteínas alimentares são geralmente temporais e variam em duração (ELLIS et alii, 1991). Entre as razões pelas quais os lactentes são mais susceptíveis às alergias alimentares, pode-se incluir a imaturidade enzimática, permeabilidade do trato gastrointestinal aumentada e baixa secreção de IgA.

No adulto, a hidrólise das proteínas ingeridas se iniciam no estômago por ação da pepsina e do ácido clorídrico. As proteínas se encontram parcialmente fragmentadas quando chegam ao intestino delgado. No lactente, entretanto, a maior parte da hidrólise das proteínas ocorre no intestino delgado por parte das peptidases que ali são secretadas (LEBENTHAL & LEE, 1980).

As reações alérgicas ao leite de vaca são favorecidas ainda pela rápida absorção intestinal e/ou digestão incompleta dos produtos lácteos. Esta digestão parcial poderia ser explicada pela baixa acidez gástrica durante a infância, elevada capacidade tamponante do leite, e pela baixa atividade da função pancreática exócrina (LEBENTHAL & LEE, 1980).

Durante os primeiros meses de vida, o trato gastrointestinal do lactente apresenta permeabilidade aumentada favorecendo a passagem de antígenos presentes nos alimentos. A redução da permeabilidade do trato intestinal ocorre por volta dos 3 aos 4 meses de idade. A IgA secretória complexa os antígenos alimentares inibindo sua passagem através do intestino. Entretanto, no trato gastrointestinal do lactente a IgA secretória se encontra em baixos níveis, permitindo uma maior união dos antígenos à mucosa intestinal, aumentando a possibilidade de absorção (KLEMOLA et alii, 1986). O desenvolvimento local de IgA específica em resposta às proteínas do leite de vaca determinam a redução da hipersensitividade clínica (ISOLAURI, 1992).

Os fatores adicionais que tornam o lactente mais susceptível às alergias alimentares incluem: história familiar de alergia, infecções virais que possam ocasionar danos à mucosa gastrointestinal e a influência da alimentação e meio ambiente (BISHOP et alii, 1990; ELLIS et alii, 1991). O risco de se desenvolver alergia alimentar é duas vezes maior em crianças com história parenteral simples de distúrbios

alérgicos; e de quatro a seis vezes maior para crianças com história parenteral dupla (TAYLOR, 1986). JAKOBSSON (1991) ressalta a importância de se considerar a passagem de antígenos via placentária e leite materno como causas da sensibilização e desenvolvimento de alergia alimentar.

A interação dos fatores mediante influência da proteína dietética no sistema imune proposto por WALKER (1992) está esquematizado na Figura 1. O autor considera os alérgenos presentes no pescado e nozes como causadores de resposta mediada pela IgE, sendo de caráter permanente; enquanto os alérgenos presentes no leite de vaca e soja, causadores de respostas entéricas e transeúntes.

A exposição aos antígenos alimentares nos primeiros meses de vida em adição à predisposição genética, podem aumentar o risco da criança desenvolver manifestações clínicas de atopia como sintomas gastrointestinais, eczema ou asma (SCHMITZ et alii, 1992). Estes autores realizaram um estudo prospectivo controlado de 256 crianças normais alimentadas com leite humano e escolhidas ao acaso, para receberem como suplemento ao leite humano, quando necessário, uma fórmula adaptada (Nidina, Nestlé) ou uma fórmula hipoalérgica (Nidal HA, Nestlé). As crianças foram examinadas nos dias 5, 90, 150 e 365 a contar da data do nascimento, através de sintomas clínicos. Nos dias 150 e 365 foram realizados testes cutâneos com β -lactoglobulina, caseína, α -lactoalbumina, albumina sérica, ovalbumina, HF (fórmula hipoalérgica hidrolisada), histamina e solução salina. Como resultado, verificaram que as crianças alimentadas com a fórmula hidrolisada apresentaram menor título de IgE específico que aquelas alimentadas com fórmula adaptada. Em oposição, a prevalência dos sintomas clínicos não diferiram entre os dois grupos.

Em adição, EASTHAM et alii (1978) determinaram a importância da idade com respeito a relativa antigenicidade de fórmulas protéicas contendo leite de vaca, soja e hidrolisado de caseína. As crianças alimentadas com hidrolisado de caseína durante os primeiros três meses de vida apresentaram menor título de anticorpos (hemaglutininas) que aquelas alimentadas com as fórmulas a base de soja e leite de vaca, respectivamente.

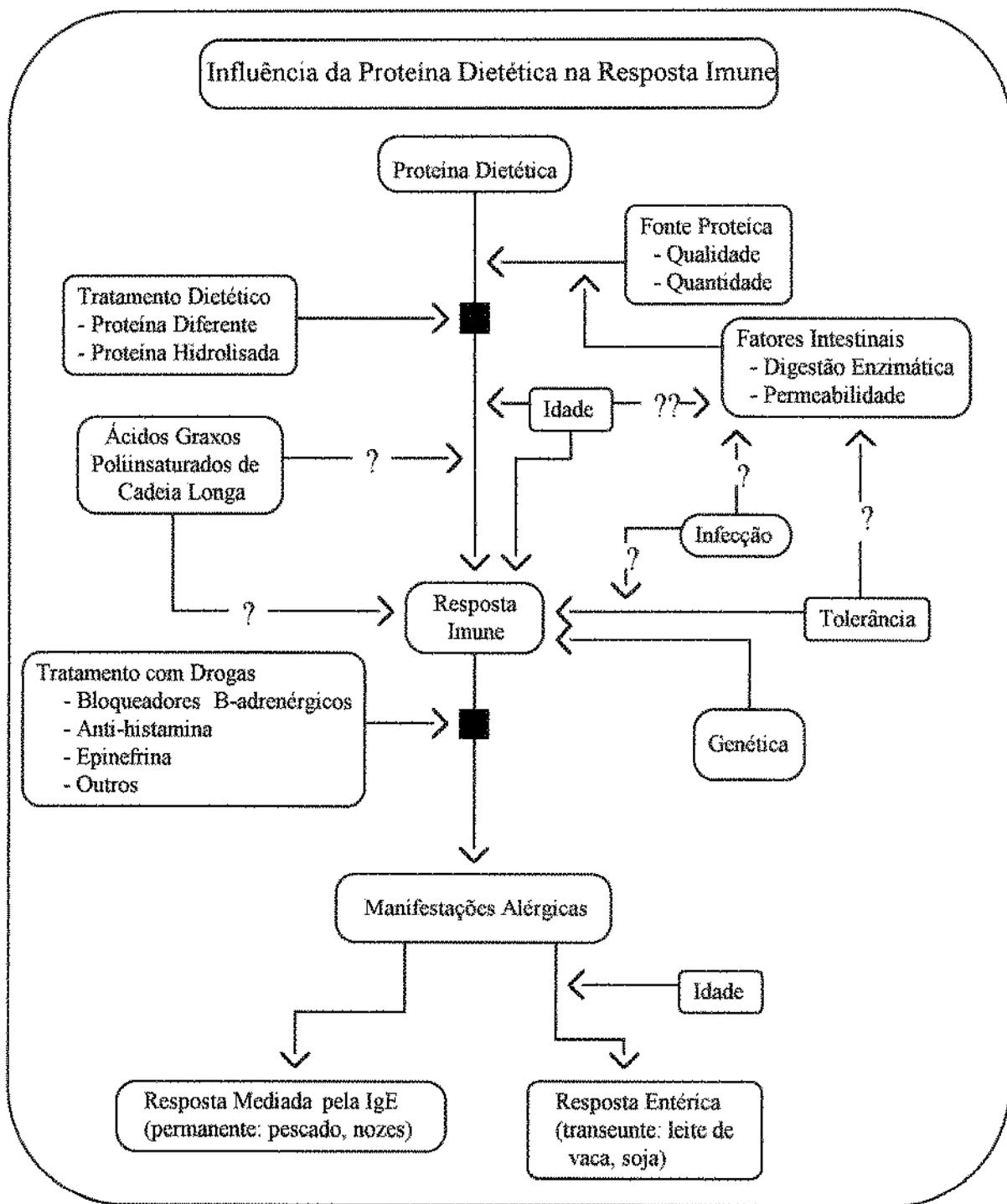


Figura 1. Interação de fatores mediante influência da proteína dietética sobre a resposta imune. As setas marcadas com o sinal de interrogação (?) indicam um efeito sugerido requerendo verificação através de estudos adicionais (WALKER, 1992).

2.1.6. Avaliação da utilização de diversas fontes protéicas na terapia da alergenidade

Embora as vantagens nutricionais, fisiológicas e imunológicas do leite materno tenham sido bem reconhecidas, fórmulas alimentares apropriadas devem estar disponíveis aos lactentes quando este não pode ser provido. Formulados de leite de vaca têm sido modificados objetivando reduzir sua alergenidade. Estas modificações incluem o uso de hidrolisados de caseína e, mais recentemente, hidrolisados de soro lácteo (ELLIS et alii, 1991).

O sub-comitê sobre nutrição e distúrbios alérgicos da ACADEMIA AMERICANA DE PEDIATRIA (1991) recomenda que uma fórmula seja designada "hipoalergênica" quando a base protéica tenha sido modificada para reduzir a antigenidade em 90% dos indivíduos que podem tolerar a fórmula sem apresentar sintomas. KEINMANN (1992) propõe que estas fórmulas sejam avaliadas através de testes pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, testes clínicos em crianças alérgicas e de alto risco de atopia, assim como devem apresentar adequacidade nutricional para promover o crescimento de crianças saudáveis e boa aceitabilidade sensorial.

Durante o desenvolvimento destas fórmulas dispõe-se de uma variedade de testes não clínicos para caracterizar o produto. O objetivo destes testes são: (1) caracterizar suas propriedades moleculares e imunológicas e (2) assegurar o controle de qualidade no desenvolvimento de produto (YUNGINGER, 1986).

Os métodos físico-químicos frequentemente provêm dados pertinentes à extensão da hidrólise protéica e ao perfil do peso molecular. Para se determinar a extensão da hidrólise são utilizados testes baseados no aumento dos grupos amino livres no produto ou através de sua solubilidade em solução de ácido tricloroacético (TCA). Os métodos cromatográficos, usualmente a cromatografia de exclusão molecular, provêm informações sobre a distribuição do peso molecular do produto. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) tem sido muito utilizada recentemente para prover resolução adicional de peptídios maiores que 5.000 daltons e complementar os dados da distribuição de peso molecular obtidos pela cromatografia de exclusão. A técnica SDS-PAGE também pode

ser usada para monitorar as mudanças ocorridas na proteína durante ou após o processo de hidrólise (LEARY, 1992).

A função primária dos testes imunoquímicos é a de monitorar e verificar a ruptura dos epitopos específicos ocasionados pela hidrólise enzimática e processos associados. Os testes imunoquímicos não clínicos são utilizados para estimar a antigenicidade e a imunogenicidade do produto. Antigenicidade é definida em termos da reatividade específica ao anticorpo pré-formado, enquanto a imunogenicidade se refere a indução da resposta imune em um hospedeiro não sensibilizado (CORDLE et alii, 1991).

A atividade antigênica residual do produto é estimada determinando sua reatividade com anticorpos obtidos de animais imunizados com a proteína nativa usada como matéria prima. Dentre os métodos utilizados destacam-se anafilaxia cutânea passiva ou ativa, ensaio imunoenzimático e radioimunoensaio. Os testes que avaliam a imunogenicidade do produto sempre envolvem o uso de um modelo animal. Embora a imunização parenteral com adjuvantes tenham sido utilizadas por vários pesquisadores, a ingestão via oral por cobaias tem sido usado mais frequentemente (LEARY, 1992).

Um formulado à base de hidrolisado de caseína tem sido usado por mais de 40 anos em crianças com problemas na digestão protéica e reações adversas às proteínas intactas do leite de vaca. Alguns estudos pré-clínicos demonstraram que este composto era constituído por peptídios não antigênicos de peso molecular menor que 1.200 daltons (KNIGHTS, 1985).

SAYLOR & BAHNA (1991); BISHOP et alii (1990) e BOCK et alii (1989) descreveram as respostas clínicas e imunológicas em crianças alérgicas ao leite de vaca, as quais apresentaram anafilaxia após a ingestão de pequena quantidade desta fórmula contendo hidrolisado de caseína. Estas experiências descrevem que ocorrem reações mediadas por IgE e estas podem ser severa.

ELLIS et alii (1991) reportaram reação anafilática após a ingestão de uma fórmula contendo hidrolisado de soro lácteo em crianças alérgicas ao leite de vaca e tolerantes à fórmula contendo hidrolisado de caseína. Neste mesmo trabalho, o grupo

demonstrou a variação de anticorpos IgE e IgG4 no soro de indivíduos sensibilizados, quando comparados ao grupo controle constituído por 10 crianças e jovens saudáveis, evidenciando que houve uma elevação nos valores de IgE e IgG4 ligados para todos os antígenos testados : leite de vaca, fórmula contendo soro lácteo, albumina bovina sérica, β -lactoglobulina, caseína e α -lactoalbumina.

ASSELIN et alii (1989) ao avaliarem os efeitos da proteólise *in vitro* sobre a alergenicidade das principais proteínas do soro lácteo, destacou a importância da enzima péptica e provavelmente da secreção ácida do sistema digestivo gástrico na denaturação e/ou degradação destas proteínas. Este grupo concluiu ainda que a proteólise seletiva com pepsina, seguida pela α -quimotripsina demonstrou ser a combinação de enzimas mais eficiente para reduzir a alergenicidade da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina. Estes resultados também sugeriram que este hidrolisado poderia ser considerado um ingrediente adequado para ser aplicado às fórmulas infantis de baixa alergenicidade.

YATSENKO et alii (1990) ao avaliarem as propriedades físico-químicas e imunológicas de um concentrado natural de caseína e seus hidrolisados, constataram que, após hidrólise, as proteínas perdem suas propriedades alergênicas, podendo ser utilizados na terapia de indivíduos que apresentam alergia alimentar.

Uma nova fórmula infantil contendo hidrolisado de caseína foi avaliada por SAMPSON et alii (1991), os quais concluíram que esta fórmula pode ser considerada segura para crianças com hipersensibilidade ao leite de vaca. Recomendam ainda, que todas as fórmulas denominadas "hipoalergênicas" sejam testadas em pacientes alérgicos ao leite de vaca para assegurar seu potencial alergênico.

MERRIT et alii (1990) ao avaliarem 21 crianças menores que seis meses de idade, contendo sintomas gastrointestinais de intolerância às fórmulas infantis baseadas em leite de vaca e/ou soja e tratadas clinicamente com uma fórmula contendo hidrolisado de soro lácteo, considerou que esta fórmula poderia ser uma alternativa aceitável para as crianças com intolerância, mas não com alergia severa mediada por IgE.

FREITAS (1991) ao obter um hidrolisado de caseína e realizar sua avaliação imunológica, constatou que todos os hidrolisados obtidos apresentaram respostas negativas nos testes de anafilaxia cutânea passiva (PCA); enquanto que no ensaio imunoenzimático competitivo houve uma correlação positiva entre o conteúdo de epitopos e a extensão da hidrólise. O autor sugere que o hidrolisado IVB poderia ser utilizado em estudos clínicos preliminares, após avaliada sua hipoalergenicidade em animais de experimentação.

A comparação da atividade alergênica residual através de métodos *in vivo* (teste cutâneo e teste de provocação) e *in vitro* (radioimuno eletroforese cruzada, radioalergosorbente e nível de histamina basófila) de seis diferentes fórmulas contendo proteínas hidrolisadas foi realizado por WAHN et alii (1992). As fórmulas estudadas foram: (a) Hidrolisados extensivos de caseína (Nutramigen e Pregestemil, Bristol-Myers); (b) Hidrolisado extensivo de soro lácteo (Alfaré, Nestlé); (c) Hidrolisado parcial de colágeno-soja (Pregomin, Milupa) e (d) Hidrolisados parciais de soro lácteo (Good Start e hidrolisado experimental ultrafiltrado, Nestlé). Os hidrolisados de soro lácteo apresentaram maior porcentagem de peptídios maiores assim como elevada capacidade para induzir os testes cutâneos e de provocação. Em adição possuem maior habilidade para se ligarem aos anticorpos IgE do soro humano de crianças sensíveis ao leite de vaca. A ultrafiltração do hidrolisado de soro lácteo resultou na redução da atividade alergênica residual. Os hidrolisados de caseína apresentaram muito pouca atividade residual alergênica. Todos os hidrolisados testados induziram significativamente menos ($p < 0,01$) reações comparados as crianças sensibilizadas e induzidas pelo leite de vaca integral. Os autores então recomendam que antes da prescrição destas fórmulas às crianças sensíveis ao leite de vaca, sejam feitos testes individuais como os testes cutâneos e de provocação.

A prevenção dos distúrbios alérgicos na infância incluindo as alergias alimentares depende da habilidade de superar as forças naturais que agem constantemente para sensibilizar humanos a fim de produzir anticorpos IgE. A prevenção dos distúrbios mediados pela IgE poderiam, potencialmente, ser iniciados pela interferência seletiva dos principais fatores (genéticos, celular e ambiental) que, parecem ser os responsáveis pela expressão fenotípica final da atopia (ZEIGER et alii, 1986).

ZEIGER et alii (1986) ao idealizar uma estratégia para prevenir, reduzir ou retardar o desenvolvimento de distúrbios alérgicos em recém-nascidos de risco (história parenteral de atopia ou elevados níveis sanguíneos de IgE umbilical) propõe a retirada dos alimentos mais alergênicos (leite, ovo, soja, milho, trigo, nozes, citrus e peixes) durante os primeiros 12 a 36 meses de vida, assim como reduzir os alergenos inalantes do ambiente. A alimentação ao seio deveria ser estimulada por longos períodos, no mínimo até o sexto mês. O uso de proteínas modificadas enzimaticamente que apresentam adequacidade nutricional e propriedades hipoalergênicas poderiam ser utilizadas até o primeiro ano de idade. O leite de vaca poderia ser introduzido a partir do primeiro ano; ovos a partir do segundo e pescado somente a partir do terceiro ano de idade.

As controvérsias referentes a utilização de hidrolisados para fins alergênicos induzem a necessidade de se estudar diferentes métodos de modificações de proteínas para uso como fonte protéica alternativa. Desta forma, a reação de plasteína se evidencia como possível fonte protéica para este fim.

2.2. REAÇÃO DE PLASTEÍNA

2.2.1. Introdução

A reação de plasteína tem sido considerada um processo enzimático que ocorre de modo reverso à hidrólise usual por proteinases (WATANABE & ARAI, 1988; ERIKSEN & FAGERSON, 1976; HOFSTEN & LALASIDIS, 1976; YAMASHITA et alii, 1976_a; ASO et alii, 1973). Assim, um hidrolisado protéico, composto por uma mistura de peptídios de baixo peso molecular, usado como substrato, formaria por ação enzimática um produto protéico denominado "plasteína". Operacionalmente, a formação de plasteína tem sido definida como a formação de material insolúvel em solução de TCA 10%, etanol 70% ou acetona (SUKAN & ANDREWS, 1981). Esta reação tem sido utilizada para as proteínas de soja e, em menor grau, para caseína, ovalbumina, proteínas de soro lácteo, concentrado protéico de peixe e em fontes protéicas não convencionais.

Nas décadas de 50 e 60, vários estudos foram realizados objetivando a elucidação da relação entre reação de plasteína e biossíntese protéica (HOROWITZ & HAUROWITZ, 1959). Entretanto, desde que o mecanismo de alongamento da cadeia polipeptídica foi estabelecido *in vivo*, as pesquisas da reação de plasteína tem sido direcionada aos interesses da enzimologia (WIELAND et alii, 1960; DETERMANN et alii, 1965_{a,b}).

O interesse pela reação de plasteína aumentou no início de 1970 devido à sua aplicabilidade no preparo de produtos alimentares (BELIKOV & GOLOLOBOV, 1986). FUJIMAKI et alii (1977) consideram que a plasteína pode ser usada para a melhoria da aceitabilidade de hidrolisados protéicos de soja, eliminando o sabor amargo destes, bem como do valor nutritivo de proteínas destinadas ao consumo humano. Tais estudos demonstraram que o valor nutritivo pode ser melhorado através da incorporação de etil éster de aminoácidos acrescentados ao sistema de reação ou pela utilização de misturas de hidrolisados como substratos na síntese de plasteína.

2.2.2. Fatores que influem na reação de plasteína

A reação de plasteína requer três condições que se opõem àquelas necessárias para os valores máximos de hidrólise: o substrato deve ser uma mistura de peptídios de baixo peso molecular, preferencialmente obtidos de uma pré-hidrólise enzimática da proteína. A concentração do substrato no sistema de reação é outro fator importante na ressíntese e deve estar na faixa de 20 a 40% (p/v). A faixa ótima de pH para várias proteases, utilizando-se como substrato um hidrolisado de globulina de soja para a formação da plasteína é restrita a pH 4 - 7 (FUJIMAKI et alii, 1970).

TSAI et alii (1972) ao verificarem a influência da concentração do substrato no rendimento da plasteína obtida a partir de hidrolisado de proteína de soja, verificaram que o rendimento máximo ocorreu quando o substrato representava de 30 a 40% do sistema de reação. Os autores também constataram que a hidrólise parece ser mais predominante quando a concentração do substrato é de 5%. Entre as propriedades reológicas estudadas, verificou-se que o aumento do grau de hidrólise do substrato contribuiu concorrentemente para diminuir a viscosidade, enquanto a elevação da concentração do substrato contribuiu para aumentar a força do gel. Em relação a

capacidade emulsificante, não houve diferença significativa entre as amostras de plasteína, embora estas apresentem capacidade emulsificante significativamente menores quando comparadas à proteína de soja e seus hidrolisados. É possível que as partículas insolúveis resultantes da reação de plasteína sejam responsáveis por estes dados.

TSAI et alii (1974) utilizando as frações de um hidrolisado protéico de soja separados por tamanho molecular, encontrou que as frações contendo peso molecular médio de 1043 (fração II) e 685 (fração III), produziram, respectivamente, plasteína mais eficiente (i.e. substâncias insolúveis em TCA 10%) que as frações de peso molecular abaixo ou acima destes. Foi demonstrado, ainda, que, quando as plasteínas obtidas destas duas frações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5%), o limite superior de peso molecular encontrado foi de 25.000, demonstrando o aumento de peso molecular neste tipo de reação.

SCHMANDKE (1976) obteve resultados concordantes em relação ao rendimento da plasteína, obtendo maior rendimento quando o grau de hidrólise do substrato era de 80% e a concentração de 20 a 40%.

Quando o substrato é incubado em concentrações próximo de 7,5%, não aparece reação que possa ser quantificada pela insolubilidade em TCA 10%. Concentrações baixas de substrato são mais favoráveis à reação de hidrólise (FUJIMAKI et alii, 1977).

A temperatura e o tempo de reação também representam fatores que influenciam no rendimento da plasteína. A temperatura de 37°C e o tempo de incubação de 24 horas são considerados os mais adequados à obtenção da plasteína (FUJIMAKI et alii, 1970, 1977; YAMASHITA et alii, 1970; TSAI et alii, 1974; SUKAN & ANDREWS, 1981; BARRIGA & MIRANDA, 1990).

BARRIGA & MIRANDA (1990) ao estudarem de forma comparativa a reação de plasteína aplicada à caseína e isolados protéicos de soja e tremçoço, verificaram que o rendimento das plasteínas à 37°C foram significativamente iguais aos obtidos a 50°C ou mais. Entretanto, temperaturas elevadas ocasionaram a

formação de um precipitado fortemente escuro. Não houve justificativa para duplicar o tempo de reação de 24 para 48 horas, haja visto que não houve aumento significativo da produtividade da plasteína.

2.2.3. Mecanismos de formação da plasteína

A ligação peptídica na síntese de plasteína pode ocorrer por transpeptidação e/ou condensação. ARAI & FUJIMAKI (1978) consideram ser mais provável que ocorram ambas as reações com extensão variável dependendo das condições experimentais e da natureza dos peptídios envolvidos. Durante o processo, um intermediário acil-enzima possivelmente é formado, sendo subsequentemente atacado por um nucleófilo em solução, conforme demonstrado na Figura 2 (ARAI & FUJIMAKI, 1978; HAJÓS, 1979).

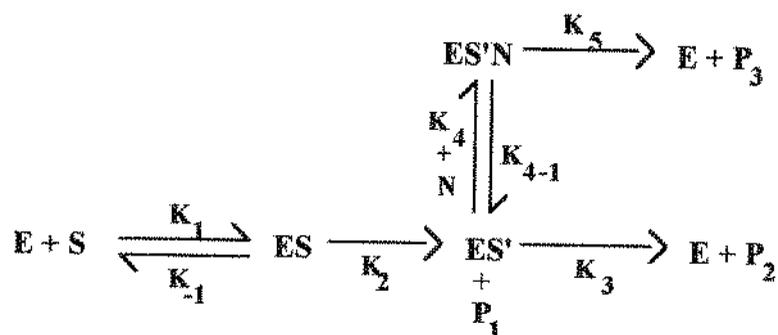


Figura 2. Mecanismos envolvidos na reação de plasteína (ARAI & FUJIMAKI, 1978)

Etil éster de aminoácidos, acrescentados ao sistema de reação, também atuam como nucleófilo e são incorporados durante a síntese de plasteína (FUJIMAKI et alii, 1977). GOLOBOV et alii (1986) demonstraram que a transpeptidação que ocorre na reação de plasteína é o resultado de fatores cinéticos e não devido a fatores termodinâmicos.

YAMASHITA et alii (1970) ao estudarem os mecanismos de formação da plasteína obtida a partir de hidrolisado péptico de proteína de soja verificaram que a quantidade de aminoácidos liberados da plasteína por tratamento com leucina aminopeptidase ou carboxipeptidase-A foram significativamente menores que aqueles

liberados pelo hidrolisado utilizado como substrato, em condições de tratamento similar. Estes resultados suportam a idéia da formação de peptídios de elevado peso molecular durante a reação de plasteína. Estudos de deuteração seguidos por espectrometria em infra vermelho confirmaram a ocorrência do aumento de ligações peptídicas igualmente nos estágios iniciais da formação da plasteína. Ao realizarem avaliação sensorial do produto obtido, utilizando a amostra diluída (1%) em comparação à solução aquosa de feniltiouréia (10^{-6} a 10^{-2}), constatou-se que o hidrolisado péptico de soja apresentou sabor fortemente amargo e sua magnitude diminuiu em concordância à produtividade da plasteína.

O papel da α -quimotripsina na síntese de plasteína foi estudado por TANIMOTO et alii (1972). Os autores verificaram as similaridades e as diferenças entre as reações de hidrólise e de síntese em relação ao sítio ativo, sua conformação ativa, à região hidrofóbica vizinha e ao sistema de transferência de elétrons. Os resultados obtidos indicaram que, também na reação de plasteína, a Ser-195 e His-57 são de especial importância como fatores responsáveis pelo processo catalítico. Na reação de plasteína, uma primeira via constitui-se da formação do peptidil-quimotripsina na Ser-195 com subsequente via da aminólise ou iminólise (ataque nucleofílico) por outro peptídio com auxílio da His-57 servindo de base geral para o processo.

ASO et alii (1973) estudaram a contribuição das ligações dissulfeto na reação de plasteína e a solubilidade em vários sistemas que permitissem informações básicas sobre os fatores que contribuem para a estrutura da plasteína. Eles observaram que as ligações dissulfídricas pouco contribuem para a formação da plasteína. O fracionamento da substância protéica por solubilidade mostrou que 81,5 partes da reação de plasteína constituía fração insolúvel em tampão fosfato 0,035M (pH 7,6). Esta última fração era facilmente solubilizada em dodecil sulfato de sódio 0,3M. Embora em menor quantidade, havia uma fração tipo prolamina que era solúvel em etanol 50% e insolúvel em água, o qual apresentou uma dispersão-agregação reversível com tratamento de aquecimento-resfriamento. Em 1974, este mesmo grupo, estudando a participação das forças hidrofóbicas na reação de plasteína obtida de um hidrolisado péptico da fração globulina da soja, concluiu que estas interações constituem o fator mais importante na cadeia polipeptídica da plasteína.

YAMASHITA et alii (1974) observaram que aminoácidos livres aparecem gradualmente durante a reação de plasteína reforçando a ocorrência da transpeptidação. Ao utilizar como substrato um hidrolisado de globulina de soja, o qual todo grupo carboxila estava marcado com O^{18} , observou ainda que grandes quantidades de H_2O^{18} são liberados na primeira hora durante a formação da plasteína pela α -quimotripsina a pH 5,3. Ao mesmo tempo houve uma redução correspondente nos grupos reativos à ninidrina. Embora este mecanismo esclareça o aumento do peso molecular do produto formado, este aumento não ocorre necessariamente na síntese de plasteína.

Em oposição, HOFSTEN & LALASIDIS (1976) observaram que o alongamento da cadeia peptídica ocorre em pequena proporção durante a formação do gel e produtos insolúveis em água. Eles obtiveram plasteína a partir de hidrolisado enzimático de concentrado protéico de soro lácteo e concentrado protéico de peixe, utilizando proteases bacterianas de baixa especificidade. Os produtos foram caracterizados por cromatografia em Sephadex G-50 após serem tratados com uréia 8M, guanidina 6M, ácido acético 50% e perclorato 2M. Os autores sugerem que a formação do gel na reação de plasteína pode ser descrita como um tipo de rearranjo no qual as reações de transpeptidação e hidrólise são mais importantes que as reações de condensação e as ligações não covalente entre os peptídios de peso molecular relativamente baixos são responsáveis pelas propriedades peculiares dos produtos desta reação.

YAMASHITA et alii (1976) ao acrescentarem várias concentrações dos solventes orgânicos como dioxana e acetona ao meio da reação de plasteína, utilizando um hidrolisado de ovalbumina (grau de hidrólise: 85%), na concentração de 50% (p/v) com α -quimotripsina, mostraram que a produtividade relativa da plasteína é proporcional a uma maior concentração de solvente orgânico, isto é, menor concentração de água.

EDWARDS & SHIPE (1978) demonstraram que a força física do gel e o rendimento da plasteína obtida a partir de um hidrolisado péptico de ovalbumina tratada com α -quimotripsina e papaína, são dependentes do grau de hidrólise do substrato e do tipo de enzima utilizada. A eletroforese contendo SDS indicou não ter

tido aumento no peso molecular da plasteína. Semelhante aos dados reportados previamente, os autores sugerem que a formação de agregados peptídicos insolúveis deve-se principalmente às interações não covalentes.

As plasteínas demonstraram ser completamente rompidas na presença de uréia 8M, ácidos orgânicos a 50% (v/v), detergentes fortemente iônicos e valores extremos de pH quando submetida à filtração em gel (SUKAN & ANDREWS, 1982). O perfil de peptídios confirmou que, estes originalmente presentes no hidrolisado, também estavam presentes na plasteína; e que o conteúdo de aminogrupos não eram alterados na formação de plasteína. Estes experimentos, adicionados aos de eletroforese em gel mostraram que somente ligações hidrofóbicas e iônicas estão envolvidas na formação da plasteína, não tendo sido detectado formação de ligação peptídica ou transpeptidação. A análise de aminoácidos sugeriu que os peptídios hidrofóbicos eram preferencialmente incorporados. Eles ainda obtiveram maior rendimento da plasteína quando a mesma proteinase era usada em ambos os estágios da reação. O uso de enzimas diferentes para produção de plasteína favorece a hidrólise pela diferença na especificidade das enzimas envolvidas. A proteinase pode então permitir continuar o estágio máximo de hidrólise.

A influência do sistema enzimático sob a forma solúvel ou ligada a suporte foi estudada por PALLVICINI et alii (1983). Eles obtiveram as plasteínas a partir de hidrolisado péptico de baixo peso molecular utilizando a α -quimotripsina como catalizador. Os resultados indicaram que as plasteínas obtidas com a α -quimotripsina solúvel eram mais ricas em glicina, valina, leucina e serina, enquanto àquelas preparadas com α -quimotripsina ligada apresentaram teores elevados de ácido glutâmico, lisina, alanina e tirosina; sugerindo a obtenção de uma plasteína mais hidrofílica que aquela preparada com a enzima sob a forma solúvel.

ARAI et alii (1975) propuseram o parâmetro β/α para ser aplicado à plasteína visando melhorar sua produtividade. Este parâmetro expressa a relação entre a insolubilidade da plasteína (β) e a produtividade (α), considerando que a formação da plasteína depende da relação hidrofóbico-hidrofílica dos peptídios envolvidos. Os valores β/α considerados ótimos para formar plasteína mais eficiente devem estar próximos de 0,5. Vários substratos foram classificados de acordo com seus valores de

α - e β/α . Ambos os substratos hidrofílicos e hidrofóbicos produziram plasteína de baixo rendimento, sendo os valores encontrados para a relação β/α menores que 0,4 para os substratos hidrofílicos e maiores que 0,6 para os substratos hidrofóbicos. Entre as plasteínas obtidas neste trabalho, os hidrolisados de caseína e zeína apresentaram produtividade (α) de 40 e 57% e relação β/α de 0,28 e 0,87, respectivamente. Na mistura 3 : 1 destes hidrolisados, os valores obtidos para α foram de 88% e a relação β/α de 0,45 , confirmando os propósitos desta relação.

2.2.4. Enriquecimento da plasteína através da incorporação covalente de aminoácidos

A suplementação de proteínas de baixo valor biológico com os aminoácidos limitantes é um princípio aceito para melhorar o valor nutritivo de uma proteína. Entretanto, nas preparações comerciais este processo tem aplicabilidade limitada porque os aminoácidos livres usualmente produzem odor e flavor indesejáveis durante o processamento e cocção. Em adição, os aminoácidos livres podem reagir com outros componentes e tornarem-se indisponíveis ao organismo (ASHLEY, 1983).

Uma forma quimicamente mais estável do aminoácido pode ser obtida pela sua incorporação covalente durante a síntese de plasteína. Uma vantagem adicional oferecida pela reação de plasteína é a sua estereoespecificidade para a incorporação de L-enantiômeros quando uma mistura de ésteres de aminoácidos é utilizada como substrato (YAMASHITA et alii, 1979).

HOROWITZ & HAWROWITZ (1959) reportaram inicialmente o uso da incorporação de etil éster de aminoácidos na síntese de plasteína. A metionina ocupou 33 e 85% dos grupos N- e C-terminal do total de aminoácidos, respectivamente.

YAMASHITA et alii (1971) reportaram um experimento aplicado a reação de plasteína como meio de incorporar metionina e cisteína à estrutura da proteína de soja, produzindo assim, um produto potencialmente de grande valor nutritivo. Considerando que a formação da ligação peptídica por condensação entre aminoácidos livres é um processo fortemente endógeno ($\Delta F = 4$ Kcal/mol), e a energia requerida para formar uma ligação peptídica entre dois peptídios é bem menor

($\Delta F = 0,4$ Kcal/mol); os substratos utilizados foram os hidrolisados de ovalbumina (fonte de metionina) e de queratina (fonte de cisteína). Os resultados foram mais efetivos para a incorporação da cisteína promovendo o aumento de até 6 vezes no teor deste aminoácido à proteína original. Em um outro experimento, o mesmo grupo utilizou etil éster de metionina apresentando então resultados similares aos obtidos com a cisteína.

A plasteína incorporada com ácido glutâmico resultou em um produto de grande solubilidade (YAMASHITA et alii, 1974, 1976a). Foram utilizados o α , γ -di-éster de ácido glutâmico, os quais são mais reativos que o α -monoetil éster. A quantidade de ácido glutâmico incorporada à plasteína aumentou em 40% quando comparado com os 15% presentes na proteína inicial (globulina de soja). Esta plasteína apresentou-se completamente solúvel em água na faixa de pH 1-9, à temperatura ambiente. Quantidades não apreciáveis de fração insolúvel apareceu quando a solução aquosa de plasteína foi aquecida a 100°C por 1 hora, enquanto o tratamento similar da preparação de globulina de soja resultou na diminuição de sua solubilidade em torno de 70%. Esta plasteína apresentou peso molecular médio de 6.200 daltons e ponto isoelétrico na faixa de 1.5-4.0. Estudos utilizando dicroísmo circular indicaram a presença de algumas estruturas α -hélice com a formação da plasteína. Os autores sugerem que esta mudança conformacional possa estar relacionada ao teor de ácido glutâmico presente no produto.

Um método para preparar plasteína em larga escala foi proposto por ARAI et alii (1974). Eles sugerem uma mistura de 1 : 5 (Metionina-plasteína : proteína de soja) para se obter um teor de aminoácidos adequado segundo a FAO/WHO (1965), com respeito aos níveis de aminoácidos sulfurados.

A obtenção de um produto protéico contendo baixo teor de fenilalanina utilizando a reação de plasteína foi proposto por YAMASHITA et alii (1976_b). Este produto seria destinado às pessoas portadoras de fenilcetonúria. Foram utilizados como substrato o concentrado protéico de peixe (CCP) e isolado protéico de soja (IPS). O conteúdo de fenilalanina, tirosina e triptofano foram de 0,05, 7,82 e 2,98% na plasteína de CCP e de 0,23, 7,69 e 2,80% na plasteína de IPS. Estas plasteínas eram isentas de aminoácidos livres e apresentavam sabor e odor suaves.

FUJIMAKI (1978) demonstrou a aplicação da reação de plasteína para melhorar a qualidade nutricional de proteínas convencionais e não convencionais com ênfase especial à incorporação de aminoácidos essenciais (sob a forma etil éster) utilizando papaína como catalizador do sistema. As combinações utilizadas foram: L-metionina/ proteína de soja; L-lisina/ glúten de trigo e L-tirosina/ concentrado protéico de peixe (após remoção de fenilalanina). Entre as fontes não convencionais, foram estudados os extratos protéicos dos seguintes microrganismos fotossintéticos: *Spirulina maxima*, *Rhodospseudomonas capsulatus* e *Trifolium repens* L., através da incorporação simultânea de 3 aminoácidos: L-metionina, L-lisina e L-triptofano.

MONTI & JOST (1979) ao sintetizarem plasteína a partir de hidrolisado péptico de proteína de soja e etil éster de L-metionina marcada com ^{14}C como substrato e papaína como catalizador, verificou que a plasteína resultante continha 14,3% de metionina ligada covalentemente. Após oxidação e subsequente filtração em gel (Sephadex G-25), constatou-se que o comprimento médio da cadeia apresentava 6 resíduos de aminoácidos tanto no substrato quanto no produto final, não sendo evidenciado a formação de peptídios de alto peso molecular na reação de plasteína.

HAJÓS & HALÁSZ (1982) utilizaram metil éster de L-metionina para incorporar ao hidrolisado de caseína, considerando que a reação covalente aos peptídios formariam uma quantidade equivalente de metanol. Um aumento significativo, de aproximadamente 4 vezes, foi verificado no conteúdo de metionina da plasteína.

A avaliação nutricional de um isolado protéico de soja contendo metionina incorporada covalentemente através da síntese de plasteína, foi realizada por ARAI et alii (1983). Foram preparadas seis fórmulas diferentes contendo a papaína como catalizador. Os níveis de metionina variaram de 1 a 4% nestas fórmulas e de 0.1 a 0.4% nas dietas elaboradas. Esta avaliação foi realizada com ratos (wistar). Os resultados indicaram que a quantidade de alimento ingerido e o ganho de peso diário tenderam a aumentar com o aumento dos níveis de metionina da dieta. A maximização do valor do PER (2,97 ou 2,93) ocorreram com a suplementação na faixa de 2,5 a 3,0% de metionina, respectivamente. No final deste experimento, os ratos foram sacrificados ao acaso e procedida a pesagem do fígado, rins e baço. Os resultados

indicaram que não houve diferença significativa no aumento ou redução do peso dos órgãos quando comparados ao peso corpóreo. Nenhum diagnóstico anormal foi observado em todas as espécies de órgãos investigados. O grupo concluiu então, que este tipo de modificação enzimática poderia ser considerada como uma alternativa para melhorar a qualidade nutricional não somente do isolado protéico de soja como também de outras proteínas e produtos protéicos de baixa qualidade.

ASHLEY et alii (1983) verificaram a disponibilidade biológica de duas plasteínas enriquecidas com os aminoácidos L-triptofano e L-metionina. Em ambos os experimentos, os ratos foram alimentados com dietas contendo níveis graduais destes aminoácidos sob a forma livre ou ligados às plasteínas. Os resultados do primeiro experimento indicados pelo ganho de peso, quantidade da dieta ingerida e níveis plasmáticos de triptofano mostraram que o triptofano incorporado à plasteína foi utilizado na mesma extensão que o triptofano sob a forma livre. Em relação à metionina, os resultados obtidos foram equivalentes aos do triptofano. Estes resultados indicam que tanto o triptofano quanto a metionina ligados covalentemente à plasteína são biologicamente equivalentes a adição de aminoácidos livres para o crescimento de ratos. Assim, estas observações abrem a possibilidade para o uso da plasteína no melhoramento do valor nutricional de proteínas, principalmente as não convencionais. Em adição a plasteína pode ser usada no desenvolvimento de novas matérias primas para produtos dietéticos designados para uso terapêutico.

2.2.5. Considerações finais

A estrutura da plasteína se assemelha ao das proteínas denaturadas. Estudos de difração de raio X sobre as plasteínas revelaram a presença de polipeptídeos lineares com cadeias "close-packed". O fato que a estrutura inicial da proteína não é restaurada na formação da plasteína pode ser confirmado pela ausência da atividade enzimática nas plasteínas obtidas de hidrolisados de pepsina e tripsina; e também pela ausência de atividade hormonal nas plasteínas obtidas de insulina. Apesar das plasteínas diferirem das proteínas iniciais em sua estrutura secundária e terciária, elas se assemelham às proteínas em muitas propriedades físico-químicas. Elas são clivadas por várias enzimas proteolíticas, reagem com ninidrina, formam complexos com Cu^{++} e são precipitadas pelo TCA (BELIKOV & GOLOLOBOV, 1986).

As propriedades da plasteína dependem do grau de degradação do hidrolisado aplicado (LUDWIG et alii, 1986). A natureza dos substratos, o tipo de proteinases e as condições específicas da reação influem notadamente na composição de aminoácidos, e assim, nas propriedades funcionais e nutricionais dos peptídios da plasteína.

As enzimas utilizadas para a reação de formação de plasteína encontradas na literatura são, em sua maioria: pepsina, papaína, subtilisina'BPN e α -quimotripsina, sendo esta última estudada com maior frequência. Contudo, outros sistemas enzimáticos devem ser estudados a fim de se estabelecer parâmetros ótimos e diferentes propriedades físico-químicas na utilização em produtos alimentares alternativos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Matérias primas e sistema enzimático

As matéria primas utilizadas para a produção plasteína foram o isolado protéico de soja (IPS), Sanprosoy 90-NB fornecido pela SANBRA S/A e a caseína comercial fornecida pela HENRIFARMA S/A.

O sistema enzimático aplicado foi a pancreatina de pâncreas suíno de procedência Merk com atividade declarada de 350 FIP/Ug de protease.

3.1.2. Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau analítico (p.a.), de diversas procedências: Biorad, Chemco, Ecibra, Grupo Química, Merck, Nuclear, Pharmacia, Sigma, Synth, Vetec, etc.

3.1.3. Instrumental

Além de utensílios de uso comum em laboratório, como vidraria, espátulas, microespátulas, pinças, pincel, suportes, etc, foram utilizados os seguintes aparelhos:

- Agitador magnético Fanem, modelo 257
- Balança analítica Scientec, modelo SA 120
- Balança analítica Sauter, modelo 414/10
- Balança semi-analítica Sauter, modelo SD1000T
- Balança semi-analítica Marte, modelo A1000
- Banho-maria MLW, série UH
- Banho-maria tipo Dubnoff TE093
- Centrifuga Sorvall, modelo R5C5
- Chapa aquecedora Thermolyne
- Cromatógrafo Beckman, modelo 7300
- Digestor e destilador Kjeldahl, Tecnal

- Espectrofotômetro Incibrás, modelo DF200
- Espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70
- Estufa de secagem e esterilização Fanem, modelo 315SE
- Forno elétrico Fanem, modelo 413
- Gaiolas de crescimento em aço inox
- Homogeneizador Phoenix, modelo HS22
- Liofilizador Virtis, modelo 10-146MR-BA
- pH-metro digital Tecnal, modelo TEC-2
- pH-metro digital Metrohm Herisau, modelo E500
- Sistema eletroforético Ortec, modelo 4200
- Termostato Incotherm

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Composição centesimal aproximada das matérias primas

3.2.1.1. Proteína : determinada multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio pelos fatores de conversão 6,38 para caseína ; 5,71 para o IPS e 6,25 para a plasteína. O nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldhal (semi-micro), conforme procedimento da AOAC (1975), utilizando como catalizador o dióxido de titânio (WILLIAMS, 1975).

3.2.1.2. Umidade: determinada pelo método por secagem em estufa a 105°C até peso constante segundo procedimento da AOAC (1975).

3.2.1.3. Cinzas: determinada pelo método por incineração em mufla a 550-660°C até peso constante (A.O.A.C., 1975).

3.2.1.4. Lipídeos totais: determinado segundo BLIGH & DYER (1959).

3.2.1.5. Carboidratos: calculado por diferença.

3.2.2. Preparo dos hidrolisados enzimáticos de caseína e IPS

As suspensões aquosas de caseína e IPS (pH 7,5) foram aquecidas, separadamente, deixando arrefecer até 37 °C. A seguir, foi adicionado o sistema enzimático nas proporções indicadas na Tabela 2. As suspensões foram incubadas sob agitação (50 rpm) durante 6 horas à 37 °C. A concentração do substrato variou de 2,5 a 7,5%. Após o período de incubação, a dispersão resultante foi aquecida a 70 °C por 10 minutos (PUSKI, 1985) a fim de inativar o sistema enzimático, facilitar a separação da fração protéica não hidrolisada e promover uma pasteurização do produto (NETTO, 1992). Durante a hidrólise foi feito o acompanhamento da variação de pH.

Tabela 2. Condições da hidrólise enzimática para o preparo dos hidrolisados pancreáticos de IPS (HI) e caseína (HC).

| Experimento | Amostras | S (%) | Relação E / S |
|-------------|-------------|-------|---------------|
| I | HC1A / HI1A | 2,5 | 1 : 20 |
| | HC1B / HI1B | | 1 : 40 |
| | HC1C / HI1C | | 1 : 60 |
| II | HC2A / HI2A | 5,0 | 1 : 20 |
| | HC2B / HI2B | | 1 : 40 |
| | HC2C / HI2C | | 1 : 60 |
| III | HC3A / HI3A | 7,5 | 1 : 20 |
| | HC3B / HI3B | | 1 : 40 |
| | HC3C / HI3C | | 1 : 60 |

Os hidrolisados obtidos foram congelados e liofilizados. A reação de hidrólise foi monitorada pela determinação do grau de hidrólise (GH), segundo o método proposto por YAMASHITA et alli (1970), onde a proteína precipitada por solução de TCA a 10% foi centrifugada a 10000 rpm durante 15 minutos, na temperatura de 4 °C. O nitrogênio do sobrenadante foi determinado pelo método de Kjeldahl (A. O. A. C., 1975) segundo procedimento descrito no item 4.2.1.1. O grau de hidrólise é definido como a relação de nitrogênio solúvel pelo nitrogênio total, sendo expresso por:

$$GH (\%) = \frac{\text{Nitrogênio Solúvel em solução de TCA 10\%}}{\text{Nitrogênio total}} \times 100$$

3.2.3. Obtenção da plasteína

Os hidrolisados enzimáticos de caseína e IPS foram redissolvidos em solução aquosa, variando-se o pH em 3 valores conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Condições realizadas para obtenção de plasteínas a partir de hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína.

| Experimento | Amostras | pH | S (%) | Relação E / S |
|-------------|----------|-----|-------|---------------|
| I | P1 | 5,0 | 30 | 50 : 50 |
| | P2 | | | 75 : 25 |
| | P3 | | | 100 |
| | P4 | | 40 | 50 : 50 |
| | P5 | | | 75 : 25 |
| | P6 | | | 100 |
| II | P7 | 6,0 | 30 | 50 : 50 |
| | P8 | | | 75 : 25 |
| | P9 | | | 100 |
| | P10 | | 40 | 50 : 50 |
| | P11 | | | 75 : 25 |
| | P12 | | | 100 |
| III | P13 | 7,0 | 30 | 50 : 50 |
| | P14 | | | 75 : 25 |
| | P15 | | | 100 |
| | P16 | | 40 | 50 : 50 |
| | P17 | | | 75 : 25 |
| | P18 | | | 100 |

A proporção dos hidrolisados de IPS e caseína foram de 50/50, 75/25 e 100, respectivamente. A concentração de substrato variou entre 30 e 40%. A incubação procedeu-se sob repouso, a 37°C durante 24 horas (YAMASHITA et alli, 1970). A relação enzima/substrato foi a mesma da reação de hidrólise, após seleção deste considerando o maior grau de hidrólise obtido. Após este período de incubação as

plasteínas foram aquecidas (PUSKI, 1985). A seguir as amostras foram congeladas e liofilizadas.

A reação da plasteína foi monitorada pela determinação da produtividade (α) segundo o método proposto por ARAI et alli (1975), onde a proteína é precipitada por solução de TCA a 10% e posteriormente centrifugada nas condições descritas no item 3.2.2. A produtividade é definida como a relação de nitrogênio insolúvel em solução de TCA 10% pelo nitrogênio total, sendo expresso por:

$$\text{Produtividade (} \alpha \text{)} = \frac{\text{Nitrogênio insolúvel em solução de TCA 10\%}}{\text{Nitrogênio total}} \times 100$$

3.2.4. Determinação de aminoácidos

3.2.4.1. Hidrólise com HCl

Foram determinados os aminoácidos totais com exceção da metionina, cisteína e triptofano. As amostras foram submetidas a hidrólise com HCl 6N em ampolas de vidro (18 x 150mm), seladas a vácuo e mantida a 110 °C por 22 horas. Após este período de incubação, o ácido clorídrico foi evaporado em dessecador. O conteúdo foi então diluído e transferido quantitativamente para um balão de 5ml com tampão citrato de sódio 4M, pH 2,2 com 15% de polietilenoglicol 400.

3.2.4.2. Hidrólise após prévia oxidação com ácido perfórmico

Foram determinados os aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). Após oxidação prévia com ácido perfórmico, seguiu-se a hidrólise com HCl 6N. Metionina e cisteína foram detectados como metionina sulfona e ácido cistéico, respectivamente. O método proposto por MOORE (1963) consiste na utilização do ácido perfórmico, preparado com 1 ml de peróxido de hidrogênio a 30% em 9 ml de ácido fórmico a 88%, deixado a reagir por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida é colocado em banho de gelo para uso imediato. O material a ser oxidado foi colocado em ampolas de vidro (18 x 150mm), sob banho de gelo e adicionou-se 2 ml de ácido

perfórmico. As ampolas foram mantidas em banho de gelo durante 4 horas. Após este período, o excesso do reagente foi destruído pela adição de 300 µl de ácido bromídrico a 48%, também gelado. O conteúdo da ampola foi seco em dessecador e o resíduo foi submetido à hidrólise com HCl 6N, conforme descrito no item anterior.

3.2.4.3. Hidrólise com hidróxido de Lítio

Para determinação do triptofano, as amostras foram hidrolisadas com LiOH 4N, segundo o método proposto por LUCAS & SOTELO (1980). As amostras (500 mg de proteína) foram colocadas em ampolas de vidro (18 x 150mm) e adicionou-se 0,5 ml de LiOH 4N. As ampolas foram seladas à vácuo e mantidas a 100 °C por 24 horas. Após este período de incubação, o conteúdo da ampola foi neutralizado (pH 7 - 7,5) com ácido ortofosfórico a 85%. O conteúdo da ampola foi transferido quantitativamente para um balão e o volume completado para 5 ml.

3.2.4.4. Aminograma

A composição qualitativa e quantitativa de aminoácidos nas amostras foi realizado em cromatógrafo Beckman 7300, pelo método de SPACKMAN et alli (1958). Este analisador consiste de um sistema de duas colunas, uma curta (0,6 x 17cm) e uma longa (0,6 x 42cm), empacotadas com resina de troca iônica "Durrum DC". A detecção é feita em 570nm e 440nm, na escala de 0,0 até 0,1 de absorbância. O sistema foi calibrado com uma solução de aminoácidos padrão Pierce H, através do qual é determinado a constante em relação à concentração/altura do pico de absorção.

3.2.4.5. Quantificação dos aminoácidos livres

Foi utilizado uma alíquota do material sem hidrólise para quantificar os aminoácidos livres.

3.2.5. Determinação de peso molecular

3.2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

Foi determinado na matéria prima inicial (caseína e IPS), hidrolisados e plasteína a fim de monitorar as mudanças ocorridas nas proteínas intactas conforme a reação a que foi submetida. O método foi realizado segundo WEBER & OSBORN (1969), utilizando o sistema de placas verticais (9,5 x 9,0 cm). As proteínas padrões utilizadas foram: fosforilase b (PM: 94.000), albumina bovina (PM: 67.000), ovalbumina (PM: 43.000), anidrase carbônica (PM: 30.000), inibidor de tripsina (PM: 20.100) e α -lactoalbumina (PM: 14400), todas procedentes da Pharmacia. Os géis foram preparados pela mistura de 15 ml de uma solução tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), com 13,5 ml de solução de acrilamida-bisacrilamida (22,8% T). A essa mistura foram adicionados 45 μ l de N-N'-N'-tetratilenodiamina e 1,5 ml de persulfato de amônio na concentração de 10 mg/ml (GALEAZZI, 1978). As placas foram então preenchidas e a polimerização procedeu-se em 20 minutos.

As amostras foram preparadas previamente pela incubação por 2 horas a 37 °C, de tubos contendo 400 μ l das soluções de proteínas padrões e das amostras na concentração de 1 mg/ml, a qual foram acrescentados 100 μ l de solução contendo 0,4% de SDS e 0,4% de mercaptoetanol em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0. Após a incubação foram acrescentados 1,5 ml da solução contendo 5,0 ml de solução de azul de bromofenol a 0,05%, 200 gotas de glicerol, 1 ml de mercaptoetanol e 10 ml de tampão fosfato 0,01M, pH 7,0. As amostras foram aplicadas nos poços da placa em volume de 100 μ l. O tampão utilizado durante a corrida foi a solução de tampão fosfato 0,001M, pH 7,0, contendo 0,1% de SDS. A eletroforese foi realizada mantendo a amperagem de 20mA durante o tempo necessário. Após remoção, os géis foram corados em solução 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250 (p/v) em solução de metanol 40%(v/v) e de ácido acético 10% (v/v) durante 30 minutos. Em seguida foram feitas lavagens sucessivas com solução descorante contendo metanol 40% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) até visualização adequada das bandas. As bandas de proteínas foram fotografadas, determinando-se também a mobilidade relativa (MR) e o peso molecular das amostras. O gel foi estocado em solução de ácido acético a 10% (v/v).

3.2.5.1. Cromatografia de exclusão molecular em gel Bio-rad P-60

Foi determinado nos hidrolisados e plasteínas, segundo o método proposto por ANDREWS (1965). O gel Bio-rad P-60 foi equilibrado em solução de ácido acético a 5%, pH 2,5, contendo 1M de NaCl e 0,02% de azida sódica .

A cromatografia foi desenvolvida em coluna de 2,0 x 50,0 cm, a uma velocidade de fluxo de 36 ml/hora, à temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 3 ml, sendo as proteínas localizadas pela leitura da absorbância, no comprimento de onda de 280 nm, em cubetas de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70. A coluna foi calibrada pela eluição de substâncias de peso molecular conhecido. Foram utilizados: ovalbumina (PM: 45.000, Sigma), anidrase carbônica (PM: 29.000, Sigma), α -lactoalbumina (PM: 14.200, Sigma) e triptofano (PM: 204,22 , Synth). O volume de exclusão (V_o) foi determinado usando Blue Dextran (PM: 2.000.000, Sigma). Amostras de 50 mg foram dissolvidas no eluente e cromatografadas nas condições descritas.

3.2.6. Avaliação Nutricional

3.2.6.1. Digestibilidade *in vitro*

Foi realizada nas amostras de IPS, caseína, hidrolisados e plasteína, segundo o método de AKESON & STAHMANN (1964), modificado por GALEAZZI (1981). O hidrolisado é separado da fração não digerida por precipitação pela adição de ácido tricloroacético (TCA) e posterior centrifugação. O mesmo processo foi utilizado para obtenção do branco de enzimas (pepsina e pancreatina) e do branco da amostra. A digestibilidade é definida pela quantidade de nitrogênio solúvel na amostra, sendo expressa através da fórmula:

$$D (\%) = \frac{N_h - (N_e + N_b)}{N_a} \times 100$$

onde: N_h = nitrogênio do hidrolisado
 N_e = nitrogênio do branco de enzimas
 N_b = nitrogênio do branco da amostra
 N_a = nitrogênio da amostra

3.2.6.2. Escore químico (EQ)

Calculado a partir do resultado do aminograma, utilizando padrão de referência da FAO/WHO/UNU (1985), segundo PELLET & YOUNG (1980). O escore químico para a proteína de um alimento se define como:

$$EQ (\%) = \frac{\text{mg de aminoácido / g de proteína teste}}{\text{mg de aminoácido / g de proteína padrão}} \times 100$$

3.2.7. Atividade do inibidor de tripsina

Realizado no IPS e seus hidrolisados e na plasteína, segundo o método de KAKADE et alii (1969), utilizando BAPA (benzoyl-DL-arginina-p-nitro-anilida) como substrato.

3.2.8. Avaliação imunológica

3.2.8.1. Obtenção do antisoro

Foram utilizados quatro coelhos por amostra (antígeno). Os animais receberam semanalmente, por via subcutânea, 0,5 ml de uma preparação antigênica composta de solução salina e antígeno (2,5 mg/ml de solução fisiológica). A sangria foi realizada após três semanas, através de punção venosa na orelha. O soro obtido foi então mantido congelado à -20°C , adicionando-se uma gota do agente bacteriostático azida sódica a 0,02%, até sua utilização.

3.2.8.2. Anafilaxia cutânea passiva (PCA)

Realizado na matéria prima (IPS e caseína) e seus respectivos hidrolisados e na plasteína, segundo OVARY (1958). O teste foi conduzido em cobaias adultos (250 - 350g), machos, de pele e pelos claros. O teste foi realizado na região dorsal após ter sido depilada 24 horas antes da prova. A técnica consiste em injetar por via intradérmica 0,1 cm³ do antisoro (não diluído e nas diluições de 1/5; 1/25; 1/125; 1/625 e 1/3125) em vários pontos da pele (com intervalos mínimos de 3cm). Ao mesmo tempo, foram realizados testes com as soluções de controles negativo

e positivo . Durante este procedimento os animais foram anestesiados com solução de pentobarbital sódico a 0,3% considerando a dose de 0,1 ml/100 g de peso do animal. Os animais ficaram em repouso durante 3 horas, para fixação dos anticorpos nos tecidos. Após este período, foi injetado por via intravenosa, 0,5 cm³ da solução do antígeno (1mg) em mistura com 0,5 cm³ de solução corante azul de Evans a 2% em NaCl 0,85%. Após 30 minutos, o animal foi sacrificado e procedeu-se a descola da região de prova medindo o diâmetro das manchas do corante no lado interno da pele.

As reações foram classificadas do seguinte modo:

| | |
|--------|-------------------------------------|
| (-) | manchas com diâmetro inferior a 5mm |
| (+) | " " " " entre 5 e 10mm |
| (++) | " " " " 10 e 15mm |
| (+++) | " " " " 15 e 20mm |
| (++++) | " " " " acima de 20mm |

Para exprimir os resultados em unidades PCA, dividi-se a recíproca da mais alta diluição do soro que deu reação positiva, em milímetros, pelo volume do antisoro injetado.

3.2.9. Análise estatística

As médias dos resultados obtidos foram submetidas a análise de variância e, quando diferentes pelo teste F, analisados segundo DUNCAN (1955) ao nível de 95% de confiabilidade. Para curvas padrão utilizou-se o coeficiente de correlação obtido por regressão linear.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição centesimal aproximada

A composição centesimal aproximada do IPS e caseína são apresentados na tabela 4. Observa-se que o resultado obtido para o teor de umidade (%) do IPS (8,94) é superior aos teores de 6,9 e 5,3 % obtidos por SMITH & CIRCLE (1972) e TORÚN (1979); respectivamente. Quanto à caseína, o teor de umidade (%) de 5,69 é inferior ao valor de 7,67 obtido por FREITAS (1991).

Tabela 4. Composição centesimal aproximada das matérias primas.

Todos os resultados são apresentados como p/p % e representam a média \pm SD de três determinações.

| Componentes | IPS | Caseína |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Umidade | 8,94 \pm 0,19 | 5,69 \pm 0,34 |
| Cinzas | 4,02 \pm 0,28 | 2,94 \pm 0,14 |
| Proteínas | 83,89 \pm 0,29 ^a | 90,09 \pm 0,09 ^b |
| Lipídeos | 0,72 \pm 0,03 | 0,61 \pm 0,04 |
| Carboidratos ^c | 2,43 | 0,72 |

^a (N x 5,71)

^b (N x 6,38)

^c Calculado por diferença

O teor de cinzas (%) do IPS relatado na literatura é diverso variando de 2,5 (SMITH & CIRCLE, 1972) à 4,5 (WAGGLE, 1979). O valor de cinzas obtido para o IPS foi de 4,02% e está próximo do teor reportado por WAGGLE (1979). O teor de cinzas da caseína (2,94%) é concordante ao obtido por FREITAS (1991), de 2,57%.

O teor de lipídeos do IPS (0,72%) se aproxima do valor obtido por WAGGLE (1979), de 0,5% e é inferior ao teor reportado por TORÚN (1979), de 1,1%. A caseína também apresenta baixo teor de lipídeos, sendo encontrados em percentuais inferiores a 1,0%, como é o caso desta matéria prima que apresentou 0,61% de lipídeos.

A definição de proteínas do ponto de vista da nutrição e ciência dos alimentos está baseada nos procedimentos analíticos para sua determinação. A determinação do Nitrogênio total pelo método de Kjeldahl é amplamente utilizado e a proteína é então determinada como o teor de nitrogênio multiplicado por um fator de conversão. O fator de conversão padrão para o Nitrogênio determinado pelo método de Kjeldahl é 6,25. Entretanto para a caseína e produtos derivados tem sido adotado o fator 6,38. Os produtos a base de soja apresentam um problema particular, pois o fator de conversão 6,25 ainda tem sido amplamente utilizado, embora tenha-se o conhecimento que este fator é elevado (SMITH & CIRCLE, 1978). Jones (1931) e Morr (1982) citados por ADLER-NISSEN (1986), propuseram o fator 5,71 para os produtos à base de soja, considerando os teores de nitrogênio presentes nesta fonte protéica.

Entretanto, os resultados divulgados em nossa literatura ainda se apresentam utilizando o fator 6,25 para as fontes protéicas em geral, inclusive para o IPS e a caseína. Assim, se fez necessário converter os valores obtidos na Tabela 4 para valores considerando o fator 6,25 a fim de compará-los aos dados reportados na literatura.

O teor de proteínas ($N \times 6,25$) do IPS e da caseína foram convertidos então a 91,82 e 88,20%, respectivamente. Estes valores, em relação ao IPS, são concordantes aos obtidos por SMITH & CIRCLE (1972), WAGGLE (1979), NETTO (1992), superior ao teor protéico obtido por TORÚN (1979), e inferior ao relatado por O'DELL (1979).

Quanto à caseína, o valor obtido (88,20%) é concordante ao obtido por FREITAS (1991), de 85,0% e superior ao obtido por TOGASHI (1993), de 82,59%.

4.2. Hidrólise enzimática do IPS e caseína com pancreatina.

A utilização da pancreatina como sistema enzimático na hidrólise do IPS e caseína justifica-se pelo fato das enzimas pancreáticas seguirem o modelo de digestão fisiológica intestinal das proteínas. Além disso, a pancreatina apresenta atividade ótima

na faixa de pH 6-8, o que permite realizar a hidrólise sem acréscimos de grandes concentrações de sais, evitando problemas com a osmolaridade do produto final.

A pancreatina é constituída por pares de endo/exopeptidases: tripsina/carboxipeptidase-B e quimotripsina/carboxipeptidase-A. A quimotripsina e a carboxipeptidase-A liberam os aminoácidos tirosina, fenilalanina, metionina, leucina e histidina, sendo que a primeira ainda libera a asparagina. A tripsina e a carboxipeptidase B liberam a lisina e arginina (LENINGHER, 1991).

Em adição, a pancreatina é um sistema enzimático de baixo custo quando comparado às enzimas purificadas e de alta especificidade, e que são em sua maioria importadas de outros países. Deve-se considerar a possibilidade da aquisição desta enzima pela indústria nacional, como por exemplo a Biobrás que a produz como subproduto do processamento do pâncreas para a obtenção de insulina (FREITAS, 1991).

O IPS utilizado como substrato apresenta alta disponibilidade no mercado nacional e utilização comprovada na nutrição humana, inclusive na alimentação infantil, o qual seu consumo é crescente. Reconhecendo ser a caseína proteína padrão para estudos nutricionais por apresentar sua composição em aminoácidos adequada (FAO, 1970), resolvemos proceder a obtenção da plasteína a partir da composição de hidrolisados de IPS e caseína em diferentes proporções visando otimizar este processo no que se refere ao valor nutricional, custo e propriedades imunogênicas do produto.

4.2.1. Grau de hidrólise.

A obtenção dos hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína, conforme descrito no item 3.2.2., foram monitorados através do grau de hidrólise com o objetivo de otimizar este processo, considerando ser esta, uma medida da extensão da degradação hidrolítica.

O grau de hidrólise ou índice de solubilidade em ácido tricloroacético (TCA) foi utilizado para a caracterização da distribuição do peso molecular dos

hidrolisados, haja visto que o TCA precipita as moléculas protéicas e grandes peptídios. Outros métodos tem sido utilizados, como o que avalia o número de ligações peptídicas clivadas pela reação com o ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), proposto por ADLER-NISSEN (1979).

Entretanto, optou-se por utilizar o índice de solubilidade em TCA considerando o elevado grau de correlação ($r = 0,9982$) obtido por NETTO (1992) ao compará-lo com o método proposto por ADLER-NISSEN (1979) assim como a utilização de reagentes mais baratos, visando reduzir o custo final do produto a nível de controle de qualidade. Além disso, este índice é amplamente utilizado para determinar a produtividade da plasteína (insolubilidade em TCA), o que permite não só a comparação de resultados aos reportados na literatura como também avaliar o efeito da síntese de plasteína na solubilidade em TCA inicial dos hidrolisados, aplicando assim um mesmo método de comparação.

Foram preparados nove diferentes hidrolisados de cada matéria prima (IPS e caseína), variando-se a concentração de substrato (S) e a relação enzima/substrato (E/S). As condições de hidrólise e o grau de hidrólise obtidos são apresentados na Tabela 5. A hidrólise pancreática procedeu-se sob agitação constante, a 37°C durante 6 horas.

Dentre os hidrolisados produzidos os que apresentaram melhores rendimentos foram os hidrolisados HC2A e HI2A, os quais resultaram em grau de hidrólise de 75,48 e 69,70%, respectivamente. As condições experimentais a que estes hidrolisados foram submetidos incluem a concentração de substrato de 5,0% e relação enzima/substrato de 1/20 em ambos os casos.

Estes resultados se encontram representados nas Figuras 3 e 4, as quais demonstram o grau de hidrólise obtido nos hidrolisados pancreáticos de caseína (HC) e de IPS (HI) e na Figura 5 que demonstra estes resultados de forma comparativa.

Os valores de grau de hidrólise obtidos para os hidrolisados de IPS foram superiores aos reportados por NETTO (1992), embora as hidrólises tenham sido realizadas em condições diferentes porém aproximadas. A autora obteve 47,6% de

hidrólise quando a concentração de substrato era de 3,5% e a relação E/S de 1/18; e de 32,9% de hidrólise para 5,5% de substrato e relação E/S de 1/35.

Tabela 5. Grau de hidrólise dos hidrolisados pancreáticos de caseína (HC) e IPS (HI) sob condições variáveis de concentração de substrato (S) e relação enzima/substrato (E/S).

| Hidrolisados | S (%) | Relação E/S | GH (%) |
|--------------|-------|-------------|---------------------------|
| HC1A | 2,5 | 1/ 20 | 67,51 ± 0,27 ^a |
| HC1B | | 1/ 40 | 65,30 ± 0,18 ^a |
| HC1C | | 1/ 60 | 60,45 ± 0,05 ^b |
| HC2A | 5,0 | 1/ 20 | 75,48 ± 0,45 ^c |
| HC2B | | 1/ 40 | 68,74 ± 0,59 ^a |
| HC2C | | 1/ 60 | 67,78 ± 0,18 ^a |
| HC3A | 7,5 | 1/ 20 | 65,90 ± 0,42 ^a |
| HC3B | | 1/ 40 | 56,30 ± 0,31 ^d |
| HC3C | | 1/ 60 | 42,36 ± 0,22 ^e |
| HI1A | 2,5 | 1/ 20 | 60,71 ± 0,17 ^b |
| HI1B | | 1/ 40 | 48,00 ± 0,02 ^f |
| HI1C | | 1/ 60 | 32,00 ± 0,15 ^g |
| HI2A | 5,0 | 1/ 20 | 69,70 ± 0,37 ^a |
| HI2B | | 1/ 40 | 52,95 ± 0,46 ^d |
| HI2C | | 1/ 60 | 35,22 ± 0,39 ^g |
| HI3A | 7,5 | 1/ 20 | 60,80 ± 0,09 ^b |
| HI3B | | 1/ 40 | 42,06 ± 0,13 ^e |
| HI3C | | 1/ 60 | 29,29 ± 0,56 ^h |

Estes resultados representam a média ± DP de três determinações. Valores assinalados com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

O aumento de grau de hidrólise obtido neste experimento ocorreu provavelmente devido a modificações realizadas quando comparados ao experimento realizado por NETTO (1992). Dentre as modificações descrevemos a manutenção do pH do meio de reação em 7,5. Além disso, este valor de pH (7,5) se aproxima do pH ótimo da enzima que é de 8,0.

Figura 3. Grau de Hidrólise (GH) do Hidrolisado Pancreático de Caseína

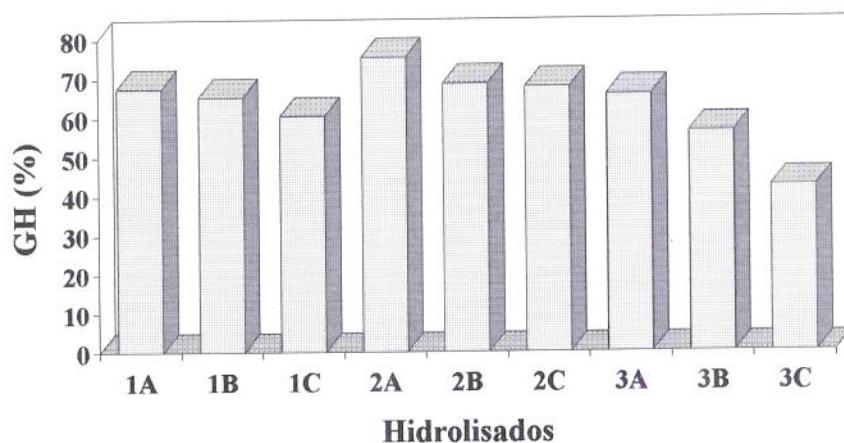
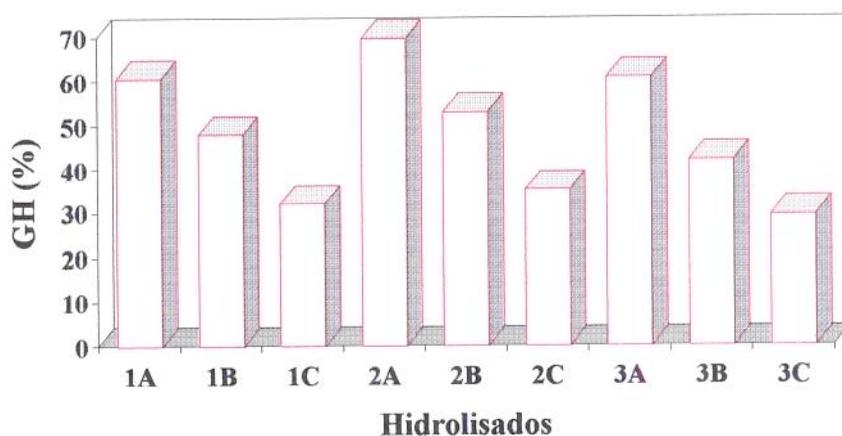
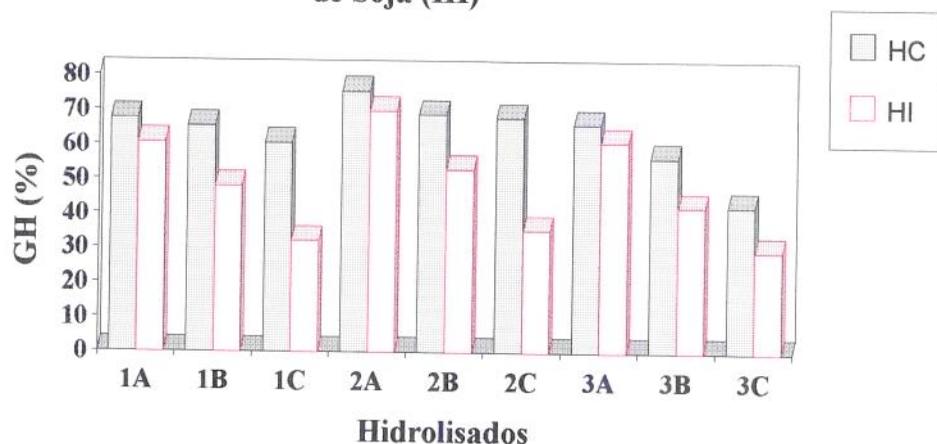


Figura 4. Grau de Hidrólise (GH) do Hidrolisado Pancreático de IPS



O hidrolisado de caseína (IV) produzido por FREITAS (1991) apresentou 20% de peptídios de alto peso molecular (10-20 resíduos), 62% de peptídios de baixo peso molecular (2-9 resíduos) e 18% de aminoácidos livres conforme determinação em cromatografia de exclusão e reação com o TNBS.

Figura 5. Comparação entre o Grau de Hidrólise (GH) dos Hidrolisados pancreáticos de Caseína (HC) e Isolado Protéico de Soja (HI)



As plasteínas que apresentaram maior produtividade foram as P16 e P17 que apresentaram 64,50 e 65,30% de rendimento, respectivamente. Estas plasteínas foram obtidas com 40% de substrato, pH do meio de reação 7,0 e relação HI/HC de 50/50 e 75/25, respectivamente. A partir deste momento faremos referência de PL50 e PL75 às plasteínas P16 e P17, considerando a relação IPS/caseína utilizada para obtenção da plasteína.

O efeito da concentração de substrato foi homogêneo quanto aos resultados obtidos. Verificou-se que a produtividade foi sempre mais elevada quando a concentração de substrato era de 40%, quando as outras variáveis da reação eram mantidas constantes. Este resultado é concordante aos reportados por TSAI et alii (1972) e SCHMANDKE (1976), cujo rendimento máximo ocorreu quando a concentração de substrato representava de 30 a 40% do sistema de reação. Nos dois casos, foram utilizados como substrato hidrolisados de proteínas de soja, conforme método proposto por FUJIMAKI (1970).

O efeito da concentração de substrato foi uniforme em relação aos hidrolisados de caseína e IPS. Verificou-se que o aumento da concentração de 2,5 para 5,0% aumentou o grau de hidrólise em todos os hidrolisados submetidos às mesmas condições de relação enzima/substrato. Entretanto, quando a concentração de substrato foi elevada para 7,5%, constatou-se uma diminuição do grau de hidrólise, quando

submetidos às mesmas condições descritas anteriormente. Este efeito ocorre provavelmente, devido a inibição dos produtos de hidrólise na ação enzimática.

O efeito da concentração da enzima também apresentou resultados uniformes para as diferentes concentrações de substratos utilizadas. De acordo com a Tabela 5, podemos verificar que os maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos quando a relação E/S era de 1/20. Entretanto, a diminuição da concentração da enzima não reduziu de maneira proporcional o grau de hidrólise, sendo que nos hidrolisados de caseína HC1A , HC1B, HC2B e HC2B não houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando a concentração de substrato foi de 2,5% e as relações E/S de 1/20 e 1/40 nos dois primeiros e de 5,0% de substrato e relação E/S de 1/40 e 1/60 nos dois últimos hidrolisados.

4.3. Obtenção da plasteína.

A obtenção das plasteínas a partir dos hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína, conforme descrito no item 3.2.3., foram monitorados através da produtividade (α) com o mesmo objetivo da hidrólise, ou seja otimizar o processo. Foram preparados dezoito diferentes plasteínas variando-se a concentração do substrato, relação IPS/caseína e pH do meio de reação. A reação procedeu-se a 37°C, sob repouso, durante 24 horas. A relação enzima substrato foi a mesma da obtida durante a hidrólise (1/20). As condições de obtenção das plasteínas e a produtividade obtida estão representados na Tabela 6.

O efeito do pH do meio de reação na produtividade da plsteína apresentou também comportamento uniforme. Quando a plasteína desenvolveu-se sob pH 7,0, a produtividade foi maior que em pH 5,0 e 6,0, quando submetidos às mesmas condições. É interessante observar que este valor de pH é bem próximo ao da hidrólise (7,5), não sendo assim necessário recorrermos às técnicas de desassilinação.

Tabela 6. Produtividade das plasteínas obtidas sob diferentes condições.

| Plasteínas | S (%) | pH | Relação IPS/Caseína | α (%) |
|------------|-------|----|---------------------|--------------------|
| P1 | | | 50 /50 | 50,56 ^a |
| P2 | 30 | | 75 /25 | 43,99 ^b |
| P3 | | 5 | 100 | 42,96 ^b |
| P4 | | | 50 /50 | 58,61 ^c |
| P5 | 40 | | 75 /25 | 47,26 ^d |
| P6 | | | 100 | 46,26 ^d |
| P7 | | | 50 /50 | 55,56 ^e |
| P8 | 30 | | 75 /25 | 47,43 ^d |
| P9 | | 6 | 100 | 43,02 ^b |
| P10 | | | 50 /50 | 59,15 ^c |
| P11 | 40 | | 75 /25 | 51,03 ^a |
| P12 | | | 100 | 48,23 ^a |
| P13 | | | 50 /50 | 56,28 ^e |
| P14 | 30 | | 75 /25 | 50,10 ^a |
| P15 | | 7 | 100 | 41,27 ^b |
| P16 | | | 50 /50 | 64,50 ^f |
| P17 | 40 | | 75 /25 | 65,30 ^f |
| P18 | | | 100 | 52,38 ^a |

Os resultados representam a média \pm DP de três determinações. Em uma mesma coluna, valores com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A Tabela 7 apresenta os valores de pH ótimo para hidrólise e síntese de plasteína a partir de um hidrolisado de proteínas de soja utilizando a mesma proteinase em ambas as reações. Ao comparar com os nossos resultados, podemos verificar que a pancreatina utilizada como sistema enzimático da reação apresentou características de pH semelhantes à enzima microbiana subtilisina BPN e próxima da faixa de pH de suas enzimas constituintes (tripsina e α -quimotripsina).

Tabela 7. Valores de pH ótimo para hidrólise e síntese de plasteína de um hidrolisado de proteínas de soja utilizando as mesmas proteinases (WATANABE & ARAI, 1988).

| Enzima | Fonte | pH de Hidrólise | pH de síntese de plasteína |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|
| Aspártico proteinases | | | |
| Pepsina | suína | 1.6 | 4.5 |
| Molsina | <i>Aspergillus saitoi</i> | 2.8 | 5.5 |
| Rapidase | <i>Trametes sanguinea</i> | 3.0 | 4.0 |
| Serino proteinases | | | |
| α -quimitripsina | bovina | 7.8 | 5.0 - 6.0 |
| Tripsina | bovina | 8.0 | 5.5 - 6.5 |
| Subtilisina BPN | <i>Bacillus subtilis</i> | 7.5 - 8.5 | 6.0 - 7.0 |
| Pronase | <i>Streptomyces griseus</i> | 8.0 - 9.0 | 6.0 |
| Biopraxe | <i>Bacillus subtilis</i> | 10.0 - 11.0 | 6.0 |
| Coronase | <i>Rhizopus</i> | 7.0 | 4.0 - 5.0 |
| Prozyme | <i>Streptomyces</i> | 8.0 - 9.0 | 5.5 - 6.5 |
| Esperase | <i>Bacillus subtilis</i> | 9.0 - 10.0 | 6.5 |
| Cisteína proteinases | | | |
| Papaína | <i>Papaya carica</i> | 5.0 - 6.0 | 5.0 - 6.0 |
| Bromelina | <i>Ananas sativus</i> | 5.0 - 6.0 | 5.0 - 6.0 |
| Ficsina | <i>Ficus carica</i> | 5.0 - 6.0 | 5.0 - 6.0 |

Podemos verificar que todas as plasteínas obtidas a partir 100% de hidrolisado de IPS apresentaram rendimentos inferiores àquelas obtidas a partir da mistura dos hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína. Observou-se ainda que, com exceção da P16 e da P17, a produtividade das plasteínas foi maior quando a relação IPS/caseína era de 50/50. Estes resultados indicam que a mistura entre os substratos da reação favorecem à síntese de plasteína, quando comparado ao hidrolisado de IPS isoladamente.

4.4. Composição em aminoácidos.

As tabelas 8 e 9 mostram os resultados da composição em aminoácidos totais (AAT), livres (AAL) e essenciais (AAE) dos hidrolisados de caseína (HC2A) e IPS (HI2A) e das plasteínas PL50 e PL75.

Tabela 8. Composição em Aminoácidos Totais (AAT) dos Hidrolisados de Caseína (HC) e IPS (HI) e das Plasteínas PL50 e PL75, em g/16g N*.

| Aminoácidos (g/16gN) | HC | HI | PL50 | PL75 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| VAL | 6,68 | 4,98 | 5,06 | 5,03 |
| ILE | 5,65 | 4,83 | 3,89 | 4,98 |
| LEU | 7,88 | 7,74 | 7,5 | 7,83 |
| THR | 4,57 | 3,49 | 3,53 | 3,48 |
| CYS (1/2) | 0,63 | 0,89 | 0,69 | 0,60 |
| MET | 2,72 | 1,14 | 2,17 | 1,58 |
| Sulf. Totais | 3,35 | 2,03 | 2,86 | 2,18 |
| TYR | 4,87 | 3,58 | 4,98 | 4,05 |
| PHE | 4,89 | 5,08 | 5,06 | 4,97 |
| Arom. Totais | 9,76 | 8,66 | 10,04 | 9,02 |
| HIS | 3,08 | 2,24 | 2,28 | 2,18 |
| LYS | 6,98 | 6,63 | 6,82 | 6,58 |
| TRP | 1,28 | 1,35 | 1,30 | 1,34 |
| ASP | 6,68 | 12,27 | 8,29 | 8,63 |
| SER | 5,65 | 5,06 | 5,72 | 4,99 |
| GLU | 19,87 | 22,87 | 21,77 | 21,79 |
| PRO | 21,02 | 5,67 | 15,68 | 11,68 |
| GLY | 2,96 | 3,86 | 4,07 | 3,97 |
| ALA | 3,04 | 4,32 | 4,28 | 4,28 |
| ARG | 3,27 | 6,98 | 5,77 | 6,33 |
| AAT | 111,72 | 102,98 | 108,86 | 104,29 |
| AAE ¹ | 43,73 | 37,43 | 37,61 | 37,95 |
| AAL ² | 6,19 | 16,48 | 12,2 | 12,29 |
| (AAE/AAT) x 100 | 39,14 | 37,43 | 34,53 | 36,4 |
| (AAL/AAT) x 100 | 5,54 | 16,00 | 11,21 | 11,78 |

* Valores médios de análise em duplicata.

1. Aminoácidos essenciais

2. Aminoácidos livres

Destacamos que os aminoácidos essenciais Lys, Leu, Met, Phe e Trp, foram liberados em maior grau em relação aos não essenciais. Do total de aminoácidos livres, os aminoácidos essenciais contribuem com 64,62% no hidrolisado de caseína (HC); 60,13% no hidrolisado de IPS (HI); 60,57% na plasteína PL50 e 57,85% na plasteína PL75. Dentre os aminoácidos não essenciais destacam-se a Arg e a Tyr. A prolina, na forma livre, não foi detectada nos hidrolisados e nas plasteínas. Esta distribuição está de acordo com a atividade dos pares de endo-exopeptidases presentes na pancreatina, que liberam seletivamente os aminoácidos aromáticos e alguns hidrofóbicos.

Tabela 9. Composição em aminoácidos livres (AAL) dos hidrolisados de caseína (HC) e de IPS (HI) e das plasteínas PL50 e PL75 e os respectivos percentuais em relação aos aminoácidos totais.

| AA (g/16g N) | HC | | HI | | PL50 | | PL75 | |
|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | AAL | % | AAL | % | AAL | % | AAL | % |
| VAL | 0.21 | 3.09 | 0.95 | 19.10 | 0.89 | 17.65 | 0.66 | 13.21 |
| ILE | 0.26 | 4.67 | 0.93 | 19.30 | 1.14 | 29.36 | 0.76 | 15.22 |
| LEU | 0.63 | 8.04 | 1.90 | 24.51 | 0.45 | 6.03 | 0.92 | 11.75 |
| THR | 0.12 | 2.64 | 0.28 | 8.01 | 0.24 | 6.85 | 0.24 | 6.82 |
| CYS (1/2) | nd* | - | nd | - | 0.09 | 13.49 | 0.09 | 14.78 |
| MET | 0.19 | 7.11 | 0.32 | 27.86 | 0.34 | 15.72 | 0.36 | 22.72 |
| TYR | 0.61 | 12.58 | 1.73 | 48.32 | 1.39 | 27.97 | 1.20 | 29.73 |
| PHE | 0.59 | 12.01 | 2.31 | 45.53 | 1.78 | 35.21 | 1.78 | 35.73 |
| HIS | 0.05 | 1.53 | 0.13 | 5.74 | 0.17 | 7.57 | 0.10 | 4.69 |
| LYS | 0.71 | 10.16 | 2.13 | 32.07 | 1.72 | 25.21 | 1.64 | 25.00 |
| TRP | 1.24 | 96.73 | 0.96 | 71.04 | 0.66 | 50.45 | 0.65 | 48.37 |
| ASP | 0.11 | 1.63 | 0.24 | 1.98 | 0.16 | 1.97 | 0.11 | 1.32 |
| SER | 0.22 | 3.83 | 0.84 | 16.60 | 0.61 | 10.69 | 0.42 | 8.52 |
| GLU | 0.27 | 1.35 | 0.52 | 2.28 | 0.44 | 2.04 | 0.46 | 2.11 |
| PRO | nd | - | nd | - | nd | - | nd | - |
| GLY | 0.10 | 3.51 | 0.16 | 4.05 | 0.09 | 2.30 | 0.08 | 2.00 |
| ALA | 0.11 | 3.90 | 0.11 | 2.49 | 0.37 | 8.71 | 0.29 | 6.73 |
| ARG | 0.77 | 23.58 | 2.97 | 45.56 | 1.66 | 28.82 | 2.53 | 39.93 |
| TOTAL | 6.19 | 5.54 | 16.48 | 16.00 | 12.20 | 11.21 | 12.29 | 11.78 |

a. Valores médios de análise em duplicata.

* não detectado

Os aminoácidos essenciais, juntamente com os não essenciais Tyr e Arg, foram liberados ao nível de 10,0 a 96,73% no hidrolisado de caseína e de 16,6 a 71,04% no hidrolisado de IPS. O hidrolisado de IPS forneceu maior percentual de aminoácidos livres quando comparado ao de caseína, com exceção do triptofano. O aminoácido cisteína não foi detectado sob a forma livre nos hidrolisados de IPS e caseína, mas aparece em percentuais de 13,49 e 14,78% nas plasteínas PL50 e PL75, respectivamente. Este resultado sugere que pode estar ocorrendo reações de troca thiol-dissulfeto a nível intra e/ou intermolecular com os resíduos de cisteína.

Além da cisteína, os aminoácidos isoleucina e alanina também tiveram o percentual de aminoácidos livres aumentado durante a síntese de plasteína. Em contrapartida, o percentual dos aminoácidos livres metionina, tirosina, fenilalanina, triptofano e arginina foram sensivelmente diminuídos após a síntese da plasteína PL50 e PL75, com exceção da arginina na PL75 que apresentou menor percentual de aminoácido livre quando comparado ao hidrolisado de IPS. Estes resultados sustentam a proposição acima indicando que houve tanto liberação quanto ligação de aminoácidos durante a reação de plasteína.

Figura 6. Distribuição Percentual dos Aminoácidos Essenciais Totais (AAT) e Livres (AAL) no Hidrolisado de Caseína

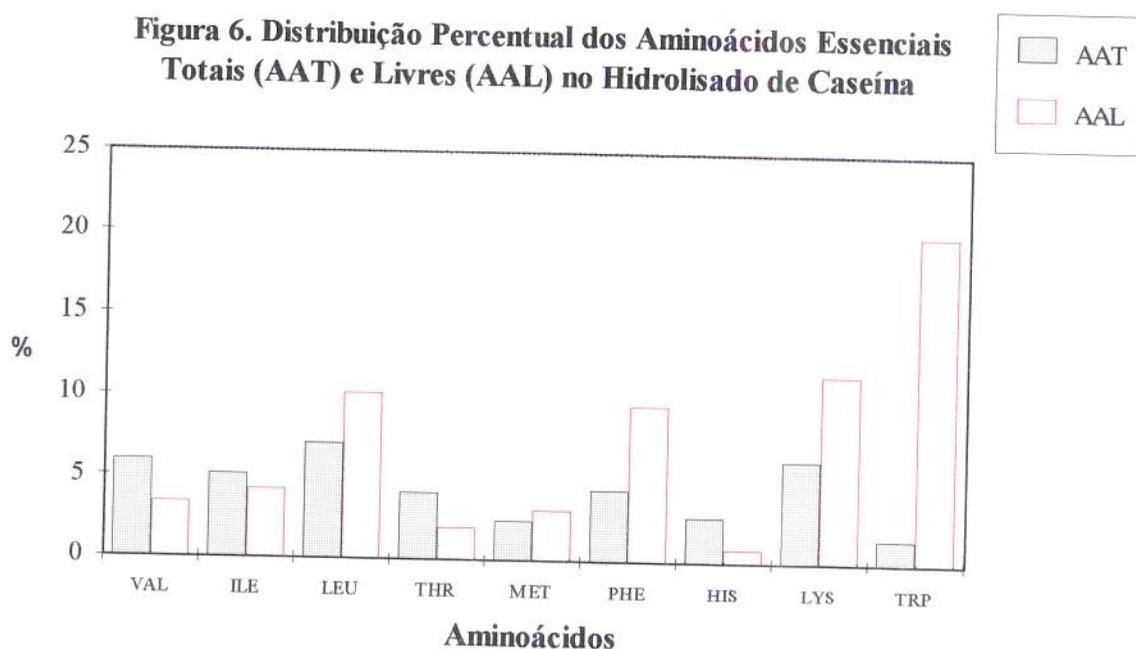


Figura 7. Distribuição Percentual dos Aminoácidos Essenciais Totais (AAT) e Livres (AAL) no Hidrolisado de IPS

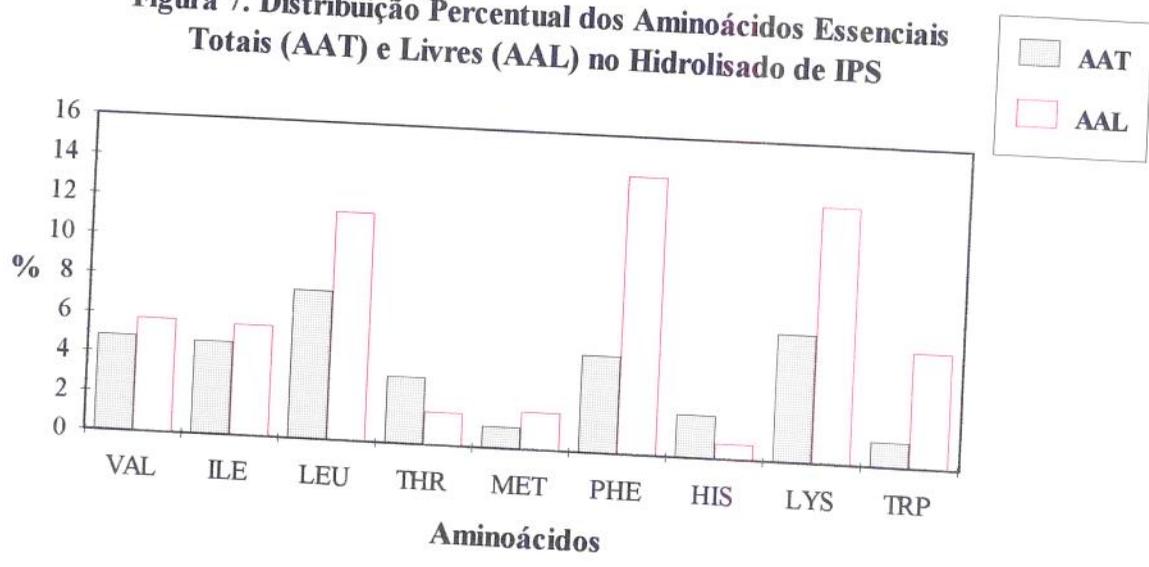


Figura 8. Distribuição Percentual dos Aminoácidos Essenciais Totais (AAT) e Livres (AAL) na Plasteína PL 50

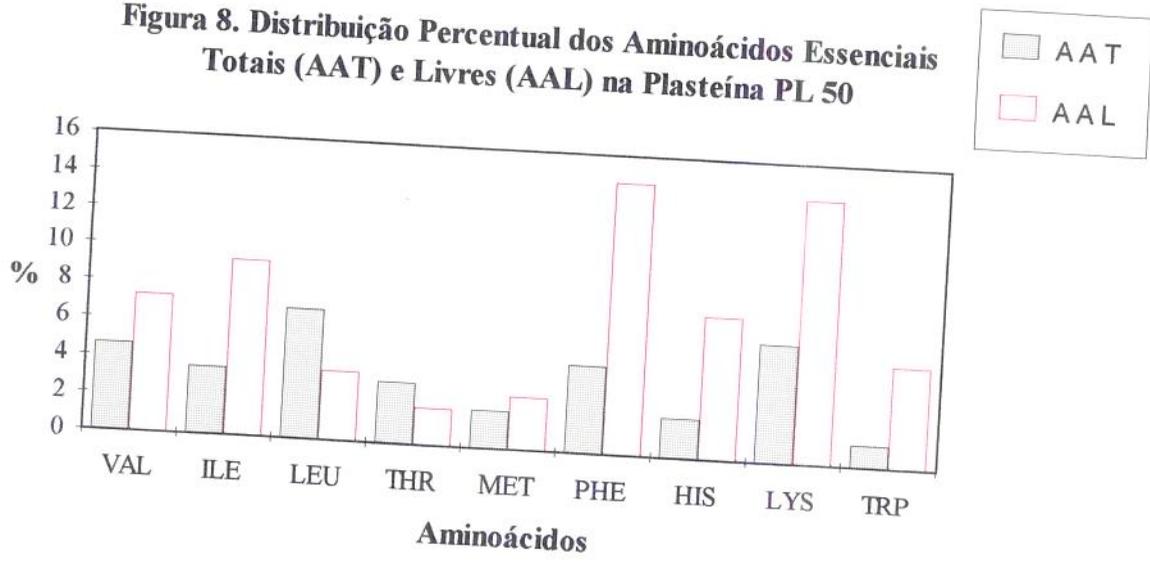
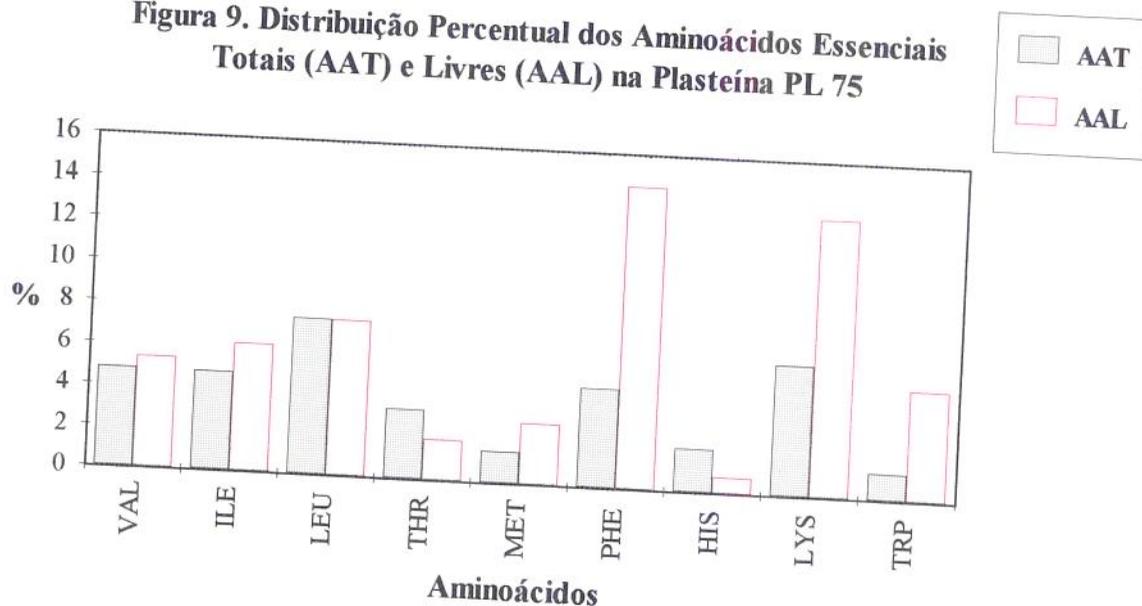


Figura 9. Distribuição Percentual dos Aminoácidos Essenciais Totais (AAT) e Livres (AAL) na Plasteína PL 75



Os resultados apresentados nas tabelas 10 e 11 mostram a distribuição percentual dos aminoácidos livres essenciais e não essenciais nos hidrolisados de IPS e caseína e nas plasteínas PL50 e PL75. Entre os aminoácidos essenciais do hidrolisado de caseína (HC) destacam-se o Trp com 20,03% do total de aminoácidos livres, a Lys com 11,47%, Leu com 11,53% e a Phe com 9,63%, enquanto no hidrolisado de IPS (HI) destacam-se a Phe (14,02%), a Lys (12,92%) e a Leu (11,53%). Nas plasteínas PL50 e PL75 destacam-se, respectivamente, o Trp (14,59; 14,48%) e a Lys (14,10; 13,34%). Entre os aminoácidos não essenciais destacam-se a Arg (12,44 - HC; 18,02 - HI; 13,61 - PL50 e 20,59 - PL75%) e a Tyr (9,85 - HC; 10,50 - HI; 11,34 - PL50 e 9,76% - PL75).

O percentual de aminoácidos livres nas plasteínas PL50 e PL75 foram semelhantes, em torno de 11%, valor este inferior ao obtido pelo hidrolisado de IPS (HI) e superior ao hidrolisado de caseína (HC). Estes dados sugerem a ocorrência de ligações peptídicas durante a síntese de plasteína conforme reportado por YAMASHITA et alii (1970, 1974), ARAI & FUJIMAKI (1978), HAJÓS (1979) e GOLOLOBOV (1986). Este resultado é importante na medida em que sugere um possível rearranjo na sequência peptídica, o que poderá modificar a estrutura e/ou conformação de um determinante antigênico alterando assim a sua imunogenicidade. Entretanto, estudos complementares deverão ser realizados para verificar tal proposição.

Tabela 10. Distribuição Percentual dos Aminoácidos Essenciais Totais (AAT) e Livres (AAL) nos Hidrolisados Pancreáticos de Caseína (HC) e IPS (HI) e das Plasteínas PL 50 e PL 75.

| AA | HC | | | | | | HI | | | | | | PL 50 | | | | | | PL 75 | | | | | |
|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|------|---------|-------|
| | AAT | | AAL | | AAT | | AAL | | AAT | | AAL | | AAT | | AAL | | AAT | | AAL | | AAT | | AAL | |
| | g/16g N | % | g/16g N | % | g/16g N | % | g/16g N | % | g/16g N | % | g/16g N | % | g/16g N | % |
| VAL | 6,68 | 5,98 | 0,21 | 3,39 | 4,98 | 4,84 | 0,95 | 5,76 | 5,06 | 4,65 | 0,89 | 7,29 | 5,03 | 4,82 | 0,66 | 5,37 | 3,89 | 3,57 | 1,14 | 9,34 | 4,98 | 4,77 | 0,76 | 6,18 |
| ILE | 5,65 | 5,06 | 0,26 | 4,20 | 4,83 | 4,69 | 0,93 | 5,64 | 7,50 | 6,89 | 0,45 | 3,69 | 7,83 | 7,51 | 0,92 | 7,49 | 3,53 | 3,24 | 0,24 | 1,97 | 3,48 | 3,34 | 0,24 | 1,95 |
| LEU | 7,88 | 7,05 | 0,63 | 10,18 | 7,74 | 7,52 | 1,90 | 11,53 | 2,17 | 1,99 | 0,34 | 2,79 | 1,58 | 1,51 | 0,36 | 2,93 | 2,17 | 1,99 | 0,34 | 2,79 | 1,58 | 1,51 | 0,36 | 2,93 |
| THR | 4,57 | 4,09 | 0,12 | 1,94 | 3,49 | 3,39 | 0,28 | 1,70 | 5,06 | 4,65 | 1,78 | 14,59 | 4,97 | 4,76 | 1,78 | 14,48 | 1,14 | 1,11 | 0,32 | 1,94 | 2,28 | 2,09 | 0,17 | 7,57 |
| MET | 2,72 | 2,43 | 0,19 | 3,07 | 1,14 | 1,11 | 0,32 | 1,94 | 2,24 | 2,17 | 0,13 | 0,79 | 2,18 | 2,09 | 0,10 | 0,81 | 5,08 | 4,93 | 2,31 | 14,02 | 6,82 | 6,26 | 1,72 | 14,10 |
| PHE | 4,89 | 4,38 | 0,59 | 9,53 | 5,08 | 4,93 | 2,31 | 14,02 | 1,30 | 1,26 | 0,96 | 5,82 | 1,34 | 1,29 | 0,65 | 5,29 | 2,24 | 2,17 | 0,13 | 0,79 | 2,28 | 2,09 | 0,17 | 7,57 |
| HIS | 3,08 | 2,76 | 0,05 | 0,81 | 2,24 | 2,17 | 0,13 | 0,79 | 6,63 | 6,44 | 2,13 | 12,92 | 6,58 | 6,31 | 1,64 | 13,34 | 6,63 | 6,44 | 2,13 | 12,92 | 6,82 | 6,26 | 1,72 | 14,10 |
| LYS | 6,98 | 6,25 | 0,71 | 11,47 | 6,63 | 6,44 | 2,13 | 12,92 | 1,30 | 1,26 | 0,96 | 5,82 | 1,34 | 1,29 | 0,65 | 5,29 | 1,30 | 1,19 | 0,66 | 5,41 | 1,34 | 1,29 | 0,65 | 5,29 |
| TRP | 1,28 | 1,46 | 1,24 | 20,03 | 1,30 | 1,26 | 0,96 | 5,82 | 37,43 | 36,35 | 9,91 | 60,12 | 37,97 | 36,4 | 7,11 | 57,84 | 37,43 | 36,35 | 9,91 | 60,12 | 37,97 | 36,4 | 7,11 | 57,84 |
| Total | 43,73 | 39,46 | 4,00 | 64,62 | 37,43 | 36,35 | 9,91 | 60,12 | 37,61 | 34,53 | 7,39 | 66,75 | 37,97 | 36,4 | 7,11 | 57,84 | 37,61 | 34,53 | 7,39 | 66,75 | 37,97 | 36,4 | 7,11 | 57,84 |

* Valores médios de análise em duplicata.

Tabela 11. Distribuição percentual dos aminoácidos não essenciais totais (AAT) e livres (AAL) nos hidrolisados pancreáticos de caseína (HC) e IPS (HI) e nas plasteínas PL50 e PL75*.

| AA | HC | | HI | | PL 50 | | PL 75 | | | | | | | |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|-------|-------|-------|------|-------|
| | AAT | AAL | AAT | AAL | AAT | AAL | AAT | AAL | | | | | | |
| | g/16g N % | | | | | | |
| CYS(½) | 0,63 | 0,56 | 0,89 | 0,86 | 0,89 | 0,86 | 0,69 | 0,63 | 0,09 | 0,74 | 0,60 | 0,57 | 0,09 | 0,73 |
| TYR | 4,87 | 4,36 | 3,58 | 3,48 | 3,58 | 1,73 | 4,98 | 4,57 | 1,39 | 11,39 | 4,05 | 3,88 | 1,20 | 9,76 |
| ASP | 6,68 | 5,98 | 12,27 | 11,91 | 12,27 | 0,24 | 8,29 | 7,61 | 0,16 | 1,31 | 8,63 | 8,27 | 0,11 | 0,89 |
| SER | 5,65 | 5,06 | 15,06 | 4,91 | 15,06 | 0,84 | 5,72 | 5,25 | 0,61 | 5,00 | 4,99 | 4,78 | 0,42 | 3,42 |
| GLU | 19,87 | 17,78 | 22,87 | 22,21 | 22,87 | 0,52 | 21,77 | 20,00 | 0,44 | 3,61 | 21,79 | 20,89 | 0,46 | 3,74 |
| PRO | 21,02 | 18,81 | 5,67 | 5,51 | 5,67 | nd | 15,68 | 14,40 | nd | — | 11,68 | 11,20 | nd | — |
| GLY | 2,96 | 2,65 | 3,86 | 3,75 | 3,86 | 0,16 | 4,07 | 3,74 | 0,09 | 0,74 | 3,97 | 3,81 | 0,08 | 0,65 |
| ALA | 3,04 | 2,72 | 4,32 | 4,19 | 4,32 | 0,11 | 4,28 | 3,93 | 0,37 | 3,03 | 4,28 | 4,10 | 0,29 | 2,36 |
| ARG | 3,27 | 2,93 | 6,98 | 6,78 | 6,98 | 18,02 | 5,77 | 5,30 | 1,66 | 13,61 | 6,33 | 6,07 | 2,53 | 20,59 |
| Total | 67,99 | 60,85 | 65,50 | 63,60 | 65,50 | 39,87 | 71,25 | 65,43 | 4,81 | 39,43 | 66,32 | 63,57 | 5,18 | 42,14 |

* Valores médios de análise em duplicata

** Não detectado

A tabela 12 apresenta o escore químico (%) dos hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína e das plasteínas PL50 e PL75, obtido pela comparação com uma proteína padrão FAO/WHO.

Tabela 12. Escore químico dos hidrolisados de caseína (HC) e de IPS (HI) e das plasteína PL50 e PL75.

| AA (g/16 g N) | Caseína ¹ | IPS ² | HC | HI | PL50 | PL75 | Padrão Teórico* |
|---------------|----------------------|------------------|--------|-------|--------|-------|-----------------|
| VAL | 6,51 | 5,20 | 6,68 | 4,98 | 5,06 | 5,03 | 3.5 |
| ILE | 5,62 | 5,30 | 5,65 | 4,83 | 3,89 | 4,98 | 2.8 |
| LEU | 8,29 | 8,60 | 7,88 | 7,74 | 7,50 | 7,83 | 6.6 |
| THR | 4,24 | 4,40 | 4,57 | 3,49 | 3,53 | 3,48 | 3.4 |
| MET + CYS (½) | 3,08 | 2,10 | 3,35 | 2,03 | 2,86 | 2,18 | 2.5 |
| TYR + PHE | 10,18 | 9,40 | 9,76 | 8,66 | 10,04 | 9,02 | 6.3 |
| HIS | 2,80 | 2,50 | 3,08 | 2,24 | 2,28 | 2,18 | 1.9 |
| LYS | 7,35 | 6,10 | 6,98 | 6,63 | 6,82 | 6,58 | 5.8 |
| TRP | 1,31 | 1,20 | 1,28 | 1,35 | 1,30 | 1,34 | 1.1 |
| EQ (%) | 119,09 | 84,00 | 116,36 | 81,20 | 103,82 | 87,20 | |

* Padrão teórico da FAO/WHO/UNU, 1985

1. TOGASHI (1993)

2. NETTO (1992)

No hidrolisado de caseína (HC), o aminoácido limitante é o triptofano, no hidrolisado de IPS e na plasteína PL75 são os aminoácidos sulfurados totais e na plasteína PL50 é a treonina. Os resultados obtidos para os hidrolisados de caseína e IPS estão de acordo com os reportados na literatura por PEARSON (1979), FREITAS (1985), TOGASHI (1993).

4.5. Determinação do peso molecular dos hidrolisados e plasteínas.

4.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.

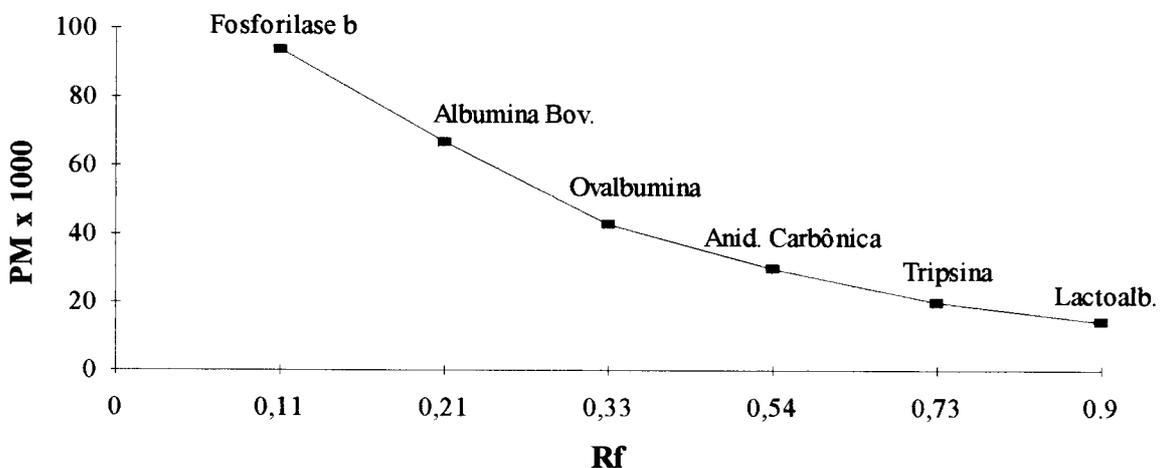
A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) tem sido muito utilizada para prover resolução adicional de peptídios maiores que 5000 daltons e assim complementar os dados de distribuição de peso molecular obtidos pela cromatografia de exclusão (LEARY, 1992).

Neste trabalho o nosso objetivo foi basicamente o de aplicar este procedimento visando monitorar as mudanças ocorridas nas proteínas intactas em relação às tratadas enzimaticamente (hidrólise e plasteína), bem como verificar a extensão comparativa do grau de hidrólise entre os hidrolisados e as plasteínas obtidas.

O comportamento eletroforético das matérias primas (caseína e IPS), hidrolisados e plasteínas, em gel de 8% de poliacrilamida, pH 7,0, estão mostrados na Figura 11. A curva padrão de pesos moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS está demonstrada na Figura 10.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que não houve diferenças entre os perfis eletroforéticos dos hidrolisados e das plasteínas obtidas. Isto provavelmente ocorreu devido ao elevado grau de hidrólise tanto dos hidrolisados quanto das plasteínas, não permitindo assim que a maioria das frações peptídicas não fossem detectadas devido a sensibilidade do método.

Figura 10. Curva Padrão de Pesos Moleculares por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS



PM = Peso molecular

$$r = 0,97341$$

Rf = Distância da migração relativa

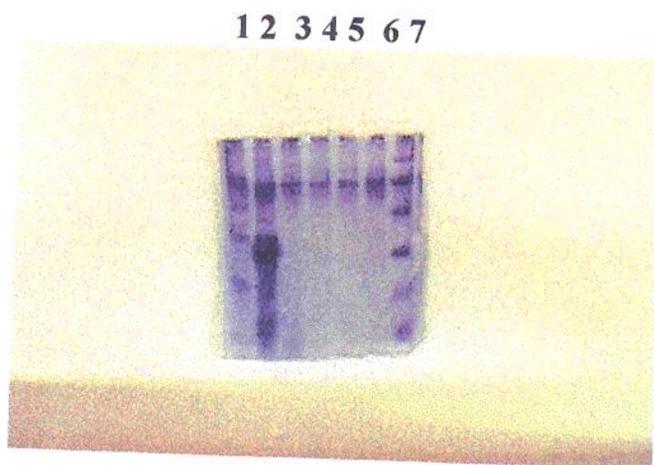


Figura 11. Eletroforese de placa. 1. IPS; 2. Caseína; 3. HI; 4. HC; 5. PL50; 6. PL75; 7. Padrões moleculares. Amostras de 50 μ g/gel. Placas verticais (9,5 x 9,0cm) contendo Poliacrilamida a 8%. Tampão Fosfato 1mM, pH 7,0; corrente de 20mA. Géis corados em Coomassie Brilliant Blue R-250.

Desta forma, estes resultados nos permitem apenas evidenciar a extensão elevada da hidrólise quando comparado às proteínas intactas, sem entretanto, demonstrar a distribuição de peso molecular das frações protéicas presentes nestes produtos. Assim, procedemos a determinação da distribuição dos pesos moleculares dos hidrolisados e plasteínas através da cromatografia de exclusão em gel Bio-rad P-60.

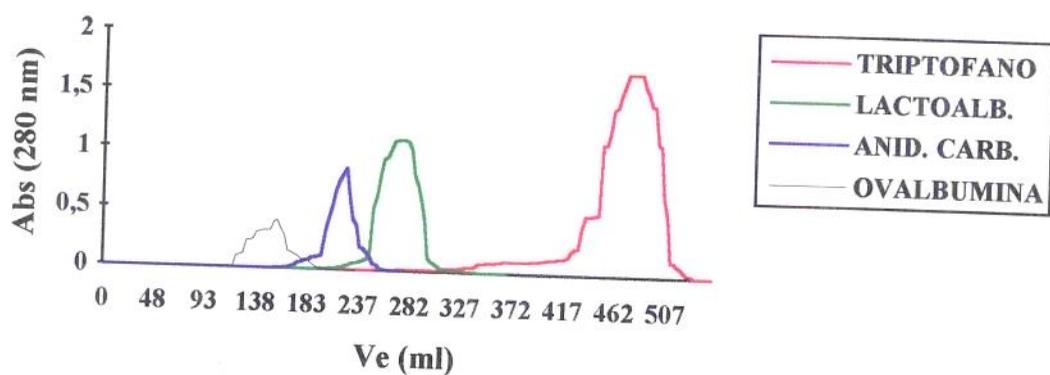
O IPS apresentou 9 bandas com peso molecular variando na faixa de 14.400 a 70.590 daltons. A caseína também apresentou o mesmo número de bandas. Entretanto a faixa de peso é ligeiramente inferior, variando de 8.788 a 68.744 daltons. Quanto aos hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína, ambos apresentaram apenas 3 bandas em torno de 60.000 daltons. O mesmo comportamento eletroforético foi observado em relação às plasteínas PL50 e PL75, apresentando bandas na faixa de 60.439 a 65.053 daltons.

4.5.2. Cromatografia de exclusão.

A padronização da coluna contendo gel Bio-rad P60 (2,0 x 50,0cm) está ilustrado na Figura 12. A calibração da coluna foi feita com as seguintes substâncias: ovalbumina (PM: 45.000), anidrase carbônica (PM: 29.000), α -latoalbumina (PM: 14.200) e triptofano (PM: 204,22). Foram utilizados 3ml das amostras dissolvidas em

ácido acético a 5%, pH 2,5 contendo NaCl 1M. A detecção do efluente da coluna foi realizada pela medida da absorbância em 280nm. O volume de exclusão (V_o) foi determinado pela eluição do Blue dextran, que foi de 50 a 80 ml.. A velocidade de fluxo foi de 36 ml/hora.

Figura 12. Curva Padrão de Pesos moleculares por Filtração em Gel



As Figuras 13 e 14 ilustram a cromatografia em gel desenvolvidas pelos hidrolisados e plasteínas, respectivamente. O hidrolisado de caseína (HC) apresentou 3 picos distintos nas faixas de peso molecular de 58.000; 35.000 e 420 daltons; enquanto o hidrolisado de IPS (HI) apresentou apenas 2 picos distintos na faixa de 45.000 e 420 daltons. Nos dois hidrolisados foram detectados peptídeos de pesos moleculares intermediários, não aparecendo sob a forma de picos. Estes resultados coincidem com os resultados apresentados pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, o qual demonstrou apenas uma banda na faixa de peso molecular 60.000 daltons e outra calculada como sendo 453 e 1340 daltons no HC e HI, respectivamente.

Figura 13. Curva dos hidrolisados pancreáticos submetidos à filtração em gel

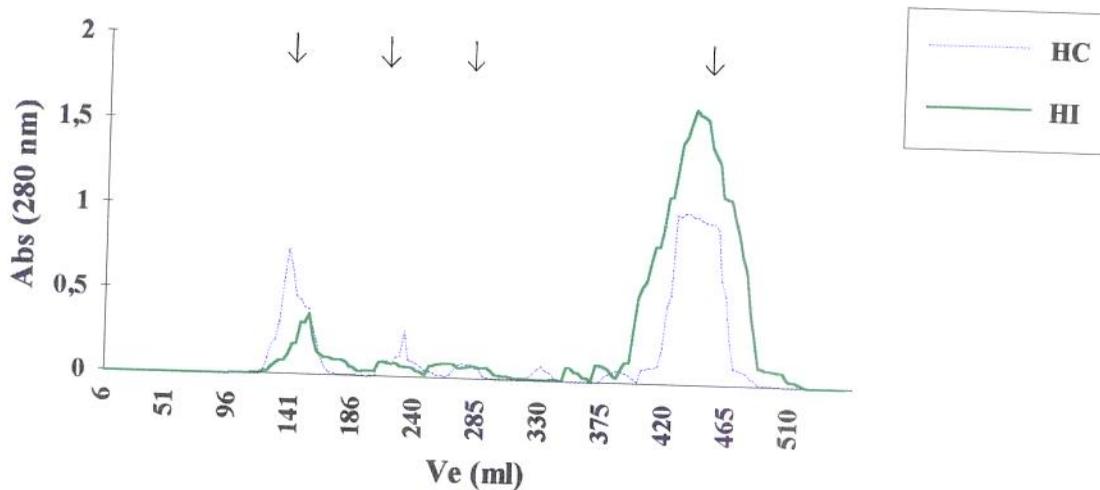
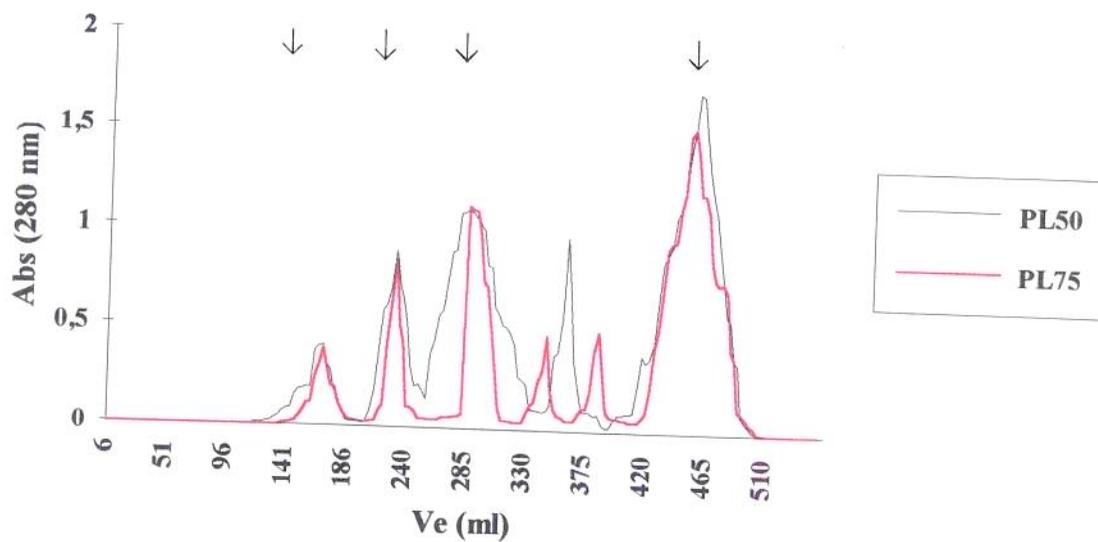


Figura 14. Curvas das plasteínas submetidas à filtração em gel



A plasteína PL50 apresentou 5 picos de eluição distintos com pesos moleculares nas seguintes faixas: 45.000; 32.000; 12.500; 8.600 e 350 daltons. A

plasteína PL75 apresentou 6 picos de eluição distintos nas seguintes faixas de pesos moleculares : 47.000; 32.000; 11.000; 9.600; 6.700 e 420 daltons.

Estes resultados demonstram que houve um aumento nas frações peptídicas de peso molecular intermediário, reforçando os resultados obtidos na determinação de aminoácidos livres, os quais indicam ter ocorrido síntese de ligação peptídica por condensação e/ou transpeptidação. Estudos complementares serão necessários para evidenciar tal propósito.

4.6. Digestibilidade.

O valor nutritivo da proteína depende principalmente de sua capacidade para satisfazer as necessidades de Nitrogênio e de aminoácidos essenciais. Os requerimentos de Nitrogênio e de aminoácidos são, por conseguinte, o padrão lógico pelo qual se deve medir esta capacidade na proteína. A capacidade de uma fonte de proteína satisfazer os requerimentos de aminoácidos e de nitrogênio dependem não somente da composição de aminoácidos e digestibilidade da fonte ou mistura de proteínas, mas também da composição e adequação da dieta como um todo, assim como do estado fisiológico, nutricional e de saúde do consumidor (PELLET & YOUNG, 1980). Os valores obtidos para digestibilidade *in vitro* das matérias primas (caseína e IPS), hidrolisados pancreáticos e plasteínas estão na Tabela 13.

Tabela 13. Digestibilidade (D) *in vitro* das matérias primas, hidrolisados pancreáticos (HC e HI) e das Plasteínas PL50 e PL75*.

| AMOSTRAS | D (%) |
|----------|---------------------------|
| IPS | 91,48 ± 0,56 ^a |
| CASEÍNA | 96,85 ± 0,16 ^b |
| HI | 98,33 ± 0,05 ^b |
| HC | 99,06 ± 0,23 ^b |
| PL50 | 98,02 ± 0,11 ^b |
| PL75 | 97,89 ± 0,37 ^b |

* Os valores representam a média de 3 determinações. Valores assinalados com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos podemos verificar que apenas o IPS apresentou valor de Digestibilidade *in vitro* diferente significativamente ($p < 0,05$). Este valor (91,48%) está de acordo aos dados reportados por CLATTERBUCK et alii (1980), de 89,8% e com HSU et alii (1977). Este valor também é concordante com o dado obtido por NETTO (1992) que determinou a digestibilidade *in vivo* do IPS e obteve 93,1% de digestibilidade.

A digestibilidade encontrada para a caseína (96,85%) é concordante com o resultado reportado por TOGASHI (1993) de 98,93% e superior ao valor relatado por HSU et alii (1977) de 90,5% e NETTO (1992) de 94,0%.

Estes valores de digestibilidade elevada justificam-se principalmente pelo fato das matérias primas utilizadas (caseína e IPS) serem fontes protéicas de elevado teor nitrogenado e desprovidas de quantidades consideráveis dos fatores antinutricionais que podem estar presentes no caso do IPS.

4.7. Inibidor de tripsina.

A atividade inibitória da tripsina para o IPS e seu respectivo hidrolisado e para as plasteínas PL50 e PL75 são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Atividade do Inibidor de Tripsina (UTI) nas amostras de IPS, HI, PL50 e PL75.

| AMOSTRAS | INIBIDOR DE TRIPSINA (UTI/mg proteína)* |
|----------|--------------------------------------------|
| IPS | 42,78 ± 0,03 |
| HI | 21,16 ± 0,03 |
| PL50 | 8,85 ± 0,25 |
| PL75 | 12,39 ± 0,09 |

Todos os valores apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Estes valores representam a média ± DP de três determinações.

O valor obtido para a atividade do inibidor de tripsina do IPS, de 42,78 UTI/mg de proteína é inferior ao reportado por NETTO (1992), de 72,17 UTI/mg de proteína. Observou-se uma redução de 50,5% da atividade inibitória na produção do

hidrolisado pancreático HI; e de 80,7% e 71,0% na obtenção das plasteínas PL50 e PL75, respectivamente. Esta diminuição da atividade inibitória pode ser explicada pelo próprio conteúdo de tripsina presente no sistema enzimático da pancreatina.

Estudos indicam que o inibidor de tripsina da soja acelera a secreção de enzimas pancreáticas devido a um mecanismo de feed-back mediado pela colecistoquinina, resultando em hipertrofia do pâncreas, o qual é uma resposta biológica reversível (PEARSON, 1979). Em adição, CHURELLA et alii (1976) reportou que formulados infantis contendo soja apresentam atividade residual (10%) do inibidor de tripsina e que esta atividade não produziu hipertrofia de pâncreas ou redução de peso do animal.

Os valores obtidos para as plasteínas PL50 e PL75 foram inferiores aos apresentados pelos respectivos hidrolisados utilizados como substratos na síntese de plasteína. Considerando ser a plasteína realizada em presença da pancreatina, estes valores podem ser explicados pelo mesmo motivo que permite a redução da atividade inibitória nos hidrolisados, ou seja, a presença de tripsina no sistema enzimático utilizado.

4.8. Avaliação imunológica.

A tabela 15 e as figuras 16, 17 e 18 mostram os resultados obtidos na reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) de soros de animais imunizados com caseína e IPS, frente às preparações antigênicas. Os resultados demonstram que todas as amostras analisadas não induziram a geração de resposta imune específica, ou seja, apresentaram resposta negativa.

Este resultado sugere que sejam realizadas técnicas para detecção de anticorpos e determinantes antigênicos ne elevada sensibilidade como o ensaio imunoenzimático competitivo (c-ELISA), capaz de detectar até 1,0 ng/ml de determinante antigênico. FREITAS (1991) também obteve resultado negativo no teste de PCA para um hidrolisado de caseína. Ao realizar o teste c-ELISA, verificou que o hidrolisado que apresentava o menor conteúdo de epitopos era o IV (1/1000 de caseína). Este hidrolisado caracterizou-se por apresentar o menor tamanho médio de

peptídios (20% de peptídios de alto PM - 10 a 20 resíduos; 62% de peptídios de baixo peso molecular - 2 a 9 resíduos e 18% de aminoácidos livres).

Tabela 15. Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva de soros de animais imunizados com caseína e IPS, frente às preparações antigênicas.

- : reação negativa + () : positiva; diâmetro (mm) do halo

| Antisoro | Animal | HC | HI | PL50 | PL75 | Caseína | IPS |
|--------------|--------|----|----|------|------|---------|-------|
| Caseína | a | - | - | - | - | + (8) | - |
| | b | - | - | - | - | + (8) | - |
| | c | - | - | - | - | + (8) | - |
| IPS | a | - | - | - | - | - | + (3) |
| | b | - | - | - | - | - | + (3) |
| | c | - | - | - | - | - | + (3) |
| Caseína +IPS | a | - | - | - | - | + (5) | + (3) |
| | b | - | - | - | - | + (5) | + (3) |
| | c | - | - | - | - | + (5) | + (3) |

A **B**

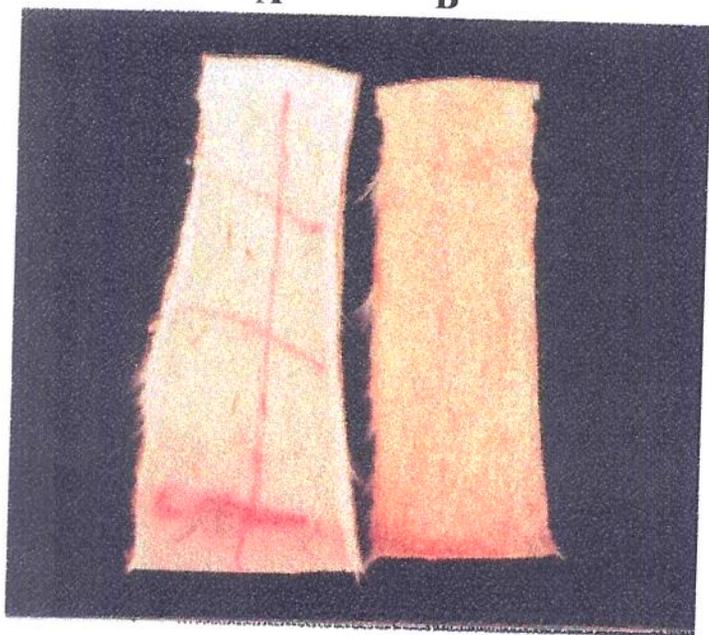


Figura 15. Representação fotográfica do mapa cutâneo realizado nos cobaias. Neste caso representamos um cobaia utilizado como controle negativo para a reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA). **A.** face externa; **B.** face interna.

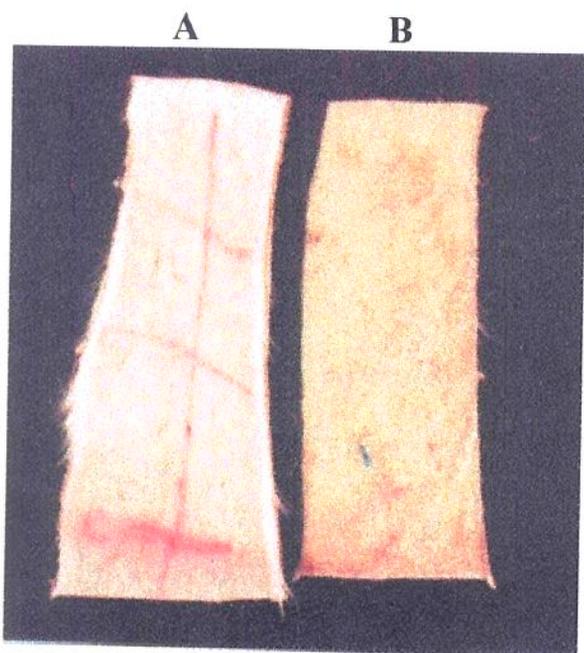


Figura 16. Representação fotográfica do mapa cutâneo realizado nos cobaias. Neste caso representamos um cobaia utilizado como controle positivo para a reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA). **A.** face externa; **B.** face interna.

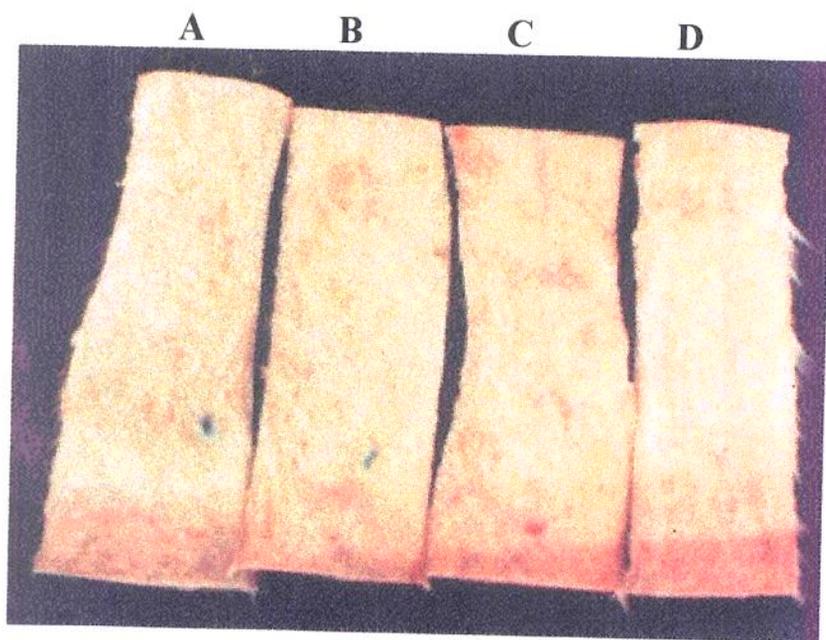


Figura 17. Representação fotográfica do mapa cutâneo dos cobaias após a reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) frente aos hidrolisados e plasteínas. **A.** Hidrolisado de Caseína (HC); **B.** Hidrolisado de Isolado Protéico de Soja (HI); **C.** Plasteína PL50 e **D.** Plasteína PL75.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho representa um estudo sistemático das condições de hidrólise e obtenção de plasteína visando desenvolver um produto com propriedades hipoalergênicas.

A melhor condição para obtenção dos hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína foi de 5% de substrato, relação E/S de 1/20 , pH 7,5, durante 6 horas a 37°C, sob agitação constante.

O melhor rendimento para produção das plasteínas foi obtido quando utilizado 40% de substrato em pH 7,0, nas relações de HI/HC de 50/50 (PL50) e 75/25 (PL75), durante 24 horas, sob repouso.

Ao compararmos as duas plasteínas PL50 e PL75 do ponto de vista da sua composição em aminoácidos (Escore Químico), verificamos que a plasteína PL50 apresenta melhor qualidade que a PL75 (EQ(%) = 103,82 e 87,20, respectivamente). A composição de aminoácidos livres das plasteínas PL50 e PL75 foi semelhante, em torno de 12%; sendo este valor superior ao teor de aminoácidos livres obtidos no hidrolisado de caseína (5%) e inferior ao obtido na produção do hidrolisado de IPS (16%).

A distribuição do peso molecular das plasteínas PL50 e PL75 foi semelhante, sendo detectados peptídios de baixo, médio e alto peso molecular. Esta distribuição mostrou-se diferente em relação aos hidrolisados pancreáticos de IPS e caseína, os quais apresentaram apenas picos de eluição de baixo e alto peso molecular. Estes resultados sugerem a ocorrência de ligação peptídica durante a reação de síntese de plasteína. Entretanto estudos complementares serão necessários para evidenciar este fato.

Os elevados valores apresentados para a digestibilidade *in vitro* e os teores reduzidos de atividade de inibidor de tripsina nas plasteínas , principalmente a PL50 indicam que este produto é o indicado para a realização de estudos posteriores necessários a sua futura aplicação na alimentação humana.

Em relação a avaliação imunológica, os resultados obtidos nos permitem dar continuidade à caracterização do produto através de técnicas de maior sensibilidade, assim como realizar a avaliação clínica do produto a fim de elucidar as propriedades imunogênicas dos hidrolisados e plasteína produzida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAS, K. Antigens in food. **Nutr. Rev.**, **42**: 85-91, 1984.
2. AKESON, N. L. & STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J. Nutr.**, **83**: 257, 1964.
3. ANDERSON, J. A. The establishment of common language concerning adverse reactions to food and food additives. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **78**: 140-4, 1986.
4. ANDREWS, P. The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Bioch. J.**, **96**: 595-606, 1965.
5. ANET, J.; BACK, J. F.; BAKER, R. S.; BARNETT, D.; BURLEY, R. W.; HOWDEN, M. E. H. Allergens in white and yolks of hen's egg. A study of IgE binding by egg proteins. **Intl. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **77**: 364-71, 1985.
6. A. O. A. C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12 ed. Washington, D.C. 1975. 805p.
7. ARAI, S.; YAMASHITA, M.; ASO, K.; FUJIMAKI, M. A parameter related to the plastein reaction. **J. Food Sci.**, **40**: 342-4, 1975.
8. ARAI, S. & FUJIMAKI, M. The plastein reaction: theoretical basis. **Ann. Nutr. Alim.**, **32**: 701-7, 1978.
9. ARAI, S.; ASO, H.; KIMURA, H. An enzymatically modified protein produced with covalent incorporation of L-methionine for use in nutritional improvement of soy protein. **Agric. Biol. Chem.**, **47**: 2115-7, 1983.
10. ASHLEY, D. V. M.; TEMPLER, R.; BARCLAY, D.; DORMOND, C.; JOST, R. Amino acid-enriched plastein: a source of limiting amino acids for the weaning rat. **J. Nutr.**, **113**: 21-7, 1983.

11. ASO, K.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. General properties of a plastein synthesized from a soybean protein hydrolysate. **Agric. Biol. Chem.**, **3711**: 2505-9, 1973.

12. -----; -----; -----; ----- . Hydrophobic force as a main factor contributing to plastein chain assembly. **J. Biochem.**, **76**: 341-7, 1974.

13. ASSELIN, J.; HEBERT, J.; AMIOT, J. Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. **J. Food Sci.**, **54**: 1037-9, 1989.

14. ATKINS, F. M.; STEINBERG, S. S.; METCALFE, D. D. Evaluation of immediate adverse reactions to foods in adult patients. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **75**: 348-55, 1985.

15. BARNETT, D.; BONHAM, B.; HOWDEN, M. E. H. Allergenic cross-reactions among legume foods. An in vitro study. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **79**: 433-8, 1987.

16. BARRET, J. T. **Textbook of immunology. An introduction to immunochemistry and immunobiology.** 5^a ed. St. Louis. Ed. C. V. Mosby Company, 1988, p. 25-214.

17. BARRIGA, R. B. & MIRANDA, M. P. Modificación enzimática de proteínas mediante la reacción de plasteína. **Alimentos**, **6**: 17-25, 1990.

18. BELIKOV, V. M. & GOLOLOBOV, M. Y. Plasteins, their preparation, properties, and use in nutrition. **Die Nahr.**, **30**: 281-7, 1986.

19. BERNHISEL-BROADBENTI, J. & SAMPSON, H. A. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **83**: 435-40, 1989a.

20. BERNHISEL-BROADBENTI, J.; SAMPSON, H. A.; TAYLOR, S.; SAMPSON, H. A. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II. Laboratory correlates. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **84**: 701-9, 1986b.
21. BERZOFSKY, J. A. Intrinsic and extrinsic factors in antigenic structure. **Sci.**, **229**: 932, 1985.
22. BISHOP, J. M.; HILL, D. J.; HOSKING, C. S. Natural history of cow milk allergy. **J. Pediatr.**, **116**: 862-7, 1990.
23. BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, **37**: 911-7, 1959.
24. BOCK, S. A.; LEE, W.; REMIGIO, L. K.; MAY, C. D. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **62**: 327-34, 1978.
25. BRADY, M. S.; RICHARD, K. A.; FITZGERALD, J. F.; LEMONS, J. A. Specialized formulas and feeding for infants with malabsorption or formula intolerance. **J. Am. Diet. Assoc.** **86**: 191-205, 1986.
26. BROKS, J. R.; MORR, C. V. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **62**: 1347-50, 1985.
27. BURKS, A. W.; BROOKS, J. R.; SAMPSON, H. A. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **81**: 1135-42, 1988.
28. BUSINCO, L.; BRUNO, G.; GIAMPIETRO, P. G.; CANTANI, A. Allergenicity and nutritional adequacy of soy protein formulas. **J. Pediatr.**, **121**: S21-8, 1992.

29. CAMPOS-NETO, A.; SCHLOSSMAN, S. F.; LEVINE, H.; YONOVSKI, A.; YARON, A. Specificity and genetic restrictions of the guinea-pig immune response to dinitrophenylalanyl octapeptides. **Immunol.**, **35**: 763-9, 1978.
30. CATSIMPOLAS, N. Immunological aspects of foods and food safety. In: TANNENBAUM, S. R. **Nutritional and safety aspects of food processing.**, New York. Dekker, 1979. p. 399-409.
31. CRESPO, J. F.; BLANCO, C.; CONTRERAS, J.; PASCUAL, C.; ESTEBAN, M. M. Food allergy: a clinical and epidemiological study. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **89**: 192-6, 1992.
32. DARNTON-HILL, I.; COVENEY, J.; DAVEY, G. R. Goat milk-nutritional and public health aspects: a review. **Food Technol.**, **39**: 568-72, 1987.
33. DEMONTE, A. Caracterização por métodos químicos e imunoquímicos da glicinina da soja (*Glycine max L.*) submetida a modificação de temperatura e pH. Dissertação (Doutorado em Bioquímica). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1993.
34. DETERMANN, H.; EGGENSCHWILLER, S.; MICHEL, W. Molekulargewichtsverteilung der enzymatischen kondensationsreaktion. **Justus Lieb. Ann. Chemie.**, **633**: 183-8, 1965a.
35. DETERMANN, H.; HEVER, J.; JAWOREK, D. Spezifität des pepsins bei der kondensationsreaktion. **Justus Lieb. Ann. Chemie.**, **633**: 189-96, 1965b.
36. DUNCAN, D. B. Multiple range and multiple F tests. **Biometr.**, **11**: 1-42, 1955.
37. EASTHAM, E. J.; LICHAUCO, T.; GRADY, M. I.; WALKER, W. A. Antigenicity of infant formulas: Role of immature intestine on protein permeability. **J. Pediatr.**, **93**: 561-4, 1978.
38. EDWARDS, J. H. & SHIPE, W. F. Characterization of pepsin reaction products formed by pepsin, α -chymotrypsin, and papain treatment of egg albumin hydrolysates. **J. Food Sci.**, **43**: 1215-8, 1978.

39. ELLIS, M. H.; SHORT, J. A.; HEINER, D. C. Anaphylaxis after ingestion of a recently introduced hydrolyzed whey protein formula. **J. Pediatr.**, **118**: 74-7, 1991.
40. ELSAYED, S. & BENNICHI, H. The primary structure of allergen M from cod. **Scand. J. Immunol.**, **4**: 203-8, 1975.
41. ELSAYED, S.; APOLD, J.; HOLEN, E.; VIK, H.; DYBENDAL, T. The structural requirements of epitopes with IgE binding capacity demonstrated by three major allergens from fish, egg and tree pollen. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **51**: S17-31, 1991.
42. ERIKSEN, S. e FAGERSON, I. The plastein reaction and its applications. **J. Food Sci.**, **41**: 490-3, 1976.
43. ESTEBAN, M. M. Adverse food reactions in childhood: concept, importance, and present problems. **J. Pediatr.**, **121**: S1-3, 1992.
44. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert group. **Technical Report Series**, **301**, 1985.
45. FERGUNSON, A. C. Food allergy. **Progr. Food Nutr. Sci.**, **8**: 77-107, 1984.
46. FIESE, T. M.; TAINER, J. A.; GEYSEN, H. M.; HOUGHTEN, R. A.; LERNER, R. A. Influence of protein flexibility and peptide conformation on reactivity of monoclonal anti-peptide antibodies with a protein α -helix. **Immunol.**, **84**: 8568-72, 1987.
47. FREITAS, O. Produção e desenvolvimento de hidrolisados enzimáticos de caseína para usos terapêuticos. Dissertação (Doutorado em Bioquímica). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1991. 129 p.
48. FRIES, J. H. Studies on the allergenicity of soy bean. **Ann. Allergy**, **29**: 1-7, 1971.

49. FUJIMAKI, M.; YAMASHITA, M. ARAI, S.; KATO, H. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. Part I. Enzymatic proteolysis and plastein synthesis application for preparing bland protein like substances. **Agric. Biol. Chem.**, **34**: 1325-32, 1970.
50. FUJIMAKI, M.; ARAI, S.; YAMASHITA, M. Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. In: FEENEY, R. E. & WHITAKER, J. R. **Food protein, improvement through chemical and enzymatic modification**. Washington, D.C., Elsevier, 1977. p.156-84.
51. GALEAZZI, M. A. M. Extração, purificação e propriedade da polifenoloxidase da banana nanica (*Musa cavendishii*, L.). Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1978,195 p.
52. GALEAZZI, M. A. M. Nutrition changes of soybean protein by different storage conditions: approach for evaluation "in vitro". **Report of United Nations University**, National Food Research Institute, Japan, 1981, p. 4.
53. GARDNER, M. L. G. Gastrointestinal absorption of intact proteins. **Ann. Rev. Nutr.**, **8**: 329-50, 1988.
54. GOLOLOBOV, V. M.; ANTONOVA, T. V.; BELIKOV, V. M. Transpeptidation as the main chemical reaction causing the formation of plasteins. **Die Nahr.**, **30**: 289-94, 1986.
55. GOODMAN, J. N. A imunogenicidade e a especificidade antigênica. In: FUNDENBERG, H. H. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1980. Cap. 4. p.37-45.
56. HAJÓS, G. Study on reversibility of enzymatic proteolysis. **Acta Alimentar.**, **8**: 85, 1979.
57. HAJÓS, G. & HALÁSZ, A. Incorporation of L-methionine into casein hydrolysate by enzymatic treatment. **Acta Alimentar.**, **11**: 189-97, 1982.

58. HEPPELL, L. M. J.; CANT, A. J.; KILSHAW, P. J. Reduction in the antigenicity of whey proteins by treatment: a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. **Br. J. Nutr.** **51**: 29-36, 1984.
59. HERIAN, A. M.; TAYLOR, S. L.; BUSH, R. K. Identification of soybean allergens by immunoblotting in sera from soy-allergic adults. **Intl. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **92**: 193-8, 1990.
60. HILL, L. W. Immunologic relationships between cow's milk and goat milk. **J. Pediatr.**, **15**: 157-62, 1939.
61. HILL, D. J.; FIRER, M. A.; BALL, G.; HOSKING, C. S. Recovery from milk allergy in early childhood: antibody studies. **J. Pediatr.**, **114**: 761-6, 1989.
62. HOFFMAN, D. R. Immunochemical identification of the allergens in egg white. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **71**: 481-6, 1983.
63. HOFSTEN, B. & LALASIDIS, G. Protease-catalysed formation of plastein products and some of their properties. **J. Agric. Food Chem.** **24**: 460-5, 1976.
64. HOROWITZ, J. & HAUROWITZ, F. Mechanism of plastein formation. **Biochem. Biophys. Acta**, **33**: 231-7, 1959.
65. ISOLAURI, E.; SUOMALAINEN, H.; KAILA, M. Local immune response in patients with cow milk allergy: follow-up of patients retaining allergy or becoming tolerant. **J. Pediatr.**, **120**: 9-15, 1992.
66. JAKOBSSON, I. Food antigens in human milk. **Eur. J. Clin. Nutr.**, **45** (suppl.1): 29-33, 1991.
67. JUTO, P.; ENGBERG, S.; WINBERG, J. Treatment of infantile atopic dermatitis with a strict elimination diet. **Clin. Allergy**, **8**: 493-500, 1978.

68. KAKADE, M. L.; SIMONS, N.; LIENER, I. An evaluation of synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chem.**, **46**: 518-26, 1969.
69. KILSHAW, P. J.; HEPPELL, L. M. J.; FORD, J. E. Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. **Arch. Dis. Child.**, **57**: 842-7, 1982.
70. KLEINMAN, R. E. Cow milk allergy in infancy and hypoallergenic formulas. **J. Pediatr.**, **121**: S116-21, 1992.
71. KLEMOLA, T.; SAVILAHTI, E.; LEINIKKI, P. Mumps IgA antibodies are not absorbed from human milk. **Acta paediatr. Scandinav.**, **75**: 230-2, 1986.
72. KNIGHTS, R. J. Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. In: LIFSHITZ, F. (ed): **Nutrition for special needs in infancy**. New York, Marcel Dekker, Inc, 1985, p.105-115.
73. KOHLER, L.; MEEUWISSE, G.; MORTENSSON, W. Food intake and growth of infants between six and twenty six weeks of age on breast milk, cow's milk formula, or soy formula. **Acta Paediatr. Scand.**, **73**: 40-8, 1984.
74. KUROSAWA, K.; IMAMURA, I.; NORIO, H.; FUSAMOTO, H.; WADA, H.; KAMADA, T.; TAGAWA, K. Organ assimilation of peptides. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, **37**: S79-86, 1991.
75. LANGELAND, T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. VI. Occurrence of proteins cross-reacting with allergens in hen's egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull, and in hen egg yolk, and hen and chicken sera and flesh. **Allergy**, **39**: 399-412, 1983.
76. LEARLY, H. L. Nonclinical testing of formulas containing hydrolyzed milk protein. **J. Pediatr.**, **121**: S42-6, 1992.
77. LEBENTAL, E. & LEE, P. C. Development of functional response in human exocrine pancreas. **Pediatr.**, **66**: 556, 1980.

78. LEE, Y. Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. **J. Pediatr.**, **121**: S47-50, 1992.
79. LUCAS, B. & SOTELLO, A. Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Anal. Biochem.**, **107**: 192-7, 1980.
80. LUDWIG, E.; NOTZOLD, H.; WINKLFR, H. Some enzyme-catalyzed reactions during plastein formation. **Die Nahr.**, **30**: 295-8, 1986.
81. MATTHEWS, D. M. Protein absorption then and now. **Gastroenterol.**, **73**: 1267-9, 1977.
82. MAY, C. D.; REMIGIO, L.; FELDMAN, J.; BOCK, S. A.; CARR, R. I. A study of serum antibodies to isolated milk proteins and ovalbumin in infants and children. **Clin. Allergy**, **7**: 583-95, 1977.
83. MAY, C. D.; FOMON, S. J.; REMIGIO, L. Immunologic consequences of feeding infants with cow milk and soy products. **Acta Paediatr. Scandinav.**, **71**: 43-51, 1982.
84. MERRIT, R. J.; CARTER, M.; HAIGHT, M.; EINSEBERG, L. D. Whey protein hydrolyzate formula for infants with gastrointestinal intolerance to cow milk and soy protein in infant formulas. **J. Pediatr. Gastroent. Nutr.**, **11**: 78-82, 1990.
85. MINFORD, A. M. B.; MACDONALD, A.; LITTLEWOD, J. M. Food intolerance and food allergy in children: a review of 68 cases. **Arch. Dis. Child.**, **57**: 742-7, 1982.
86. MISKELLY, F. G.; BURR, M. L.; VAUGHAN-WILLIAMS, E.; FEHILY, A. M.; BUTLAND, B. K.; MERRETT, T. G. Infant feeding and allergy. **Arch. Dis. Child.**, **63**: 388-93, 1988.

87. MONTI, J. C. & JOST, R. Papain-catalyzed synthesis of methionine-enriched soy plasteins. Average chain length of the plastein peptides. **J. Agric. Food Chem.**, **27**: 1281-5, 1979.
88. MOORE, S. On determination of cystine as cysteic acid. **J. Biol. Chem.**, **238**: 235-7, 1963.
89. MORAN, J. R. Effects of prolonged exposure to partially hydrolyzed milk protein. **J. Pediatr.**, **121**: S90-4, 1992.
90. NETTO, F. M. Produção e caracterização de hidrolisado pancreático de Isolado Protéico de soja para nutrição clínica. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1992. 161p.
91. OGAWA , T.; BALDO, N.; TSUJI, H.; OKAJIMA, H.; NISHIKAWA, K.; SASAOKA, K. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, **37**: 555-65, 1991.
92. OVARY, Z. Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. **Progress. Allergy**, **5**: 460, 1958.
93. PALLAVICINI, C.; PERUFFO, A. D. B.; FINLEY, J. W. Comparative study of soybean plasteins synthesized with soluble and immobilized α -chymotrypsin. **J. Agric. Food Chem.**, **31**: 846-8, 1983.
94. PASCUAL, C.; ESTEBAN, M.; CREPO, J. F. Fish allergy: evaluation of the importance of croo-reactivity. **J. Pediatr.**, **121**: S29-34, 1992.
95. PELLET, P. L. & YOUNG, V. R. **Evaluacion nutricional de alimentos proteinicos**. Tokyo, La Universidad de Las Naciones Unidas. 1980. 154p.
96. PERLMAN, F. Food allergens. In: CATSIMPOLAS, N. (ed), **Immunological aspects of foods**. Avi publishing company, Connecticut, 1977, p. 279-315.

97. POLANCO, I. Current status of digestive intolerance to food protein. **J. Pediatr.**, **121**: S108-10, 1992.
98. POWELL, G. K. Milk and soy induced enterocolitis of infancy. **J. Pediatr.**, **93**: 553-9, 1978.
99. PUSKI, G. Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. **Cereal Chem.**, **52**: 655-64, 1975.
100. SACHS, M. I.; JONES, R. T.; YUNGINGER, J. W. Isolation and partial characterization of a major peanut allergen. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **67**: 27-34, 1981.
101. SACHS, M. I. & YUNGINGER, J. W. Food-induced anaphylaxis. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, **11**: 743-55, 1991.
102. SAMPSON, H. A. & McCASKILL, C. C. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. **J. Pediatr.**, **107**: 669-75, 1985.
103. SAMPSON, H. A. Differential diagnosis in adverse reactions to foods. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **78**: 212-9, 1986.
104. SAMPSON, H. A. The role of food hypersensitivity and mediator release in atopic dermatitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **81**: 635-45, 1988.
105. SAMPSON, H. A.; BERNHISEL-BROADBENT, J.; YANG, E.; SCANLON, S. M. Safety of casein hydrolysate formula in children with cow milk allergy. **J. Pediatr.**, **118**: 520-5, 1991.
106. SAVILAHTI, E.; KUITUNEN, M; VISAKORP, J. K. Cow milk allergy. In: LEBENTHAL, E. **Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy**. New York, Raven, 1989. p.473-89.
107. SAVILAHTI, E.; KUITUNEN, M. Allergenicity of cow milk proteins. **J. Pediatr.**, **121**: S12-20, 1992.

108. SAVILAHTI, E.; TUOMIKOSKI-JAAKKOLA, P.; JÄRVENPÄÄ, A. L.; VIRTANEN, M. Early formula feeding vs. breast milk is associated with less atopy during 10 years of life. **J. Pediatr. Gastroent. Nutr.**, **13**: 317, 1991.
109. SAYLOR, J. D. & BAHNA, S. L. Anaphylaxis to casein hydrolyzate formula. **J. Pediatr.**, **118**: 71-4, 1991.
110. SCHMANDKE, H. Die plasteinsynthese als eine möglichkeit zur modifizierung funktioneller eigenschaften von protein. **Die Nahr.**, **20**: 567-73, 1976.
111. SCHMITZ, J.; DIGEON, B.; CHASTANG, C.; DUPOVY, D.; LEROUX, B.; ROBILLARD, P.; STROBEL, S. Effects of brief early exposure to partially hydrolyzed and whole cow milk proteins. **J. Pediatr.**, **121**: S85-9, 1992.
112. SHAH, P. C.; FREIER, S.; PARK, B. H.; LEE, P. C.; LEBENTHAL, E. Pancreozymin and secretin enhanced duodenal fluid antibody levels to cows milk proteins. **Gastroent.**, **83**: 916-21, 1982.
113. SHIBASAKI, M.; SUZUKI, S.; TAJIMA, S.; NEMOTO, H.; KUROUME, T. Allergenicity of major component proteins of soybean. **Intl. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **61**: 441-8, 1980.
114. SIMOPOULOS, A. P. Symposium proceedings on adverse reactions to food and food additives. Introduction. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **78**: 125-6, 1986.
115. SINGH, B.; LEE, K. C.; FRAGA, E.; WILKINSON, A.; WONG, M. A. Minimum peptide sequence necessary for priming and triggering of humoral and cell mediated immune response in mice: use of synthetic peptide antigens of defined structure. **J. Immunol.**, **124**: 1336-43, 1980.
116. SPACKMAN, D. H.; STEIN, H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Analyt. Chem.**, **30**: 1190, 1958.
117. STROBEL, S. Dietary manipulation and induction of tolerance. **J. Pediatr.**, **121**: S74-9, 1992.

118. SUKAN, G. & ANDREWS, A. T. Application to the plastein reaction to casein and skim-milk powder. **J. Dairy Res.**, **49**: 265-78, 1982.
119. TAINIO, V. M.; SAVILAHTI, E.; ARJOMAA, P.; SALMENPERÄ, L.; PERHEENTUPA, J.; SIIMES, M. A. Increased plasma IgG cow's milk antibodies associated with early weaning and eating unmodified cow's milk; production of plasma IgA and IgM cow's milk antibodies is stimulated during exclusive breast-feeding. **Acta Paediatr. Scandinav.**, **77**: 807-11, 1988.
120. TAINIO, V. M. & SAVILAHTI, E. Value of immunologic tests in cow milk allergy. **Allergy**, **45**: 189-96, 1990.
121. TANIMOTO, S.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Probes for catalytic action of α -chymotrypsin in plastein synthesis. **Agr. Biol. Chem.**, **36**: 1595-1602, 1972.
122. TAUDORF, E.; BUNDGAARD, A.; HANCKE, S.; HANSEN, L. V.; PRAHL, P.; WEEKE, B. Non-hydrolysed and hydrolysed soy protein. A human immunological study. **Allergy**, **39**: 203-9, 1984.
123. TAYLOR, S. L. Immunological and allergic properties of cow's milk proteins in humans. **J. Food Prot.**, **49**: 239-50, 1986.
124. TAYLOR, S. L.; LEMANSKE, R. F.; BUSH, R. K.; BUSSE, W. W. Food allergens: structure and immunologic properties. **Ann. Allergy**, **59**: 93-9, 1987.
125. TAYLOR, S. L. Chemistry and detection of food allergens. **Food Technol.**, **5**: 146-52, 1992.
126. TOVEY, E. R. & BALDO, B. A. Characterisation of allergens by protein blotting. **Electrophor.**, **8**: 452-63, 1987.
127. TSAI, S.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Effect of substrate concentration on plastein productivity and some rheological properties of the products. **Agr. Biol. Chem.**, **36**: 1045-9, 1972.

128. TSAI, S.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Polyacrilamide gel electrophoresis of plasteins. **Agric. Biol. Chem.**, **38**: 641-4, 1974.
129. ZEIGER, R. S.; HELLER, S.; MELLON, M.; O'CONNOR, R.; HAMBURGUER, R. N. Effectness of dietary manipulation in the prevention of food allergy in infants. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **78**: 224-38, 1986.
130. ZOPPI, G.; GASPAR, R.; MANTOVANELLI, F. Diet and antibody response to vaccinations in healthy infants. **Lancet**, **2**: 11-4, 1983.
131. YAMASHITA, M.; ARAI, S.; MATSYAMA, J.; GONDA, M.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Enzymatic modification of proteins in fodstuffs. Part III. Phenomenal survey on α -chymotryptic plastein synthesis from peptic hydrolyzate of soy protein. **Agric. Biol. Chem.**, **34**: 1484-91, 1970.
132. YAMASHITA, M.; ARAI, S.; TSAI, S.; FUJIMAKI, M. Plastein teaction as a method for anhancing the sulfur-containig amino acid level of soybean protein. **J. Agr. Food Chem.**, **19**: 1151-4, 1971.
133. YAMASHITA, M.; ARAI, S.; TANIMOTO, S.; FUJIMAKI, M. Mode of action of α -chimotrypsin in its reverse reaction at pH 5,3. **Bioch. Biophys. Acta**, **358**: 102-12, 1974.
134. YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Plastein reaction for food protein improvement. **J. Agric. Food Chem.**, **24**: 1100-4, 1976a.
135. YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. A low-phenilalanine, high-tyrosine plastein as an accetable dietetic food. **J. Food Sci.**, **41**: 1029-32, 1976b.
136. YAMASHITA, M.; ARAI, S.; AMANO, Y.; FUJIMAKI, M. A novel one-stap process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: application to soy protein and flour for enhancig their methionine levels. **Agric. Biol. Chem.**, **43**: 1065-9, 1979.

137. YATSENKO, A. M.; MAZO, V. L.; ZORIN, S. N.; GMOSHINSKII, I. V.; FEDORYUA, L. F.; SHIRINA, L. I.; TSINBANOV, V. V. Physicochemical and immunochemical properties of a natural casein concentrate and its hydrolysates. **Appl. Biochem. Microbiol.**, **26**: 307-11, 1990.
138. YUNGINGER, J. W. Proper application of available laboratory tests for adverse reactions to foods and food additives. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **78**: 220-3, 1986.
139. WAHAN, U.; WAHL, R.; RUGO, E. Comparison of the residual allergenic activity of six different hydrolyzed protein formulas. **J. Pediatr.**, **121**: S80-4, 1992.
140. WALKER, W. A. Adverse food reactions in childhood: summary and future directions. **J. Pediatr.**, **121**: S4-6, 1992.
141. WATANABE, M. & ARAI, S. The plastein reaction and its applications. In: HUDSON, B. J. F. **Developments in food proteins**. New York, Elsevier, 1988. v.6, p. 179-217.
142. WEBER, K. & OSBORNE, M. The reability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.**, **224**: 4406-12, 1969.
143. WIELAND, T.; DETERMANN, H.; ALBRECHT, E. Isolierung einheitlicher plastein-bausteine. **Justus Lieb. Ann. Chemie**, **690**: 185-97, 1960.
144. WILLIAMS, P. C. The use of titanium dioxide as catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **J. Sci. Food Agric.**, **24**: 343-8, 1973.