



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição



Milena Morandi Vuolo
Nutricionista

**EFEITO DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA DIGESTIBILIDADE
E ANTIGENICIDADE DA β -LACTOGLOBULINA**

Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Netto

Orientador

Campinas, 2011



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**Milena Morandi Vuolo
Nutricionista**

**EFEITO DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA DIGESTIBILIDADE
E ANTIGENICIDADE DA β -LACTOGLOBULINA**

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

Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Netto

Orientador

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Milena Morandi Vuolo, aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____ e orientado (a) pela Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Netto.

Assinatura Orientador

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

V982e Vuolo, Milena Morandi, 1984-
Efeito da enzima transglutaminase na digestibilidade e
antigenicidade da beta-lactoglobulina / Milena Morandi
Vuolo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Flavia Maria Netto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas do soro do leite. 2. Agentes redutores.
3. Transglutaminase. 4. Digestibilidade in vitro. 5.
Antigenicidade. I. Netto, Flavia Maria. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of the transglutaminase enzyme in the digestibility and
antigenicity of the β -lactoglobulin

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Whey Proteins

Reducing agents

Transglutaminase

Digestibility in vitro

Antigenicity

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de
Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Hélia Harumi Sato

Data da defesa: 02/02/2012

Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr.^a Hélia Harumi Sato
(Titular) - DCA/FEA/UNICAMP

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

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

AGRADECIMENTOS

À Deus, ajuda nos momentos difíceis.

À Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Netto, pela orientação, confiança e pelos conhecimentos adquiridos no desenvolvimento deste trabalho.

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

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

Às companheiras de laboratório Eliana e Bete, pelo auxílio, pela paciência, pela ajuda nos momentos difíceis e pelo aprendizado adquirido no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Chico, pela ajuda e paciência.

À Conceição e a Meg, pela ajuda nas análises.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Mariana, Fernanda e Célia, pela companhia, ajuda e experiências adquiridas no desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas e funcionários do DEPAN, pelas conversas nos intervalos.

À minha família, meus pais Pedro e Elaine, e ao meu irmão Diogo, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis.

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

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

À FAEPEX, pela concessão de auxílio pesquisa para desenvolvimento deste trabalho e ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

RESUMO

O leite bovino contém proteínas que são consideradas antigênicas e capazes de induzir algum tipo de resposta imunológica, dentre elas destaca-se a β -lactoglobulina (β -Lg). A utilização da enzima transglutaminase (TG), que catalisa reações de ligação ϵ -(γ -glutamina)lisil inter ou intramoleculares, incorporação de aminas e desaminação tem demonstrado eficiência em alterar o potencial antigênico de alimentos. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da reação de polimerização induzida pela TG na atividade antigênica da β -Lg e sua digestibilidade, na presença dos agentes redutores glutatona (GSH) e ácido ascórbico (AA). As modificações da β -Lg com a TG na presença dos agentes redutores foram realizadas através de experimentos fatoriais 22 nos quais as variáveis independentes foram a relação enzima:substrato (E/S) (0 – 51,6 U TG g⁻¹ de proteína) e concentração dos agentes redutores, [GSH] (0 - 0,67 mmol/L) ou [AA] (0- 0,02 mol/L) e as variáveis dependentes foram grau de polimerização e concentração de IgE. A polimerização foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e grau de polimerização (GP) através da determinação de lisinas livres. A avaliação da antigenicidade foi feita por ELISA, utilizando soro de camundongos BALB/c sensibilizados com β -Lg na forma nativa. A resistência das amostras à ação da pepsina foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina (SDSPAGE/Tricina). Os tratamentos realizados com TG e GSH apresentaram polímeros de alta massa molar (MM > 97,4 kDa), exceto para a condição do ensaio 5 (0,34 mmol/L GSH), que não utilizou TG. Os tratamentos com TG e AA também apresentaram polímeros de alta massa molar (MM > 97,4 kDa), exceto para a condição do ensaio 2 (44,1 U de TG g⁻¹ e 0,003 mol/L de AA) e ensaio 5 (0,01 mol/L AA, que não utilizou TG). O GP foi maior para as amostras tratadas com TG na presença de agentes redutores, quando comparadas às amostras tratadas somente com TG ou agente redutor. Os resultados mostraram que a presença dos agentes redutores levou ao aumento da polimerização pela TG ao desnaturar a proteína levando à maior exposição dos aminoácidos lisina e glutamina. Não houve diminuição na antigenicidade da β -Lg tratada com TG na presença de GSH ou AA, porém houve aumento da antigenicidade de algumas amostras obtidas sob algumas das condições dos ensaios realizados com os

agentes redutores quando comparadas à β -Lg. Os tratamentos realizados com TG na presença dos agentes redutores não aumentaram a digestibilidade da β -Lg pela pepsina. Os digeridos das amostras obtidas sob as condições relativas aos níveis extremos do planejamento experimental ($\pm 1,41$) e o ponto central, foram avaliados quanto à sua antigenicidade. Os resultados mostraram que não houve diminuição da antigenicidade da β -Lg tratada com TG e GSH ou TG e AA., quando comparadas à β -Lg. A polimerização com TG na presença de agentes redutores GSH e AA não foi capaz de modificar a antigenicidade das amostras digeridas, sugerindo que não houve modificações na proteína capazes de aumentar sua digestibilidade pela pepsina ou modificar regiões de epítomos.

Palavras chave: Proteínas do soro de leite; Agentes redutores; Transglutaminase; Digestibilidade *in vitro*; Antigenicidade.

ABSTRACT

Cow's milk contains proteins which are considered antigenic and able to lead to immune response, among them β -lactoglobulin (β -Lg) is the most important. The transglutaminase (TG) is the only enzyme commercially used that catalyses inter or intramolecular cross linking reaction in various proteins and demonstrates efficiency to alter the antigenic potential of food. The current work aimed at studying the effect of the reaction of induced polymerization by TG in presence of the reducing agents glutathione (GSH) as well as ascorbic acid (AA) in the antigenic activity of β -Lg and its digestibility. The modifications in β -Lg induced by TG in presence of reducing agents were carried out using factorial experiments 2², in which the independent variables were the enzyme:substrate ratio (E/S) (0 – 51,6 U TG g⁻¹) and concentration of reducing agents, [GSH] (0 - 0,67 mmol/L) or [AA] (0- 0,02 mol/L), and the dependent variables were the polymerization degree and concentration of IgE. Polymerization was assessed by electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE), and the polymerization degree (PD) was determined by the free lysine content. The assessment of antigenicity was by ELISA assay, using serum of BALB/c mice sensitized with native β -Lg. The resistance of the samples to the action of pepsin was evaluated by electrophoresis in polyacrylamide gel in presence of SDS and tricine (SDSPAGE/Tricine). The treatments using TG and GSH showed high molecular weight polymers (MM > 97,4kDa), except for a test condition 5 (0,34 mmol/L GSH), where TG was not used. The treatments with TG and AA also showed polymers of high molecular weight (MM > 97,4kDa), except for the test condition 2 (44,1 U TG g⁻¹ and 0,003 mol/L of AA) and test 5 (0,01 mol/L AA, without TG). The PD was higher in the samples treated with TG in presence of reducing agents, when compared to samples treated only with TG or reducing agents. The results showed that the presence of reducing agents led to the increase of polymerization by TG since they denature the protein, leading to increased exposure of the amino acids glutamine and lysine, substrate for TG. The results showed that there was no reduction in the antigenicity of β -Lg treated with TG in presence of GSH or AA, however an increase in the antigenicity of some modified samples was observed when compared to the native β -Lg. . The treatments carried out with TG and reducing agents did not increase the digestibility of the β -Lg by

pepsin. The antigenicity of the digested from the samples obtained under the conditions of the extreme levels of experimental planning ($\pm 1,41$) and at the central point were assessed. The results showed that after digestion with pepsin there was no decrease of the antigenicity of β -Lg treated with TG in the presence of GSH or AA as compared to digested β -Lg. Polymerization with TG in the presence of reducing agents was not able to alter the antigenicity of the samples, which suggests that there were no modifications in the protein that would be able to increase its digestibility by pepsin as well as the epitopes regions of the β -Lg.

Key words: Whey Proteins; Reducing agents; Transglutaminase; Digestibility *in vitro*; Antigenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da β -Lg, mostrando a posição das pontes dissulfeto e o grupo tiol (Adaptado de EISSA et al. 2006).....	6
Figura 2. Reações catalisadas pela transglutaminase. (Adaptado Sharma, Lorenzen e Qvist, 2001).....	15
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação da TG após tratamento da proteína com agente redutor, na formação de estrutura protéicas mais compactas (adaptado de EISS e KHAN, 2006).....	17
Figura 4. Glutathiona γ -glutamilcisteinaglicina (Huber e Almeida, 2008).....	19
Figura 5. Oxidação do ácido <i>L</i> -ascórbico (H_2A) a ácido <i>L</i> -deidroascórbico (A_{ox}) (FORNARO e COICHEV, 1997).....	20
Figura 6. Fluxograma geral do experimento.....	22
Figura 7. Fluxograma dos ensaios biológicos e imunoquímicos.....	27
Figura 8. Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais.....	29
Figura 9. Perfil da β -Lg nativa em SDS-PAGE (1): padrões de massa molecular (14,4-97,4) kDa (2) β -Lg nativa.....	31
Figura 10. Perfil eletroforético da TG, em SDS-PAGE. (1): padrões de massa molecular (14,4-97,4) kDa (2) β -Lg nativa.....	31
Figura 11 (a). Superfície de resposta; (b). Curva de nível para o grau de polimerização (%) em função da relação enzima: substrato (U TG g/ proteína) e concentração de GSH (mmol/L).....	35
Figura 12 (a). Superfície de resposta; (b). Curva de nível para o grau de polimerização (%) em função da relação enzima substrato (E/S; U TG g/ proteína) e concentração de ácido ascórbico (AA; mol/L).....	38
Figura 13. Perfil eletroforético SDS-PAGE, em meio redutor, da β -Lg e β -Lg tratada na presença do agente redutor GSH, polimerizadas pela TG.....	41
Figura 14. Perfil eletroforético SDS-PAGE, em meio redutor, da β -Lg e β -Lg tratada na presença do agente redutor AA, polimerizadas pela TG.....	41
Figura 15. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor, de β -Lg, β -Lg tratada na presença do agentes redutor GSH, polimerizadas pela TG, digeridos por pepsina.....	44

Figura 16. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor, de β -Lg, β -Lg tratada na presença do agentes redutor AA, polimerizadas pela TG, digeridos por pepsina.....44

Figura 17 (a). Superfície de resposta; (b). Curva de nível para IgE (%) em função da relação enzima: substrato E/S (U TG g/ proteína) e GSH (mmol/L).....51

Figura 18. Níveis séricos de IgE no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-n), avaliados contra: (1) β Lg-D digerida; (5) 0,34 mmol/L GSH digerida ; (6) 51,6 U TG/g proteína e 0,34 mmol/L GSH digerida; (7) 25,8 U TG/g proteína digerida; (8) 25,8 U TG/g proteína e 0,67 mmol/L GSH digerida (9) 25,8 U TG/g proteína e 0,34 mmol/L GSH digerida.....53

Figura 19. Níveis séricos de IgE no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-n), avaliados contra: (1) β Lg D digerida, (5) 0,01 mol/L AA digerida (6) 51,6 U TG/ g proteína e 0,01 mol/L AA digerida (7) 25,8 TG/ g proteína digerida (8) 25,8 TG/ g proteína e 0,02 mol/L AA digerida (9) 25,8 TG/ g proteína e 0,01 mol/L AA digerida.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaio para o planejamento experimental, variando os parâmetros relação enzima:substrato e concentração de glutathione ([GSH]).....	23
Tabela 2. Ensaio para o planejamento experimental variando os parâmetros relação enzima:substrato e concentração de ácido ascórbico ([AA]).....	23
Tabela 3. Resultados experimentais do grau de polimerização (GP) de acordo com o planejamento experimental para a glutathione (GSH) como agente redutor.....	32
Tabela 4. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para grau de polimerização (GP).....	33
Tabela 5. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta grau de polimerização (GP).....	34
Tabela 6. Resultados experimentais do grau de polimerização (GP) de acordo com o planejamento experimental para ácido ascórbico (AA) como agente redutor.....	36
Tabela 7. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para grau de polimerização (GP).....	37
Tabela 8. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta grau de polimerização (GP).....	37
Tabela 9. Resultados experimentais da resposta IgE de acordo com o planejamento experimental com glutathione (GSH) como agente redutor.....	46
Tabela 10. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para resposta de IgE.....	47
Tabela 11. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta IgE.....	47
Tabela 12. Resultados experimentais da resposta IgE de acordo com o planejamento experimental com ácido ascórbico (AA) como agente redutor.....	48
Tabela 13. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para resposta de IgE.....	49
Tabela 14. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta IgE.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido áscórbico
α-La	Alfa-lactoalbumina
Alúmen	3%Hidróxido de alumínio
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
β-Lg	Beta-lactoglobulina
β-Lg N	Beta-lactoglobulina nativa
β-Lg D	Beta-lactoglobulina digerida
BSA	Soroalbumina bovina
CPS	Concentrado protéico do soro
Cys	Cisteína
DTT	Ditiotreitol
EAST	<i>Enzyme Allergosorbent Test</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E:S	Enzima:substrato
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GP	Grau de polimerização
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IPS	Isolado protéico de soja
LF	Lactoferrina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
PBS	Solução salina fosfatada
PSSG	Proteína ligada á glutaciona
RAST	<i>Radio-allergosorbent test</i>
RIE	<i>Rocket immuno-electrophoresis</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
-SH	Sulfridril livre
S-S	Ponte dissulfeto
SFG	Fluido similar ao fluido gástrico
TMB	Tetrametilbenzidina
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfônico
TG	Transglutaminase
Tyr	Tirosina
U g-1	Unidade de atividade enzimática da TG por grama de substrato
Val	Valina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1 Proteínas do soro de leite.....	5
3.2 Antigenicidade das proteínas do soro de leite.....	7
3.3 Estratégias para redução da antigenicidade das proteínas do soro de leite....	9
3.4 Digestibilidade e antigenicidade de proteínas	12
3.5 Reações com transglutaminase.....	14
4. Material e Métodos.....	21
4.1 Materiais.....	21
4.2 Obtenção e caracterização da β -Lg polimerizada.....	22
4.2.1 Planejamento experimental.....	22
4.3 Avaliação da polimerização.....	24
4.3.1 Determinação de lisinas livres.....	24
4.3.2 Grau de polimerização.....	25
4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
4.4 Digestão gástrica <i>in vitro</i>	25
4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina (SDS PAGE/Tricina).....	25
4.5 Avaliação da atividade da TG na presença dos agentes redutores.....	26
4.6 Ensaio biológicos e imunoquímicos.....	27
4.6.1 Fase de sensibilização.....	28
4.6.2 Ensaio imunoquímico: ELISA.....	29
4.7 Análise estatística.....	30
5. Resultados e Discussão.....	31
5.1 Polimerização da β -Lg.....	32
5.1.1 Influência dos agentes redutores na polimerização da β -Lg.....	32
5.1.2 Perfil eletroforético da β -Lg polimerizada com TG na presença de GSH ou AA.....	39

5.2 Atividade da enzima transglutaminase na presença dos agentes redutores GSH e AA.....	42
5.3 Digestão gástrica.....	43
5.4 Avaliação da Antigenicidade.....	45
5.4.1 Análise dos níveis séricos de IgE dos digeridos pépticos.....	52
6. Conclusão.....	55
7. Referências Bibliográficas.....	56
8. Anexo.....	71
8.1 Anexo 1: Certificado da Comissão de ética na experimentação Animal CEEA/Unicamp.....	71

1. Introdução

Alergia alimentar é caracterizada por resposta imunológica anormal a algum componente de alimento. Representa problema importante de saúde, especialmente em países industrializados, onde se estima que afeta de 1 a 2% da população adulta e até 8% das crianças com idade abaixo de três anos (HELM e BURKS, 2000).

Diversos alimentos podem causar algum tipo de reação alérgica, sendo mais frequentemente citados a soja, o trigo, o ovo, o peixe, alguns cereais e o leite bovino. As proteínas presentes nestes alimentos são os principais componentes responsáveis pelas reações alérgicas (CLARE, GHARST e SANDERS, 2007; BURKS e BALLMER-WEBER, 2006).

Segundo Yoshino et al. (2004), as proteínas alergênicas apresentam as seguintes características: resistência às enzimas digestivas, estabilidade térmica e/ou presença de epítomos na sua estrutura. As enzimas do trato gastrointestinal degradam proteínas dos alimentos formando principalmente peptídeos. Algumas delas, no entanto, resistem ao processo de digestão e podem ser absorvidas pelo epitélio na sua forma intacta e imunologicamente ativa, sensibilizando o sistema imune da mucosa intestinal (BANON et al., 2002; YOSHINO et al., 2004). Por essa razão, a digestibilidade e permeabilidade intestinal podem influenciar no potencial alergênico das proteínas (MORENO, 2007). Desta forma, a resistência à digestão com pepsina, utilizando um fluido similar ao fluido gástrico (SFG), vem sendo considerada um dos critérios para avaliar o potencial alergênico de novas proteínas (MORENO, 2007).

O leite bovino é um alimento com grande potencial de causar alergias, por possuir proteínas altamente alergênicas, dentre elas estão as proteínas do soro, a β -Lactoglobulina (β -Lg), α -Lactoalbumina (α -La), soroalbumina (BSA), lactoferrina (LF). A β -Lg é considerada o alérgeno dominante das proteínas do soro e a α -Lg, BSA e LF em menor proporção (MONACI et al., 2006; BALL et al., 1994).

Diversos processos têm sido estudados com o objetivo de diminuir a antigenicidade de proteínas alimentares (MONACI et al., 2006). Entre eles, a utilização da enzima transglutaminase (TG), que catalisa reações de ligação ϵ -(γ -glutamina)lisil inter ou intramoleculares, incorporação de aminas e desaminação (MOTOKI e SEGURO, 1998; SHARMA et al., 2001, JONG e KOPPELMAN, 2002; FORT et al., 2007), apresentou resultados positivos na redução da antigenicidade de proteínas da soja (BABIKER et al. 1998) e trigo (WATANABE et al., 1994. Villas-Boas et al. (2010) verificaram diminuição da antigenicidade da β -Lg quando polimerizada com TG na presença de Cys. O tratamento combinado de hidrólise das proteínas do soro com Alcalase com polimerização com TG reduziu a imunoreatividade das proteínas, principalmente da β -Lg, quando comparado à proteína somente hidrolisada ou polimerizada (WRÓBLEWSKA et al., 2008).

As proteínas do soro do leite, em sua estrutura nativa, são de difícil acesso para a ação da TG, devido à sua estrutura globular estabilizada por pontes dissulfeto, que limitam a exposição dos aminoácidos glutamina e lisina para a formação de ligações cruzadas (Bönisch et al 2007). A desnaturação térmica ou química de proteínas globulares é um passo importante para a reação de polimerização, por melhorar o acesso da TG aos resíduos de glutamina e lisina (SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002).

O uso de agentes redutores como ditioneitol (DDT) aumenta a reatividade, principalmente da β -Lg, pela clivagem das pontes dissulfídicas, levando ao desdobramento das proteínas e maior exposição dos sítios de ligação da enzima (JONG e KOPPELMAN, 2002; LEE et al., 2001). Como o DDT não pode ser utilizado na produção de alimentos, alternativas para aumentar a reatividade da β -Lg por outros agentes redutores são investigadas. Faergemand, Otte e Qvist (1997) indicaram o aminoácido cisteína (Cys) como possível substituto do DDT como agente redutor para propiciar a polimerização da β -Lg por TG. A glutathione (γ -glutamilcisteinaglicina, GSH) aumentou em 20-30% a polimerização de caseína induzida por TG (BONISCH, LAUBER e KULOZIK, 2007). A utilização do ácido ascórbico (AA) foi benéfica à formação de surimi por reduzir as pontes dissulfeto das proteínas miofibrilares, possibilitando maior acesso da TG endógena aos

aminoácidos glutamina e lisina (SOOTTAWAT, CHUTIMAN e WONNOP, 2005). Miwa et. al (2002) observaram que a adição dos agentes redutores GSH e AA juntamente com a TG aumenta a polimerização e altera as propriedades físicas do leite e de produtos lácteos.

Embora tratamentos físicos, químicos e enzimáticos venham sendo utilizados para reduzir o potencial antigênico das proteínas do soro de leite, o efeito da ação da TG na presença de agentes redutores na antigenicidade e digestibilidade das proteínas do leite, em especial da β -Lg foi pouco estudado.

Assim o presente trabalho teve como objetivo estudar a polimerização da β -Lg na presença dos agentes redutores GSH e AA e seu efeito na antigenicidade e digestibilidade da proteína.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da reação de polimerização induzida pela TG na presença dos agentes redutores GSH e AA, sobre a atividade antigênica da β -Lg.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito dos agentes redutores GSH e AA na polimerização da β -Lg pela TG utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.
- Obter e caracterizar a β -Lg polimerizada pela TG na presença dos agentes redutores GSH e AA.
- Avaliar o potencial antigênico das proteínas modificadas pela suscetibilidade à digestão com pepsina e pelos testes imunoquímicos, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Revisão Bibliográfica

3.1 Proteínas do soro leite

O leite de vaca constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de humanos de todas as idades, é composto por aproximadamente 3,5% de proteínas, sendo 2,9% caseína e 0,6% proteínas de soro (SGARBIERI, 1996). A caseína pode ser definida de maneira simplificada como a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado em pH 4,6 a 20 °C, e o líquido remanescente recebe o nome de soro do leite, que contém cerca de 20% das proteínas do leite. A α -lactoalbumina (α -La) e a β -Lg perfazem 70-80% das proteínas do soro. Além dessas, são encontradas a soroalbumina (BSA), lactoferrina (LF), imunoglobulinas, proteose-peptonas, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996).

As proteínas do soro do leite bovino são de grande importância na alimentação humana por serem uma fonte rica em aminoácidos indispensáveis, de elevada digestibilidade e apresentarem ações fisiológicas específicas, como antioxidante, antitumoral, antihipertensiva, protetora de mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos, virais e bacterianos (SGARBIERI, 2004). Na indústria de alimentos são utilizadas na formulação de produtos por suas propriedades funcionais (espumante, emulsificante, geleificante, formação de fibras), (SGARBIERI, 1996; MARSHAL e HARPER, 1988; PAGNO et.al, 2009).

A β -Lg foi a primeira proteína do leite a ser cristalizada e a designação β é derivada do fato de aparecer como segunda banda no perfil de ultracentrifugação do soro do leite e representa 50 % do total de proteínas do soro do leite. (SGARBIERI, 1996; MONACI et. al., 2006). É uma proteína globular, constituída por 162 aminoácidos, contém um grupo sulfidril livre (-SH) e duas pontes dissulfeto intramoleculares (-S-S-), ligando a Cys⁶⁶ – Cys¹⁶⁰ e Cys¹⁰⁶ – Cys¹¹⁹, o que contribui significativamente para a sua estabilidade, além de um grupo tiol (-SH) Cys¹²¹, importante devido a sua habilidade em participar na formação intermolecular ou intramolecular de pontes dissulfeto. A estrutura cristalina mostra que o monômero (Figura 1) (MM ~ 18,4 kDa) consiste predominantemente de folhas- β (50%) e uma

pequena porção de α -hélice (15%), estruturas ao acaso (15%) e estruturas em volta ou *turns* (20%) (PAPIZ et al., 1986; MONACO et al., 1987; BROWNLOW et al., 1997). A β -Lg pode acomodar pequenas moléculas hidrofóbicas em seu interior, devido à organização de sua estrutura terciária possuir oito folhas- β antiparalelas que se arranjam formando uma espécie de cálice, caracterizando a β -Lg como um membro da família das lipocalinas, que compreende as proteínas com função de transporte (ROUVINEN et al., 1999).

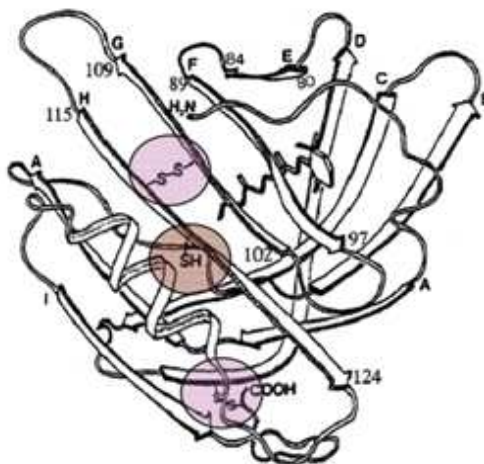


Figura 1. Estrutura tridimensional da β -Lg, mostrando a posição das pontes dissulfeto e do grupo tiol (Eissa et al., 2006).

Em pH 5,1 a 6,7, a β -Lg se apresenta como um dímero estável constituído de duas unidades esféricas, devido à interação eletrostática entre aspartato (Asp¹³⁰) e ácido glutâmico (Glu¹³⁴) de um determinado monômero e o resíduo lisina de outro monômero (SAWYER et al., 2002; SGARBIERI, 1996). Em pH menor que 3,0 ou maior que 8,0, os dímeros se dissociam em monômeros. A β -Lg sofre desnaturação térmica pelo aquecimento a temperaturas superiores a 60 °C. A 95 °C há completa desnaturação da β -Lg, que sofre extensa transformação conformacional, com exposição de grupos nucleofílicos altamente reativos e de áreas hidrofóbicas (SGARBIERI, 1996).

Já foram identificadas onze variantes genéticas da β -Lg, sendo as variantes A e B as principais. Elas se diferem apenas nas posições 64 (Asp→Gly) e (Val→Ala) (GANAI et al., 2009).

3.2 Antigenicidade das proteínas do soro de leite

Proteínas que produzem resposta imune específica, tais como produção de anticorpos ou imunidade mediada por células, são denominadas antígeno ou alérgeno. As reações alérgicas ocorrem quando um indivíduo que produziu imunoglobulinas em resposta a um antígeno inócuo, ou alérgeno, encontra subsequentemente o mesmo alérgeno (ABBAS e LICHTMAN, 1995). Epítipo ou determinante antigênico, seqüência de aminoácidos que se liga aos anticorpos, apresentam duas formas: “contínuo” ou “linear”, quando os aminoácidos estão em seqüência na estrutura primária, podem ser inacessíveis na conformação nativa e aparecer somente quando a proteína é desnaturada e “conformacional”, onde vários aminoácidos estão muito próximos devido à estrutura tridimensional da proteína (BALL et al., 1994; ABBAS e LICHTMAN, 2005). A capacidade de um antígeno estimular a produção de anticorpos é denominada imunogenicidade, enquanto que a capacidade de um antígeno interagir com um anticorpo ou células do sistema imune é denominada antigenicidade (CORDLE et al., 1994).

Diversos alimentos podem causar algum tipo de reação alérgica, sendo os mais frequentemente citados a soja, o trigo, o ovo, o peixe, alguns cereais e o leite bovino. As proteínas presentes nestes alimentos são os principais componentes responsáveis pelas reações alérgicas (CLARE, GHARST e SANDERS, 2007). As reações alérgicas alimentares são mediadas principalmente por imunoglobulinas E (IgE), outras reações que envolvem outras classes de imunoglobulinas, complexos imunes e/ou mecanismos mediados por células, também podem ocorrer. (ABBAS e LICHTMAN, 2005; WALL, 2004). Os sintomas da alergia alimentar incluem náuseas, vômitos, dor abdominal, flatulência, diarreia, urticária e crise de asma. A situação mais grave de alergia a alimentos é o choque anafilático (BUCK, HATTERSLEY e KIMBER, 2010). O leite bovino contém várias proteínas que são consideradas antigênicas e capazes de induzir algum tipo de resposta imunológica. Em estudo realizado com pacientes alérgicos, foi verificado que as proteínas mais abundantes

no leite caseína, β -Lg e α -La são as mais antigênicas, enquanto que BSA e LF, encontradas em menor quantidade, são menos antigênicas (REDDY, KELLA e KINSELLA, 1988; MONACI et al., 2006).

A β -Lg pode promover reações alérgicas mesmo quando presente em baixas concentrações (PUERTA et al., 2006). Seló et al. (1999) observaram a presença de grande quantidade de epítomos em toda extensão da estrutura da β -Lg após a sua hidrólise com tripsina. Wal (2001) relatou que os epítomos da β -Lg reconhecidos por mais de 90% dos pacientes alérgicos foram os fragmentos f(41-60), f(102-124) e f(149-162), cada um contribuindo com aproximadamente 10-15% da imunorreatividade da proteína. Clement et al. (2002) verificaram a ocorrência de epítomos não só na α -hélice e *loops* externos, mas também nas folhas β da β -Lg. Otani et al. (1985) mostraram que a estrutura terciária da β -Lg era necessária para sua imunorreatividade. No entanto, estudos com anticorpos monoclonais identificaram 12 sítios antigênicos na estrutura da β -Lg, localizados em regiões hidrofóbicas da molécula, conservando epítomos responsáveis pelo reconhecimento das IgE, inacessíveis na conformação nativa da proteína, porém acessíveis quando desnaturadas (Maier et al., 2006).

Métodos imunoquímicos são utilizados para monitorar e verificar a ruptura dos epítomos específicos pela hidrólise enzimática e processos associados (BESLER, 2004); Entre eles os mais utilizados encontram-se o *Radio-Allergosorbent Test* (RAST), *Enzyme Allergosorbent Test* (EAST), *Rocket Immuno-Electrophoresis* (RIE), *Western Blotting*, Imunoblote e ELISA (BESLER, 2004; POMS, KLEIN e ANKLAM; 2004; KOPPELMAN e HEFLE, 2006; MONACI et al., 2006). Estes métodos são aplicáveis para detecção qualitativa e quantitativa de componentes alimentares e verificação da presença de proteínas potencialmente alergênicas (HUDSON e RAY, 1989, MONACI et al., 2006).

O teste ELISA é o método comumente utilizado em laboratórios e indústria de alimentos que detecta, por reação colorimétrica, ligação entre antígeno e anticorpo. A concentração do complexo antígeno-anticorpo pode ser estimada com base em uma curva padrão obtida com quantidades conhecidas de anticorpo purificado. Existem dois tipos de ELISA: competitivo e sanduíche, sendo o último o mais

aplicado para a detecção de alérgenos alimentares (POMS, KLEIN, ANKLAM; 2004; KOPPELMAN, HEFLE, 2006; MONACI et al., 2006).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida por imunoblote em membrana de nitrocelulose é um procedimento padrão para separação e identificação de proteínas/alérgenos (POMS, KLEIN, ANKLAM; 2004). A posição dos antígenos na membrana é uma reprodução fiel de sua posição no gel. Proteínas específicas podem ser detectadas por anticorpos capazes de reagir com proteínas solubilizadas por SDS, os anticorpos ligados são revelados com anticorpos antiimunoglobulina marcados com radioisótopos ou uma enzima (JANEWAY et al., 2002). O anticorpo IgE humano é o mais usado para identificar e caracterizar novos alérgenos alimentares no imunoblote, no entanto, uma vez que o alérgeno foi caracterizado, anticorpos produzidos em animais podem ser usados da mesma forma que o soro humano nestas análises de rotina (PASTORELLO e TRAMBAIOLI, 2001).

O modelo experimental mais utilizado em estudos da avaliação de componentes alergênicos em alimentos são os camundongos (ADEL-PATIENT et al. 2000; BERNARD et al. 2000). Gaudry et al. (2004) verificaram que a resposta de anticorpos das classes IgE e IgG para amendoim, camarão e castanha de caju em camundongos BALB/c apresentaram similaridade significativa aos encontrados em indivíduos alérgicos.

3.3 Estratégias para redução da antigenicidade das proteínas do soro de leite

Consideráveis esforços têm sido realizados para a diminuição da antigenicidade de produtos derivados do leite. Processos tais como tratamento térmico, hidrólise enzimática, alta pressão, fermentação, reação com açúcares redutores e irradiação têm sido utilizados para alterar o potencial alergênico de alimentos. (MAIER, et al., 2006; BYUM et al., 2002; MORGAN et al., 1998).

Kleber et al. (2004) observaram que temperaturas acima de 65 °C levam à diminuição da antigenicidade da β -Lg, por promover a agregação, com formação de ligações covalentes, como pontes dissulfeto, que podem esconder alguns epítomos,

diminuindo assim a sua antigenicidade. Por outro lado, Spiegel e Huss (2002) relataram aumento da antigenicidade com o prolongamento do tempo de aquecimento a 90 °C. A resposta antigênica diminuiu quando a temperatura de aquecimento excedeu 90 °C, devido ao aumento do tamanho das partículas e agregados que levou à menor exposição dos epítomos (Spiegel e Huss 2002). Kleber et. al. (2004) concluíram que a desnaturação pode levar tanto ao aumento como à diminuição da antigenicidade da β -Lg. O aumento é devido à maior exposição dos epítomos que estavam escondidos na estrutura terciária ou pela origem de novos antígenos em consequência de reações químicas e físicas ocorridas pela agregação, por outro lado, a desnaturação pode esconder epítomos da β -Lg, levando a uma diminuição da antigenicidade (Kleber et. al. 2004)

A hidrólise de proteínas é uma estratégia comumente empregada na redução da antigenicidade e prevenção à sensibilização por alguns produtos alimentícios (IAMETTI et. al. 2002; PAHUD et al., 1985). Kananen et al. (2000) mostraram que a hidrólise da fração precipitada da proteína do soro do leite com pepsina por 180 min e com a tripsina por 30 min resultou em peptídeos com MM < 5 kDa e antigenicidade foi quase totalmente eliminada.

Lakshman et al. (2011) estudaram o potencial de duas proteinases ácidas MpiAP1, MpiAP2. Hidrolisados do concentrado protéico do soro (CPS) foram preparados utilizando proteinases ácidas (MpiAP1, MpiAP2), pepsina e tripsina, isoladamente e em combinação a fim de diminuir a antigenicidade do concentrado protéico de soro de leite (CPS). As análises eletroforéticas do CPS mostraram que a digestão completa de todos os seus componentes ocorreu na presença das proteinases ácidas juntamente com a tripsina e, para essa condição de tratamento, foi encontrada redução da antigenicidade do CPS, avaliada por ELISA.

A especificidade enzimática é um fator importante na hidrólise, pois a posição de clivagem das ligações peptídicas resulta em fragmentos protéicos com diferentes sequências aminoácídicas. Esta especificidade influi na degradação dos epítomos responsáveis pelas reações imunológicas (VAN BERESTEIJN et al., 1994). A antigenicidade de hidrolisados depende também da massa molecular (MM) dos peptídeos presentes (VAN HOEYVELD et al., 1998). Otani e Hosono (1990) e

Nakamura, Sado e Syukunobe (1993) mostraram que peptídeos com MM abaixo de 3,5 kDa obtidos da hidrólise de caseína e proteínas do soro de leite não provocaram resposta alérgica mediada por IgE.

Peñas et al. (2005) observaram redução significativa da antigenicidade, avaliada por teste ELISA, de hidrolisados da β -Lg previamente ao tratamento com alta pressão, com tripsina e pepsina. Os autores reportaram que houve completa digestão da β -Lg quando previamente tratada a 200 MPa. Zhong et al. (2011) estudaram o efeito do tratamento de alta pressão em diferentes temperaturas na antigenicidade da β -Lg, e observaram, por teste ELISA, aumento considerável na resposta antigênica à proteína. Os autores sugeriram que a alta pressão induziu à mudanças na conformação β -Lg, resultando em melhor acessibilidade para os anticorpos.

A irradiação de alimentos também foi considerada um processo potencialmente viável para redução da alergenicidade dos componentes do leite. Byun et al. (2002) avaliaram que a aplicação de radiação gama levou à diminuição do reconhecimento da β -Lg pelo soro de pacientes alérgicos a essa proteína e que o reconhecimento da β -Lg pela IgE foi inversamente proporcional à dose de radiação, indicando alteração estrutural dos epítomos. Cho et al. (2010) observaram alterações na antigenicidade da β -Lg tratada com aplicação de radiação UV em diferentes tempos de exposição (4, 8, 16 e 32 h) da proteína. Os autores verificaram que houve aumento significativo na resposta de IgE para todos os tempos de exposição, exceto para 32 h, que não apresentou diferença significativa em relação a β -Lg nativa. Os autores observaram formação de agregados de alto massa molecular no tempo de exposição à radiação UV maior que 16 h.

A fermentação ácido-láctica por diferentes espécies de bactérias (mesofílicas e termofílicas) é outra técnica que tem sido utilizada visando a redução da alergenicidade das proteínas (JEDRYCHOWSKI e WROBLEWSKA, 1999). Estudos relatam que o uso de probióticos pode ser responsável pela redução dos sintomas em pacientes alérgicos, o que é considerado uma inovação na prevenção e terapia (VILJANEN et al., 2005).

A reação de Maillard também tem sido utilizada para a diminuição da antigenicidade de proteínas pela modificação dos epítomos, através da formação de conjugados de β -Lg com açúcares redutores como glicose, galactose, lactose e também oligossacarídeos (MORGAN et al., 1998). Hattori et al. (2004) relataram que diminuição da antigenicidade da β -Lg conjugada com oligossacarídeos, analisada por ELISA, deve-se ao mascaramento dos epítomos. Nodake et. al. (2011) observou, por teste ELISA, diminuição da antigenicidade da β -Lg conjugada com amilose.

A TG também pode reduzir o potencial antigênico das proteínas do soro do leite, por promover a formação de ligações cruzadas covalentes inter ou intramoleculares, podendo desta forma, ocultar regiões de epítomos (VILLAS- BOAS et al., 2010). Babiker et al. (1998) verificaram que a modificação das proteínas de soja pela reação com TG resultou no mascaramento de determinantes antigênicos e redução da antigenicidade, efeito também reportado por Watanabe et al. (1994) para as frações protéicas solúveis e insolúveis do trigo tratadas com a TG.

Wróblewska et al. (2008) obtiveram diminuição da antigenicidade de proteínas do soro do leite hidrolisadas com Alcalase e posteriormente polimerizados com TG. Wróblewska et al. (2010) observaram, por teste ELISA, diminuição da imunorreatividade de iogurte produzido com a adição de TG e fermentado nas temperaturas de 37 ou 42 °C. Fernandes (2009) concluiu que a polimerização com TG provocou mudanças estruturais que facilitaram a clivagem da β -Lg pelas enzimas digestivas, e geraram peptídeos com baixo potencial antigênico, comparados aos da proteína nativa, quando avaliada por Imunoblote.

3.4 Digestibilidade e antigenicidade de proteínas

A resistência à degradação proteolítica tem sido descrita como uma das características de diversas proteínas alergênicas (POULSEN, 2004). Asselin et al. (1989) destacaram a importância da pepsina e da secreção ácida do sistema digestório na desnaturação e/ou degradação das proteínas do soro do leite na redução da antigenicidade.

A β -Lg na forma nativa apresenta comportamento diferente das demais proteínas do soro quanto à susceptibilidade às enzimas gastrintestinais, sendo resistente à ação da pepsina em pH 2, condição na qual a enzima está com atividade máxima e a proteína está na forma monomérica (REDDY, KELLA e KINSELLA, 1988; KIM et al., 2007). A β -Lg contém em sua estrutura primária cerca de 50 ligações que são potenciais sítios de clivagem da pepsina, porém, grande parte destas ligações está localizada no centro hidrofóbico da molécula não sendo acessível à pepsina (NACER et al., 2004).

Astwood, Leach e Fuchs (1996) foram os primeiros a relacionarem a resistência à digestão, utilizando o fluído similar gástrico (FSG), ao potencial alergênico de proteínas. No estudo demonstrou-se que a β -Lg e outras proteínas consideradas antigênicas apresentaram fragmentos estáveis à digestão com FSG, que ao serem absorvidos poderiam causar reação alérgica. Por outro lado, proteínas consideradas não antigênicas eram totalmente digeridas. Os autores consideram a resistência à pepsina uma ferramenta preditiva para a avaliação do potencial antigênico de proteínas alimentares.

Entretanto, Fu Abbott e Hatzos (2002) demonstraram que apenas algumas dentre as proteínas alergênicas avaliadas eram resistentes à ação da pepsina. Posteriormente, foi avaliado que a suscetibilidade à digestão com pepsina de um mesmo alérgeno pode sofrer grande variação quando diferentes testes *in vitro* são comparados, devido às condições experimentais tais como: pH, relação pepsina e proteína, pureza da pepsina, e os métodos de detecção utilizados (MORENO, 2007).

Schnell e Herman (2009) relataram que os efeitos no processamento dos alimentos e as interações que ocorrem entre os componentes alimentares na matriz do alimento são possíveis causas para a baixa capacidade preditiva destes testes, pois essas interações podem deixar proteínas longe do contato com o suco gástrico, e impedi-las de serem digeridas pela pepsina. Desta forma, fatores a serem considerados incluem as ligações da protease com o substrato, pois podem ser maiores que as ligações encontradas *in vivo* e as interações de outros componentes dos alimentos com as proteínas, podem influenciar nos resultados obtidos *in vitro* (SCHNELL e HERMAN, 2009).

Maier et al. (2006) observaram que o processo de fermentação de produtos lácteos aumenta a suscetibilidade da β -Lg à digestão péptica, reduzindo a imunorreatividade da β -Lg, avaliada pelo método ELISA.

Yoshino et al. (2004) avaliaram a susceptibilidade da proteína da clara do ovo à digestão pela pepsina na faixa de pH de 1,5 - 4,0. Os autores observaram por SDS-PAGE que a ovoalbumina foi digerida pela pepsina em pH de 1,5 e 2,0, porém foi resistente à enzima em valores mais elevados (pH 4). A resistência à digestão enzimática em pH 4 pode causar reações alérgicas devido a absorção de fragmentos intactos de proteínas alergênicas que contenham epítomos, principalmente em crianças em que o pH do estômago é mais elevado. Martos et al. (2010) também estudaram a digestão gástrica da ovoalbumina em diferentes valores de pH (1,2; 2 e 3,2), tempos de digestão (30, 60 e 90 min). Os autores observaram que em valores de pH mais ácidos (1,2 e 2) e maior tempo de reação (90 min) a ovoalbumina foi totalmente digerida pela pepsina. Os autores observaram por teste ELISA que as amostras mais intensamente digeridas apresentaram diminuição da antigenicidade.

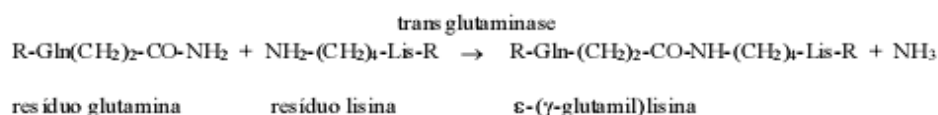
Sakai et al. (2000) observaram que a caseína bovina foi rapidamente degradada pela pepsina em pH entre 1,5 e 3,5 enquanto que em pH 4,0, foi lentamente degradada. Segundo os autores, esses resultados explicam o desenvolvimento da alergia ao leite bovino em crianças, cujo pH estomacal é mais elevado que o de um adulto e a secreção da pepsina é menor, assim as proteínas sofrem menor digestão podendo ocasionar reação alérgica.

3.5 Reações com transglutaminase

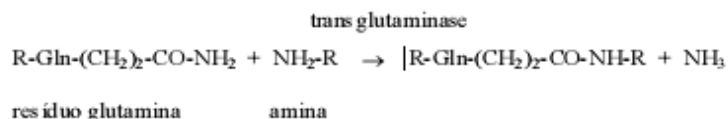
A TG foi identificada por Heinrich Waelsch há mais de 40 anos como uma enzima com a função de incorporar aminas em proteínas no fígado e na coagulação sanguínea (LORAND, 2002). Está presente naturalmente em plantas, micro-organismos, tecidos e fluídos corporais de animais. (FOLK e FINLAUSON, 1977) e catalisa reações de ligação ϵ -(γ -glutamina)lisil inter ou intramoleculares, incorporação de aminas e desaminação, apresentadas na Figura 2 (MOTOKI e SEGURO, 1998; SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001; JONG e KOPPELMAN,

2002; FORT et al., 2007 e HILLER e LORENZEN 2009). As reações catalisadas de acil transferência entre o grupo γ -carboxilamida de peptídeos ou glutamina ligada a peptídeos (doador de acil) e aminas primárias (receptores de acil), incluindo o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina em proteína, podem resultar na polimerização de proteínas.

Polimerização



Incorporação de aminas



Desaminação

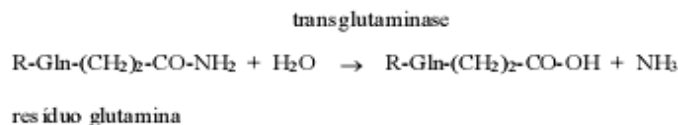


Figura 2. Reações catalisadas pela transglutaminase. Fonte: Sharma, Lorenzen e Qvist, 2001 (adaptado).

A TG é composta de 331 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica. A sua estrutura secundária consiste de oito folhas- β rodeadas por 11 α -hélices, além de apresentar um resíduo de cisteína com o grupo tiol livre, essencial para a atividade enzimática. A sua massa molecular é em torno de 38,0 kDa, seu ponto isoelétrico é 8,9, o pH ótimo da TG microbiana é na faixa de 5,0 a 8,0 e a temperatura ótima de atividade enzimática é em torno de 50 °C (KANAJI et al., 1993; MOTOKI e SEGURO, 1998).

As reações catalisadas pela TG podem modificar as propriedades de solubilidade, hidratação, gelificação, coagulação, estabilidade ao calor, e

propriedades reológicas de uma variedade de proteínas (DICKINSON, 1997; LORENZEN e SCHLIMME, 1998; MOTOKI e SEGURO, 1998; LORENZEN, 2000; BUCHERT et al., 2007; JAROS et al., 2006). Sanli et al. (2011) concluíram que o tratamento das proteínas do leite com TG é um método efetivo para melhorar as propriedades funcionais de iogurte. A adição de TG após a pasteurização do leite levou a um incremento na viscosidade, diminuição da sinerese e não apresentou qualquer efeito negativo na propriedade sensorial do produto final. Os autores sugeriram que a adição de TG seguida de pasteurização pode ser utilizada em produtos de leite com a finalidade de melhorar a sua qualidade. Rossa et al. (2011) observaram que a utilização de TG aumentou a viscosidade de sorvete pelo aumento da formação de ligações cruzadas induzidas pela TG, confirmada pela formação de polímeros por eletroforese em meio redutor.

Bönisch et al. (2007) relatam que as proteínas do soro do leite, em sua estrutura nativa, são de difícil acesso para TG, devido à sua estrutura globular estabilizada por pontes dissulfeto, que limitam a exposição dos aminoácidos glutamina e lisina para a formação de ligações cruzadas. Sharma, Zakora e Qvist (2002) apontam que a desnaturação de proteínas globulares é um passo importante para a reação de polimerização, por melhorar o acesso da TG aos resíduos de lisina e glutamina. O uso de agentes redutores como DDT, cisteína, glutathione, ácido ascórbico mostraram-se promissores no aumento da reatividade da TG por quebrarem pontes dissulfídicas, levando ao desdobramento das proteínas e resultando em uma exposição maior dos aminoácidos glutamina e lisina para a realização de ligações cruzadas pela TG (Figura 3) (JONG e KOPPELMAN, 2002; LEE et al., 2001; FORT et al., 2007; VILLAS-BOAS et al., 2010). As proteínas mais comumente modificadas pela TG são as provenientes do leite bovino (JAROS et al., 2010; GUYOT e KULOZIK, 2011) da soja (JOOS, KIM e LEE, 2011; BABIKER, 2000; JIANG e ZHAO, 2011) e do glúten (AGYARE et al., 2008, BELLIDO e HATCHER, 2011).

Wilcox e Swaisgood (2002) verificaram que o DTT aumenta a atividade da TG por manter o sítio ativo sulfidril da enzima no estado reduzido, levando a um aumento de 10-25% da atividade enzimática. Truong et al. (2004) observaram por

SDS-PAGE aumento da formação de polímeros nas proteínas do leite quando tratadas com TG na presença de DTT. Os autores indicam que o aumento pode ser devido à quebra de pontes dissulfeto da proteína, levando a sua desnaturação e tornando maior o acesso da enzima aos grupos NH_2 , para formação de pontes cruzadas e também pela manutenção do grupo sulfidríla, que está no sítio ativo da enzima na forma reduzida, aumentando assim a atividade da TG.

Bonisch, Lauber e Kulozik, (2007) também verificaram aumento da atividade da TG na presença do agente redutor glutathiona pela redução do seu sítio ativo.

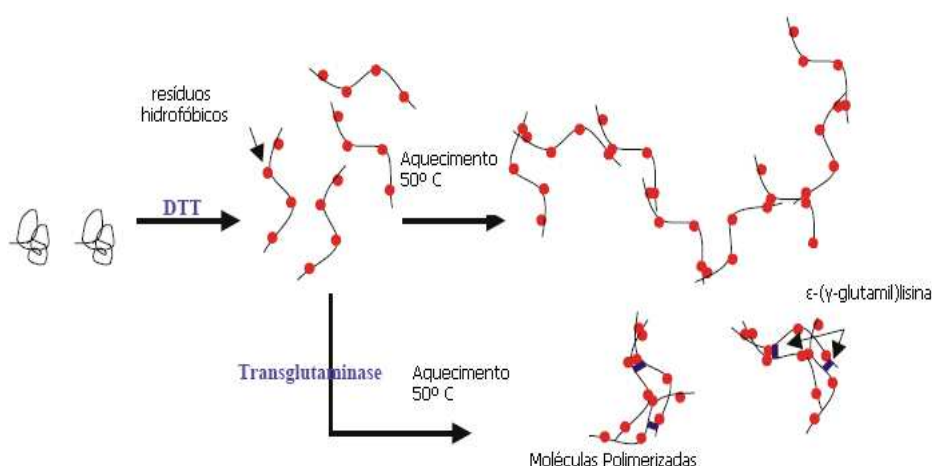


Figura 3. Possível mecanismo de ação catalisada pela transglutaminase após tratamento da proteína com agente redutor, na formação de estruturas protéicas mais compactas (adaptado de EISSA et al., 2006).

Motoki e Nio (1983) obtiveram maior polimerização da β -Lg, α_{s1} -caseína e k-caseína pela TG quando na presença de DDT, sendo que a β -Lg foi polimerizada parcialmente e as demais foram quase totalmente polimerizadas. Faergemand, Otte e Qvist (1997) observaram aumento de ligações cruzadas no isolado proteico do soro do leite tratado com TG na presença de DDT, sendo que a β -Lg e a α -La sofreram maior polimerização na presença do agente redutor.

Traoré e Meunier (1992) avaliaram o uso dos agentes redutores DDT e cisteína na polimerização da β -Lg, α -La e BSA induzida pela TG presente no plasma, placenta e plaquetas, e verificaram aumento na polimerização da β -Lg e α -

La na presença de ambos agentes redutores. Para a BSA, a Cys não aumentou a polimerização na mesma proporção que o DDT. Os autores sugeriram que o DTT pode ser substituído por Cys ou GSH na polimerização da β -Lg e α -La.

O DTT não pode ser utilizado na produção de alimentos, alternativas para aumentar a reatividade da β -Lg por outros mecanismos têm sido investigadas. Faergemand, Otte e Qvist (1997) também indicaram a Cys como possível substituto do DTT como agente redutor para propiciar a polimerização da β -Lg por TG.

Villas-Boas et al. (2010) avaliaram a polimerização da β -Lg nativa, tratada termicamente e também na presença de Cys. Os autores verificaram que a polimerização mais efetiva na presença da Cys, com formação de polímeros de maior massa molar, quando comparadas às amostras de β -Lg nativa e tratada termicamente.

Miwa et al. (2002) conduziram experimento com leite cru (3,1% proteína, 3,6% de gordura) tratado com TG (2 U g⁻¹ proteína, 40 °C, 3 h) na presença de GSH na faixa de 0,0 a 0,2 mmol/L. Os autores relataram aumento na formação de compostos de alta massa molecular na presença de GSH em concentrações em torno de 0,02 mmol/L, sendo que houve diminuição significativa das frações de caseína, demonstrada por SDS-PAGE. Bonisch, Lauber e Kulozik (2007) avaliaram o efeito da GSH sobre a reação de polimerização da caseína micelar e caseinato de sódio catalisada pela TG, suspensos em soro do leite com uma concentração final de proteína de 3%. Os autores demonstraram que a GSH, em concentrações entre 0,05 e 0,1 mmol/L, é capaz de aumentar a polimerização da caseína micelar em 20-30%, porém para o caseinato de sódio não houve alterações.

A GSH possui dois grupos carboxílicos, um grupo amino livre e um grupo SH. O grupo SH pode ser facilmente e reversivelmente oxidado formando pontes dissulfeto (S-S), levando à produção de glutathiona oxidada (GSSG) e de proteína ligada à glutathiona (PSSG) (Figura 5) (JOYE, LAGRAN e DELCOUR, 2009). Está presente em quase todos os organismos, sendo um importante antioxidante, protegendo células contra radicais livres, peróxidos, lesões mediadas por xenobióticos e protegendo o grupo tiol de proteínas intracelulares (MEISTER e TATE, 1976;

SHIGEOKA, et al., 1985). Além destas, a GSH participa de muitas outras funções celulares, como a modulação da proliferação celular e da resposta imune, armazenamento e transporte de Cys, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma ativa das enzimas (PAOLICCHI et al., 2002). A importância biológica da GSH esta relacionada ao potencial redox dos grupos sulfidrilas livres dos resíduos de cisteína (PENNINCKX, 1999). A presença de GSH parece melhorar o intercambio de reações tiol-dissulfeto resultando em modificações estruturais de proteínas (DONG e HOSENEY, 1995; MIWA et al. 2002).

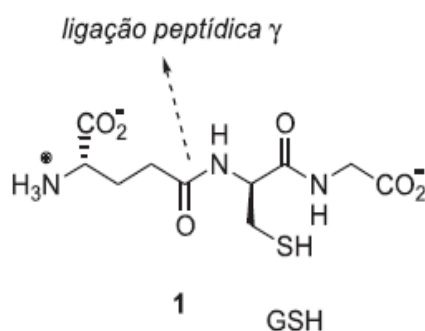


Figura 4. Glutathione γ-glutamilcisteinaglicina Fonte: (Huber e Almeida, 2008).

Sootawat, Chutiman e Wonnop (2005) avaliaram o efeito de diferentes agentes redutores (Cys, AA e bissulfeto de sódio) nas propriedades físico-químicas e formação de surimi. Os autores observaram que as amostras adicionadas de agentes redutores apresentavam géis mais firmes devido ao aumento da polimerização induzida pela TG endógena. Jiang, Lan e Tsao (1986) também reportaram que a utilização de ácido ascórbico na miosina de peixe congelado aumentou a reação catalisada pela TG endógena aumentando a polimerização, obtendo géis mais firmes.

O AA apresenta grande importância para sistemas bioquímicos, farmacológicos, eletroquímicos, processamento de alimentos, sendo suas propriedades redox uma das características químicas de maior interesse (FORNARO e COICHEV, 1997). O AA possui a estrutura de um diol que é oxidado formando o ácido *L*-deidroascórbico (A_{ox}) (Figura 6).

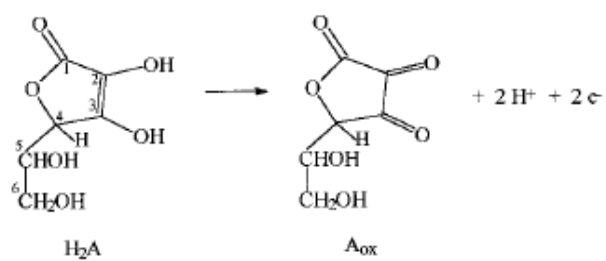


Figura 5. Oxidação do ácido *L*-ascórbico (H_2A) a ácido *L*-deidroascórbico (A_{ox}) (FORNARO e COICHEV, 1997).

4. Material e Métodos

4.1 Material

Foi utilizada β -Lg (variantes A e B, ~ 95% de proteína) doada pela Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, MN, EUA), e a enzima TG (Activa WM) doada pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda produzida por micro-organismos (Ca^{2+} independente), atividade na faixa de pH de 5,0 a 8,0; temperatura ótima de reação de 50 a 55 °C e atividade declarada de 100U/g de produto, segundo informações da indústria. Os agentes redutores utilizados foram a GSH, com pureza maior que 90% (forma reduzida) e AA ambos adquiridos da Sigma – Aldrich (Steinheim, Alemanha). A pepsina utilizada foi a de mucosa de estômago de suíno (2500 – 3500 U mg⁻¹, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

Para o ensaio biológico, foram utilizados camundongos BALB/c, provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica). Para os ensaios imunoquímicos, foram utilizados anticorpos de rato anti-IgE de camundongo e anticorpo de coelho anti-rato conjugado com enzima peroxidase (Sigma – Aldrich). Os demais reagentes utilizados para as análises foram de grau analítico.

A Figura 6 ilustra o fluxograma geral do experimento. A β -Lg foi submetida à ação da TG na presença dos agentes redutores GSH e AA. As amostras foram caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE para as amostras polimerizadas e SDS-PAGE/tricina para as amostras digeridas, posteriormente as amostras foram avaliadas quanto à antigenicidade da proteína, através de ensaios biológico e imunoquímicos.

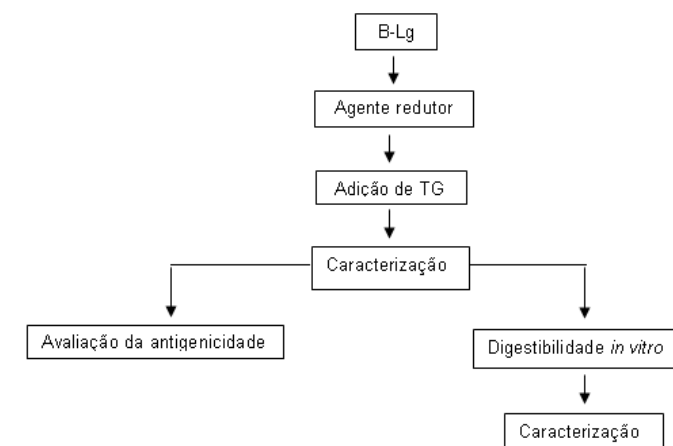


Figura 6. Fluxograma geral do experimento

4.2 Obtenção e Caracterização da β -Lg polimerizada

4.2.1 Planejamento Experimental

Para o estudo da polimerização da β -Lg em condições redutoras, foram realizados experimentos fatoriais 2^2 , nos quais as variáveis independentes foram a relação enzima:substrato (E/S) (0 – 51,6 U TG /g de proteína (U g^{-1})) e concentração dos agentes redutores, [GSH] (0 - 0,67 mmol/L) ou [AA] (0- 0,02 mol/L) e as variáveis dependentes foram grau de polimerização e concentração de IgE. Para cada um dos agentes redutores, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), com pontos centrais (nível 0) e pontos axiais ($\alpha \pm 1,41$), totalizando 11 ensaios. As condições de ensaio são descritas nas Tabelas 1 e 2.

Em todos os ensaios a reação com TG foi conduzida na temperatura para ação da enzima, 50 °C, por 180 min. (EISSA et al., 2006) em banho termostatzado, pH 6 e interrompida por aquecimento das amostras a 80 °C por 2 min, seguido de resfriamento em banho de água gelada (BONISCH, LAUBER e KULOZIK, 2007). A polimerização das amostras foi avaliada pelo grau de polimerização (GP) e pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), descritos nos itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2, respectivamente.

Tabela 1. Ensaios para o planejamento experimental, variando os parâmetros relação enzima:substrato e concentração de glutathiona ([GSH]).

Variáveis Independentes				
Real			Codificado	
	E/S (U TG/g proteína)	[GSH] (mmol/L)	E/S	[GSH]
1	7,5	0,1	-1	-1
2	44,1	0,1	1	-1
3	7,5	0,58	-1	1
4	44,1	0,58	1	1
5	0	0,34	-1,41	0
6	51,6	0,34	1,41	0
7	25,8	0	0	-1,41
8	25,8	0,67	0	1,41
9	25,8	0,34	0	0
10	25,8	0,34	0	0
11	25,8	0,34	0	0

[GSH] concentração de glutathiona.

Tabela 2. Ensaios para o planejamento experimental variando os parâmetros relação enzima:substrato e concentração de ácido ascórbico ([AA]).

Variáveis Independentes				
Real			Codificado	
	E/S (U TG/g proteína)	[AA] (mol/L)	E/S	[AA]
1	7,5	0,003	-1	-1
2	44,1	0,003	1	-1
3	7,5	0,017	-1	1
4	44,1	0,017	1	1
5	0	0,01	-1,41	0
6	51,6	0,01	1,41	0
7	25,8	0	0	1,41
8	25,8	0,02	0	1,41
9	25,8	0,01	0	0
10	25,8	0,01	0	0
11	25,8	0,01	0	0

[AA] concentração de ácido ascórbico

O teor protéico total das amostras foi determinado pelo método de semi micro- Kjeldhal (AOAC, 1995), com fator de conversão de 6,38 para a β -Lg.

4.3 Avaliação da polimerização

4.3.1 Determinação de lisinas livres

A concentração de lisinas livres foi determinada pelo método de Kakade e Liener (1969). O método consiste na medida espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação entre ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e os grupos ϵ -amino da lisina. Os grupos α -amino são extraídos com éter etílico para não interferir no resultado da análise. As amostras polimerizadas com TG na presença de GSH ou AA (10 mg) foram dissolvidas em 30 mL de 4% NaHCO_3 durante 10 min, posteriormente filtradas em lã de vidro, coletadas em balão volumétrico de 50mL e aferido o volume com solução de 4% NaHCO_3 . Foi coletado 1 mL de solução para cada amostra (triplicata) em tubos de polipropileno de 10 mL. Para cada tubo foi acrescentado 1 mL de solução com TNBS, 0,1% em água destilada e reagido por 120 min., a 40 °C no escuro, com agitação a cada 30 min. Posteriormente foi adicionado 6mL de 8 N HCl e a mistura de reação foi posteriormente autoclavada a 120 °C por 60 min. Após esfriar, a mistura foi transferida quantitativamente (lavando o tubo 2 vezes com 1 mL de água destilada) para um tubo rosqueável e nele foi adicionado 10 mL de éter etílico e a mistura agitada, para a extração dos subprodutos amarelos, a fase etérea foi descartada, a extração foi realizada 2 vezes, o resíduo de éter foram eliminados em banho Maria (80 °C). A absorbância da solução foi determinada a 346 nm. A concentração de lisina livre foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Lys (g Lys/100 g proteína)} = A \times F / Ma * Pa \text{ (equação 1)}$$

Onde: A = Absorbância; Ma= massa da amostras (g); Pa = teor de proteína (%) da amostra, F = fator de Lisina que é igual a 40,54.

A partir destes resultados calculou-se o nº de equivalentes de lisina/ 100 g de proteína pela equação:

$$\text{(Equivalente Lys/100 g proteína)} = (\text{g Lys /100 g proteína})/146,18 \text{ (equação 2)}$$

Onde: 146,18 g = mol de lisina

4.3.2 Grau de polimerização:

O grau de polimerização (GP) das amostras foi determinado pela equação:

$$GP (\%) = \frac{(\text{Eq Lys}/100 \text{ g } \beta\text{-Lg no estado nativo} - \text{Eq Lys}/100 \text{ g } \beta\text{-Lg modificada com adição de TG e agente redutor})}{\text{Eq Lys}/100 \text{ g } \beta\text{-Lg no estado nativo}} \times 100 \text{ (equação 3)}.$$

4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A determinação dos perfis eletroforéticos das proteínas antes e após a polimerização com a TG foi realizada em sistema SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), em cuba vertical (Mini Protein II System, BioRad Laboratories, CA, EUA) e espaçadores de 1 mm, com gel de separação com 12% acrilamida e gel de empilhamento com 4% acrilamida. As amostras foram preparadas em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições redutoras com 5% β -mercaptoetanol, e aquecidas a 96 °C/10 min para melhor solubilização do material. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250. Foram utilizados kits de marcadores de peso molecular entre 14,4 a 97,4 kDa (Amersham, Uppsala, Suécia).

4.4 Digestão gástrica *in vitro*

A digestão gástrica foi realizada conforme descrito por Martos et al. (2010). As amostras de β -Lg polimerizadas com TG na presença de GSH ou AA (5 mg proteína/mL) foram dispersas em fluído similar ao gástrico (FSG; (35 mM NaCl; pH 2), pré aquecido por 15 min a 37 °C. Adicionou-se pepsina (182 U/mg proteína) e a digestão foi conduzida por 60 min. A reação foi interrompida com a adição de 1 M NaHCO_3 até o pH da solução atingir 7.

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

O perfil eletroforético das amostras digeridas foi determinado em sistema SDS-PAGE/Tricina (SCHAGGER e VON JOGOW, 1987) em cuba vertical (Mini Protein II System, BioRad Laboratories) e espaçadores de 1 mm. Utilizou-se um

sistema descontínuo composto de gel de separação, gel espaçador e gel de empilhamento com 15,5, 10 e 4% acrilamida, respectivamente. Os digeridos foram diluídos em tampão redutor (0,0625 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 2% SDS, 20% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,01% Coomassie Blue G-250 pH 6,8), aquecidos a 95 °C/10 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 µL da solução da cada digerido, contendo 2 % de proteína, com exceção das amostras β-Lg N, que continham 0,4% de proteína. Após as corridas, os géis foram mantidos por 12 h em solução fixadora metanol/ácido acético/água (4:1:5) e corados por 48 h em solução de 0,025% Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich) em 10% de ácido acético. Posteriormente os géis foram descorados em solução de 10% ácido acético.

A massa molecular dos peptídeos foi estimada utilizando padrão (Sigma-Aldrich) contendo as seguintes frações protéicas: anidrase carbônica, soja, lisozima, aprotinina e insulina, com peso molecular entre 3,2 e 31,5 kDa.

4.5 Avaliação da atividade da TG na presença dos agentes redutores

Para avaliação do efeito dos agentes redutores, a atividade da TG foi determinada segundo Folk e Cole (1966), com adaptações descritas por Macedo et. al (2007). À solução de β-Lg (7% m/v) com GSH (0,1 ou 0,67 mmol/L) ou AA (0,0029 ou 0,01 mol/L) foi adicionada a TG (7,5 ou 25,8 U TG/g proteína). Alíquotas (1 mL) foram centrifugadas e a atividade enzimática foi determinada no sobrenadante pelo procedimento colorimétrico com hidroxamato. A mistura de reação, contendo 200 µL de enzima, 200 µL de tampão citrato 0.2 M pH 6.0, 25 µL de hidroxilamina, e 75 µL de 0,1 M N-carbo-benzoxo-L-glicina, foi incubada a 37 °C por 60 min e em seguida a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de 15% ácido tricloroacético (TCA) contendo 5% FeCl₃. A absorbância foi medida a 525 nm (Beckman Coulter DU 640). Uma unidade de atividade da TG foi definida como a quantidade de enzima que causa a formação de um µmol de ácido hidroxâmico por 60 min a 37 °C. A curva de calibração foi preparada com ácido L-glutâmico ácido monohidroxamato.

4.6 Ensaios biológico e imunoquímico

A antigenicidade da β -Lg polimerizada na presença de GSH ou AA foi avaliada frente aos soros de animais sensibilizados com β -Lg nativa (β -Lg N), assim como os seus produtos da simulação da digestão com pepsina.

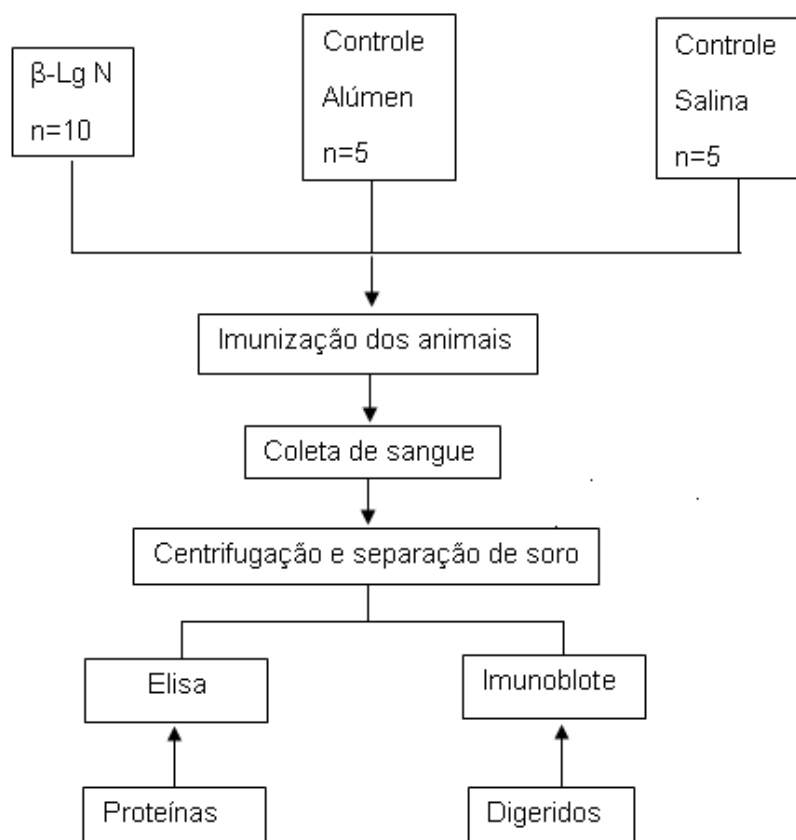


Figura 7. Fluxograma dos ensaios biológicos e imunoquímicos.

4.6.1 Fase de sensibilização

Foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c obtidos do CEMIB da Unicamp, com 4 semanas de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições livre de patógenos (SPF) no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – FCM, da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, com controle da umidade e temperatura, recebendo água e ração autoclavada *ad libitum* (padrão- Nuvilab CR1, registrada no Ministério da Agricultura, PR 4453 00118, Indústria Brasileira) isenta de β -Lg.

A etapa de imunização dos animais foi realizada segundo o descrito por Villas Boas (2008). Os animais receberam por via intraperitoneal (ip) e subcutânea (sc) um total de 50 μ g de amostra suspensa em solução contendo adjuvante 3% $\text{Al}(\text{OH})_3$ (álumen). O grupo 1 recebeu β -Lg nativa, o grupo 2 solução 3% $\text{Al}(\text{OH})_3$ e o grupo 3 (controle) solução salina (0,9% NaCl) estéril com volume total de 200 μ L por animal.

No 14º e 21º dias após a sensibilização inicial, os animais receberam dose de reforço, por via intraperitoneal (20 μ g e 50 μ g de cada amostra, respectivamente) em 200 μ L de solução fisiológica estéril no 14º dia e em 3% $\text{Al}(\text{OH})_3$ no 21º dia.

Após 30 dias da sensibilização inicial, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 200 μ L de tiopental sódico 2.5% (Cristália, SP, Brasil) para realização da punção cardíaca e coleta de sangue. Depois de retirado, o sangue foi centrifugado para obtenção do soro.

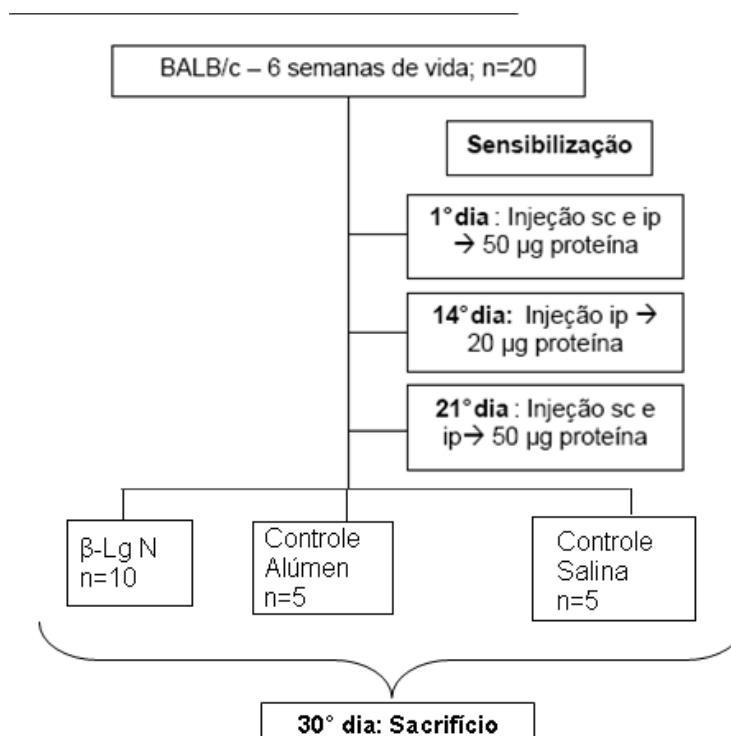


Figura 8. Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais.

4.6.2 Ensaio imunológico: ELISA

A análise dos níveis séricos de imunoglobulinas foi realizada segundo Brito (2006) com modificações. Placas de polietileno contendo 96 poços foram adsorvidas com 100 µL de β-Lg na sua forma nativa ou β-Lg nas formas polimerizadas e incubadas por 16 horas à 4 °C em câmara úmida.

As placas foram lavadas em 3 ciclos de 10 min cada, com solução 0,05% Tween 20 (Merck, Darmstald, Alemanha) em solução salina fosfatada tamponada 0,1 M pH 7,4. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, utilizou-se solução de soro bovino fetal 5% em PBS por 2 h em temperatura ambiente. Após as lavagens, 100 µL de cada amostra de soro, correspondente a cada animal imunizado, previamente diluída (1:500) em solução 1% soro bovino fetal e solução salina fosfatada (PBS) foram adicionadas. Os poços destinados à realização da curva padrão foram adsorvidos com IgE (Purified Mouse IgE) com concentração inicial de 12800 ng/mL,

seguida por diluições seriadas (1:2) em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) até a concentração de 25 ng/mL.

Após incubação de 16 h, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL de anticorpo (purified Anti-Mouse IgE Whole molecule; BD Biosciences San Diego, CA, EUA) diluído 1:500 em solução de soro bovino fetal 1% e PBS, mantidas em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Após as lavagens, adicionou-se 100 µL de anticorpo conjugado com peroxidase (Anti-Rat IgG Whole molecule) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na diluição de 1:60000 em PBS e 1% soro bovino fetal. Após incubação de 1 h, as placas foram lavadas novamente, seguindo-se a adição de tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences San Diego, CA, EUA).

A reação foi bloqueada após 30 min, com 1 N H₂SO₄. Os valores de absorbância foram medidos a 450 nm, em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, Toronto, Canadá). Os cálculos foram realizados por meio de programa Computacional SOFTmax PRO 3.0 (Molecular Devices, Toronto, Canadá).

4.7 Análise Estatística

Para análise estatística da otimização do GP e da resposta IgE para β-Lg polimerizada com TG na presença dos agentes redutores GSH ou AA através na Metodologia de Superfície de Resposta, foi utilizado o software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, EUA), com pós-teste por análise de variância (ANOVA), e foi verificado se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais.

Para análise estatística do teste ELISA foi utilizado o programa computacional Sigma versão 3.05, (Systat Software Inc.(SSI), San Jose, California EUA). Os valores encontrados foram expressos em média com ± desvio padrão, utilizando-se teste paramétrico T-student bicaudal. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados e Discussão

A β -Lg apresentou $87,0 \pm 0,72\%$ de proteína. Este valor foi utilizado como referência para os cálculos da relação E:S na etapa de polimerização.

O perfil eletroforético obtido em sistema SDS-PAGE em meio redutor da β -Lg nativa estão apresentados na Figura 9. Na eletroforese SDS-PAGE (Figura 9), observou-se uma única banda correspondente ao monômero da β -Lg, de massa molar $\sim 18,4$ kDa.

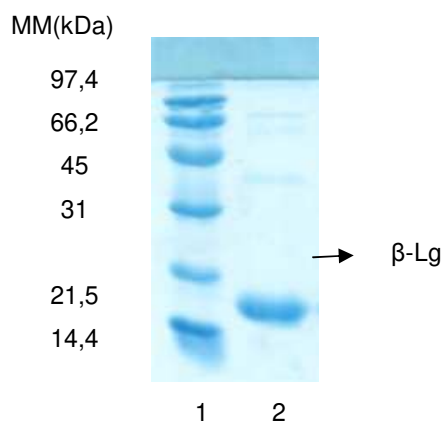


Figura 9. Perfil da β -Lg nativa em SDS-PAGE (1): padrão massa molecular (14,4 - 97,4 kDa), (2): β -Lg nativa.

O perfil eletroforético da TG (Figura 10) apresentou uma única banda na região de ~ 40 kDa. Resultado semelhante ao obtido por Kanaji et al. (1993).

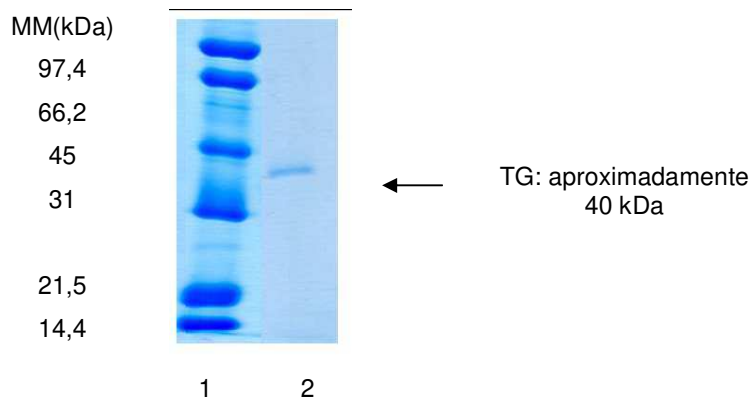


Figura 10. Perfil eletroforético da transglutaminase, em SDS-PAGE. (1): padrão massa molecular (14,4 - 97,4 kDa), (2): enzima TG.

5.1 Polimerização da β -Lg

5.1.1 Influência dos agentes redutores na polimerização da β -Lg

Os valores de grau de polimerização (GP) da β -Lg tratada com TG na presença de GSH variaram de 1,1% a 52,5%, conforme as condições utilizadas no processo de polimerização (Tabela 3). Os pontos centrais apresentaram um coeficiente de variação de 3,5%, indicando boa reprodutibilidade do processo.

Tabela 3. Resultados experimentais do grau de polimerização (GP) de acordo com o planejamento experimental para a glutathiona (GSH) como agente redutor.

Variáveis Independentes					
Real			Codificado	Resposta	
	E/S (U TG/g proteína)	[GSH] (mmol/L)	E/S	[GSH]	GP (%) ¹
1	7,5	0,1	-1	-1	31,9 ± 0,5
2	44,1	0,1	1	-1	29,4 ± 0,1
3	7,5	0,58	-1	1	13,4 ± 0,2
4	44,1	0,58	1	1	52,5 ± 0,5
5	0	0,34	-1,41	0	1,1 ± 0,2
6	51,6	0,34	1,41	0	40,5 ± 0,5
7	25,8	0	0	-1,41	4,3 ± 0,5
8	25,8	0,67	0	1,41	12,2 ± 0,5
9	25,8	0,34	0	0	4,1 ± 1,0
10	25,8	0,34	0	0	4,4 ± 0,8
11	25,8	0,34	0	0	4,2 ± 0,9

¹Os valores de GP (%) são médias de 3 determinações da mesma amostra [GSH] concentração de glutathiona

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre o GP estão apresentados na Tabela 4, onde os valores em negrito são significativos a 90% de confiança. Observa-se efeito positivo dos fatores E/S (L), E/S (Q) sobre o parâmetro GP, ou seja, um aumento destes elevou os valores de GP. Observa-se também que os fatores [GSH] (L), [GSH] (Q) e a interação E/S X [GSH] foram considerados não estatisticamente significativos ($P > 0,1$).

Tabela 4. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para a resposta grau de polimerização (GP) do experimento utilizando a glutatona (GSH) como agente redutor.

	Efeito	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	4,2	4,7	0,7	0,41
E/S (L)	31	6,6	4,6	0,009
E/S (Q)	21,3	7,1	3	0,039
GSH (L)	11,8	6,7	1,7	0,1
GSH (Q)	8,7	7,1	1,2	0,3
E/S X GSH	5	10,5	0,4	0,7

Após eliminação dos fatores não significativos, verificou-se a significância da regressão ao nível de confiança 90% através de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste-F (Tabela 5). A razão do F calculado/F tabelado é superior a 1, indicando que a regressão é estatisticamente significativa, sendo então adequado avaliar a tendência através da superfície de resposta.

O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,76 para o GP, indicando que o modelo explica 76% da variação dos dados. Devido ao baixo R^2 ($<0,90$), os fatores não significativos foram mantidos. Sendo assim, o modelo codificado ajustado para o parâmetro GP é dado por:

$$GP (\%) = 4,2 + 31 \cdot E/S + 21,3 \cdot E/S^2 + 11,8 \cdot [GSH] + 8,7 \cdot [GSH]^2 + 5 \cdot E/S \cdot [GSH]$$

(equação 4)

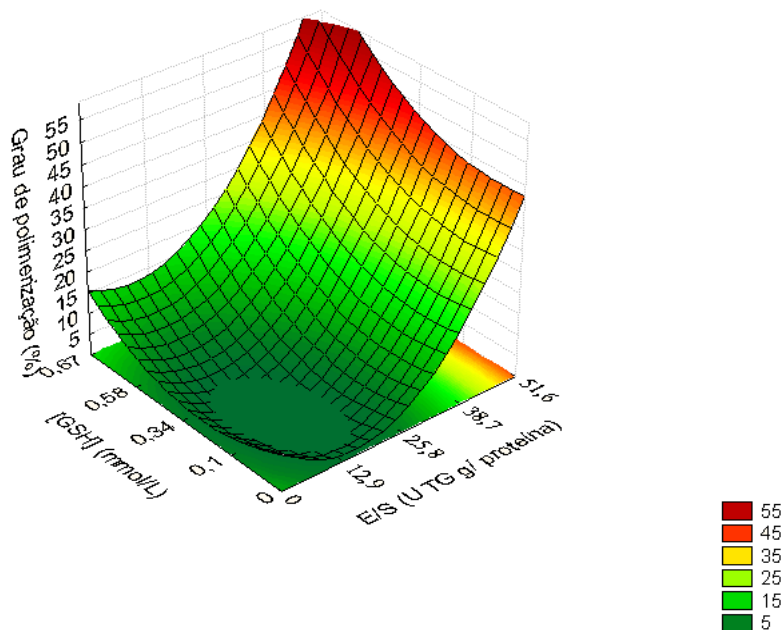
onde: GP é o grau de polimerização, E/S é a relação enzima: substrato, [GSH] é a concentração de glutatona.

Tabela 5. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta grau de polimerização (GP) do experimento utilizando a glutathione (GSH) como agente redutor.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Regressão	2226,3	4	556,7	4,93	3,18
Resíduos	676,4	6	112,7		
Total	2903,3	10	290,3		
R^2	0,76				

A influência das variáveis independentes sobre a resposta grau de polimerização (GP) do experimento utilizando glutathione (GSH) como agente redutor está apresentada nos gráficos de superfície de resposta e curvas de níveis (Figura 11). A superfície de resposta e a curvas de níveis indicam que o maior valor de GP foi observado para [GSH] e E/S em torno de $+ \alpha$ (0,67 mmol/L e 51,6 U g⁻¹, respectivamente). Estes resultados sugerem que houve desnaturação da proteína pela maior [GSH], possibilitando o melhor acesso da TG aos aminoácidos glutamina e lisina e/ou a maior concentração de TG possibilitou um aumento das ligações cruzadas. Miwa et al. (2002) também observaram que a presença de GSH permitiu a maior polimerização realizada pela TG na estrutura da caseína micelar.

a-)



b-)

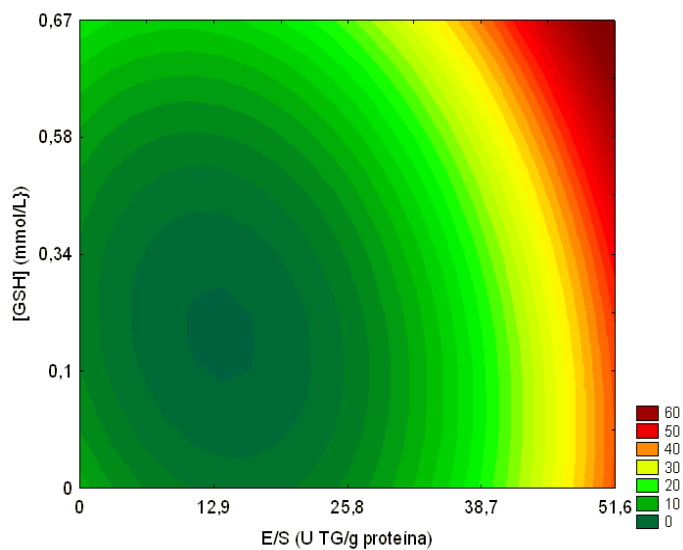


Figura 11 (a). Superfície de resposta e **(b).** Curvas de níveis para o grau de polimerização (%) em função da relação enzima:substrato (U TG g^{-1}) e concentração de GSH (mmol/L) para a resposta GP (grau de polimerização).

Para o experimento utilizando o AA como agente redutor, os valores de GP variaram entre 2,7% e 41,5% (Tabela 6). Os pontos centrais apresentaram coeficiente de variação de 5,2%, indicando boa reprodutibilidade do processo.

Tabela 6. Resultados experimentais do grau de polimerização (GP) de acordo com o planejamento experimental para ácido ascórbico (AA) como agente redutor.

Variáveis Independentes					
Real	E/S (U TG/g proteína)	[AA] (mol/L)	Codificado E/S	[AA]	Resposta GP (%) ¹
1	7,5	0,003	-1	-1	18,9± 0,6
2	44,1	0,003	1	-1	18,8± 0,7
3	7,5	0,017	-1	1	29,9± 0,4
4	44,1	0,017	1	1	16,5± 0,2
5	0	0,01	-1,41	0	5,5± 0,9
6	51,6	0,01	1,41	0	2,7± 0,2
7	25,8	0	0	-1,41	4,3± 0,6
8	25,8	0,02	0	1,41	41,5 ± 0,6
9	25,8	0,01	0	0	31,0± 0,5
10	25,8	0,01	0	0	34,0± 0,6
11	25,8	0,01	0	0	31,0± 0,2

¹Os valores de GP (%) são médias de 3 determinações da mesma amostra. [AA] concentração de ácido ascórbico

Avaliando a resposta GP (Tabela 7), observa-se que o fator E/S (Q) tem efeito negativo e o fator [AA] (L) tem efeito positivo no GP. Os fatores E/S (L), [AA] (Q) e a interação E/S X [AA] foram considerados não estatisticamente significativos na resposta grau de polimerização, ao nível de confiança 90%.

Tabela 7. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para a resposta grau de polimerização (GP) do experimento utilizando ácido ascórbico (AA) como agente redutor.

	Efeito	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	32	5	6,4	0,001376
E/S (L)	-4,3	6,1	-0,7	0,505842
E/S (Q)	-24,2	7,3	-3,3	0,021141
AA (L)	15,2	6,1	2,4	0,055028
AA (Q)	-5,3	7,3	-0,7	0,498285
E/S X AA	-6,6	8,6	-0,7	0,47601

Verificou-se a significância da regressão ao nível de confiança 90% através de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste-F (Tabela 8). A razão do F calculado/F tabelado é superior a 1, indicando que a regressão é estatisticamente significativa, sendo adequado avaliar a tendência através da superfície de resposta.

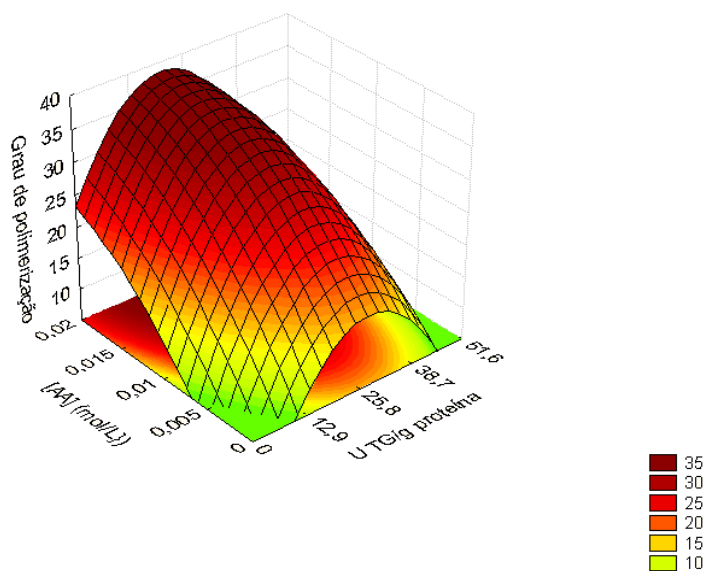
O R^2 para o modelo ajustado foi de 0,78 para o GP (Tabela 8), indicando que o modelo explica 78% da variação dos dados observados. Devido ao baixo R^2 ($<0,90$), os fatores não significativos foram mantidos. O modelo codificado ajustado para o parâmetro GP é dado por:

$GP (\%) = 32 - 4,3 \cdot E/S - 24,2 \cdot E/S^2 + 15,2 \cdot [AA] - 5,3 \cdot [AA]^2 - 6,6 \cdot E/S \cdot [AA]$ (equação 5)
 onde: GP é o grau de polimerização, E/S é a relação enzima:substrato, [AA] é concentração de ácido ascórbico. Tabela 8. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta grau de polimerização (GP) do experimento utilizando ácido ascórbico (AA) como agente redutor.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Regressão	1379,9	4	344,9		
Resíduos	375,7	6	62,6	5,5	3,18
Total	1755,6	10	175,5		
R^2	0,78				

A influência das variáveis independentes sobre a resposta grau de polimerização (GP) para o experimento utilizando ácido ascórbico (AA) como agente redutor está apresentada nos gráficos de superfície de resposta e curvas de níveis Figura 12.

a-)



b-)

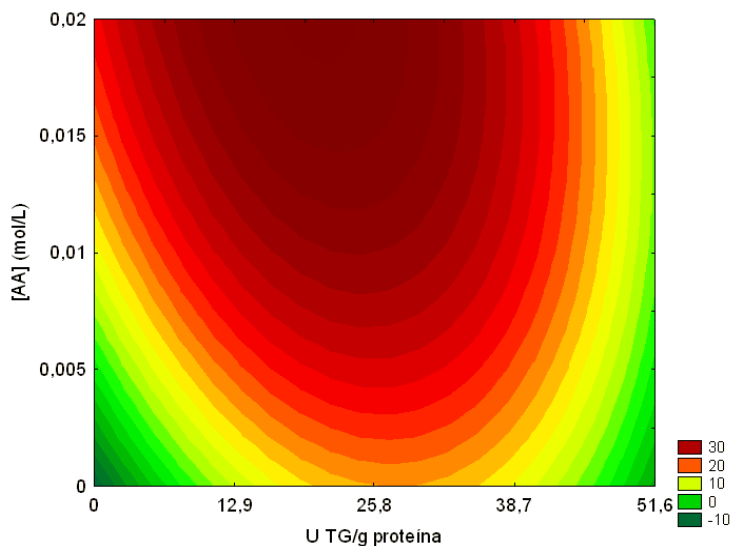


Figura 12 (a). Superfície de resposta e **(b).** Curvas de níveis para o grau de polimerização (%) em função da relação enzima:substrato (E/S; U TG g⁻¹) e concentração de ácido ascórbico (AA; mol/L) para a resposta GP (grau de polimerização).

A superfície de resposta e as curvas de níveis indicam que o maior GP foi observado para [AA] acima do ponto central e E/S em torno do ponto central ($>0,2$ mol/L e $25,8 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente). A maior [AA] pode ter favorecido a clivagem de pontes dissulfeto e desdobramento da proteína, resultando em maior polimerização pela TG. Soottawat, Chutiman e Wonnop (2005) relataram aumento da polimerização da TG endógena no processo de formação de surimi quando adicionado de agentes redutores como AA.

Para ambos os agentes redutores maiores concentrações resultaram em maior polimerização. Em relação à interação E/S e concentração dos agentes redutores, os experimentos com GSH mostraram que o maior GP foi obtido para valores em torno de $+\alpha$. Resultado diferente foi encontrado para o experimento com AA. Elevada [AA] ($0,02 \text{ mol/L}$) quando associada à elevada E/S ($51,6 \text{ U g}^{-1}$) levou a valores de GP menores. Estes resultados podem ter algumas explicações. A alta [AA] pode ter afetado a atividade da TG que possui no sítio ativo um grupamento SH, impedindo reações de polimerização. Pode também ter ocorrido reação de Maillard pela presença de ácido ascórbico, indisponibilizando o grupamento lisina para a reação com a TG (OBRETENOV et al., 2002, ROGACHEVA et al., 1999).

5.1.2 Caracterização eletroforética da β -Lg polimerizada com TG na presença dos agentes redutores.

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE) da β -Lg polimerizada pela TG na presença de GSH, nas condições do planejamento experimental, são mostrados na Figura 13. Os perfis apresentaram bandas localizadas no início do gel de separação e bandas que não conseguiram penetrar no gel, o que indica a formação de polímeros de alta massa molar ($MM > 97,4 \text{ kDa}$). Na condição do ensaio 5 ($0,34 \text{ mmol/L}$ GSH, que não continha TG) não foi observada a formação de polímeros, indicando que apenas a presença de GSH não levou à alteração do perfil eletroforético. Miwa et al. (2002) relataram formação de compostos de alta massa molecular quando conduziram experimento com leite cru tratado com TG na presença da GSH. Bonisch, Lauber e Kulozik (2007) observaram aumento em 20-30% da polimerização da caseína micelar com a TG na presença de GSH.

Quando o AA foi utilizado como agente redutor, todas as amostras apresentaram formação de polímeros de alta MM (Figura 14) exceto a condição do ensaio 2 (44,1 U g⁻¹ e 0,003 mol/L de AA) e ensaio 5 (0,01 mol/L AA, que não continha TG). Estes ensaios não apresentaram formação de polímeros, mesmo nas condições do ensaio 2, que continha a TG. Jiang Lan e Tsao (1986) relataram que a utilização de AA para obtenção de surimi aumentou a reação catalisada pela TG endógena, aumentando a polimerização, obtendo-se desta forma géis mais firmes. Miwa et al. (2002) também relataram aumento na formação de compostos de alta MM quando conduziram experimento com leite cru tratado com TG na presença da AA.

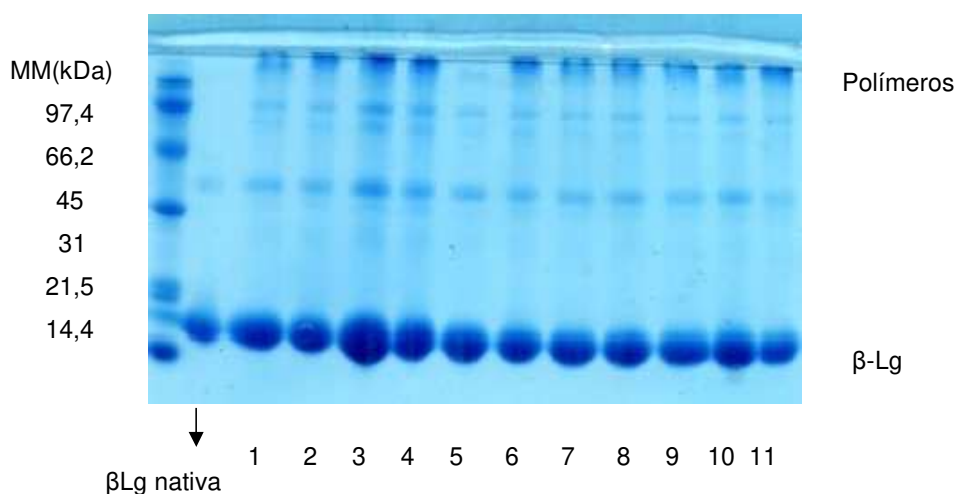


Figura 13. Perfil eletroforético SDS-PAGE, em meio redutor, da β -Lg e β -Lg tratada na presença do agente redutor GSH, polimerizadas pela TG: (1) 7,5 U TG g⁻¹ e 0,1 mmol/L GSH; (2) 44,1 U TG g⁻¹ e 0,1 mmol/L GSH; (3) 7,5 U TG g⁻¹ e 0,58 mmol/L GSH; (4) 44,1 U TG g⁻¹ e 0,58 mmol/L GSH; (5) 0,34 mmol/L GSH; (6) 51,6 U TG g⁻¹ e 0,34 mmol/L GSH; (7) 25,8 U TG g⁻¹; (8) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,67 mmol/L GSH; (9) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,34 mmol/L GSH; (10) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,34 mmol/L GSH; (11) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,34 mol/L GSH.

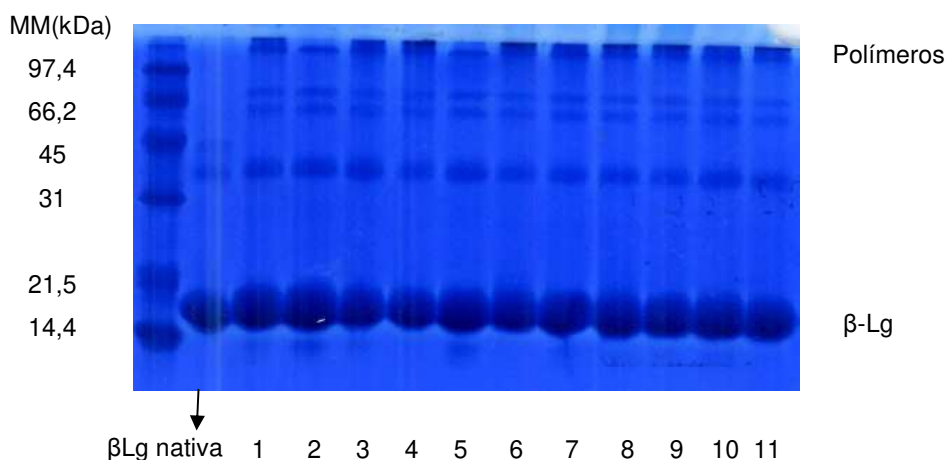


Figura 14. Perfil eletroforético SDS-PAGE, em meio redutor, da β -Lg e β -Lg tratada na presença do agente redutor AA, polimerizadas pela TG: (1) 7,5 U TG g⁻¹ e 0,003 mol/L AA; (2) 44, U TG g⁻¹ e 0,003 mol/L AA; (3) 44,1 U TG g⁻¹ e 0,017 mol/L AA; (4) 44,1 U TG g⁻¹ e 0,017 mol/L AA; (5) 0,01 mol/L AA; (6) 51,6 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA; (7) β -Lg, 25,8 U TG g⁻¹; (8) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,02 mol/L AA; (9) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA; (10) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA; (11) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA.

Embora tenha sido observada a formação de polímeros utilizando GSH ou AA como agentes redutores, em ambos os casos não houve diminuição perceptível da intensidade da banda referente à β -Lg monomérica, sugerindo que apenas uma parte da proteína foi polimerizada pela TG.

5.2 Atividade da TG na presença dos agentes redutores GSH e AA

A TG possui um grupo SH em seu sítio ativo e sua atividade é dependente do seu estado de oxidação, quando este grupo está na forma reduzido sua atividade aumenta (MIWA et al.,2002). Portanto pode ter havido alteração da atividade da TG pela presença dos agentes redutores, o que poderia ter influenciado o resultado dos experimentos realizados. Foi realizado, então, experimento para avaliar o efeito de GSH ou de AA na atividade da TG. Foram escolhidos os tratamentos que utilizaram a maior e menor concentrações de GSH e AA no experimento fatorial (7,5 U g⁻¹ e 0,1 mmol/L GSH; 25,8 U g⁻¹ e 0,67 mmol/L GSH; 7,5 U g⁻¹ e 0,003 mol/L AA; 25,8 U g⁻¹ e 0,02 mol/L AA), foram realizados os controles 7,5 e 25,8 U TG g⁻¹, sem a presença dos agentes redutores.

Quando utilizada GSH, observou-se aumento significativo da atividade da TG em 6,6% para a menor concentração utilizada no planejamento experimental (0,1 mmol/L) e aumento em 23% da atividade da TG para a maior concentração de GSH (0,67 mmol/L). Desta forma a presença da GSH influenciou a atividade da TG no experimento de GP, ou seja, diferenças no GP na presença das diferentes [GSH] podem ser devido a mudanças na atividade da TG. Miwa et al. (2002) relataram que o aumento da atividade da TG na presença de GSH pode ser devido à manutenção do sítio ativo da TG na forma reduzida, podendo ser a atividade da TG influenciada pela presença de GSH.

Foi observado aumento significativo de 13% na atividade da TG quando foi utilizada a menor concentração de AA do planejamento experimental de (0,003 mol/L) e diminuição significativa em 41% da atividade quando utilizada a maior concentração de AA do planejamento experimental (0,02 mol/L), Desta forma a presença do AA influenciou a atividade da TG no experimento de GP, ou seja, diferenças no GP na presença das diferentes [AA] podem ser devido a mudanças na atividade da TG.

5.3 Simulação da digestão gástrica

A susceptibilidade da β -Lg a digestão com pepsina foi avaliada após polimerização com TG na presença de GSH ou do AA. Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE/tricina) das amostras digeridas com pepsina relativas ao experimento com GSH estão apresentados na Figura 15. Todas as amostras apresentaram uma banda correspondente ao monômero (18,4 kDa) e outra ao dímero (36,8 kDa) da β -Lg, indicando resistência à ação da pepsina. Apenas as amostras polimerizadas nas condições do ponto central 25,8 U g⁻¹ e 0,34 mol/L GSH (ensaios 9, 10 e 11), apresentaram diminuição da intensidade da banda correspondente à β -Lg dimérica.

Na Figura 16 estão apresentados os perfis eletroforéticos dos digeridos pépticos das amostras tratadas com TG na presença de AA. A β -Lg nativa e o seu digerido, assim como os da β -Lg polimerizada pela TG na presença de AA apresentaram uma banda correspondente ao seu monômero e outra ao seu dímero, indicando resistência à ação das enzimas digestivas, sendo que nenhuma amostra apresentou diminuição da banda da β -Lg.

Não foram detectados peptídeos de baixa MM após a digestão das amostras de β -Lg tratadas com TG na presença dos agentes redutores GSH ou AA, o que também sugere baixa digestão pela pepsina. Possivelmente os sítios de clivagem da proteína podem ter sido ocultos devido à polimerização. Alguns autores sugerem que as ligações cruzadas formadas pela TG podem diminuir a ação da pepsina (TANG et al., 2006; STANIC et al., 2010). Para as amostras que foram tratadas apenas com GSH ou AA (ensaio 5 dos experimentos) também não foram detectados peptídeos de baixa MM, indicando que apenas a ação dos agentes redutores não foi capaz de alterar a susceptibilidade da β -Lg. Resultados diferentes utilizando AA e metabissulfito de sódio, como agentes redutores, foram observados na digestibilidade de sorgo, a presença desses agentes redutores diminuíram as ligações dissulfeto e aumentaram o acesso da enzima pepsina (ELKHALIFA, et al., 1999; ARBAB e TINAY, 1997).

Os tratamentos realizados com TG e agentes redutores não facilitaram a digestão da β -Lg pela pepsina. Estudos realizados com ovoalbumina, soja e β -

caseína polimerizadas pela TG resultaram em diminuição da digestibilidade das proteínas após a polimerização (TANG et al., 2006; GIOSAFATTO et al., 2011, STANIC et al., 2010), como observado neste trabalho.

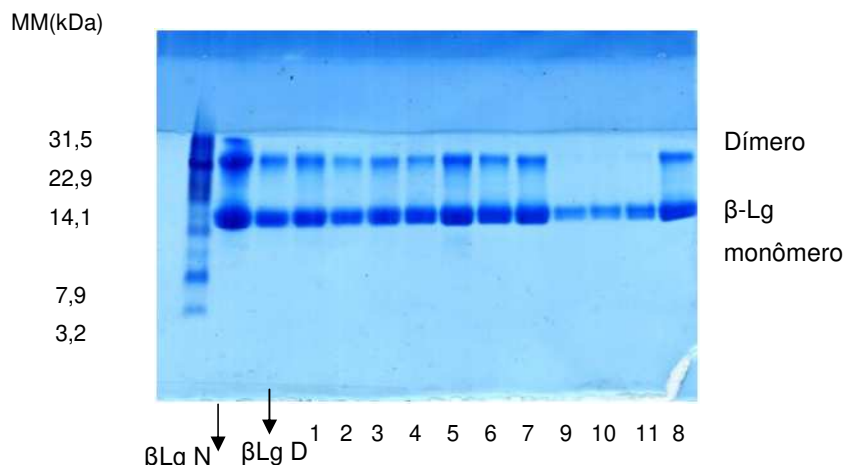


Figura 15. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor, de β -Lg, β -Lg tratada na presença do agente redutor GSH, polimerizadas pela TG, digeridos por pepsina: β Lg N (β -Lg nativa); β Lg D (β -Lg digerida) (1): 7,5 U TG g⁻¹ e 0,1 mmol/L GSH (2): 44,1 U TG g⁻¹ e 0,1 mmol/L GSH; (3) 7,5 U TG g⁻¹ e 0,58 mmol/L GSH; (4) 44,1 U TG g⁻¹ e 0,58 mmol/L GSH; (5) 0,34 mmol/L GSH; (6) 51,6 U TG g⁻¹ e 0,34 mmol/L GSH; (7) 25,8 U TG g⁻¹ (8) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,67 mmol/L GSH (9) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,34 mmol/L GSH; (10) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,34 mmol/L GSH; (11) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,34 mol/L GSH.

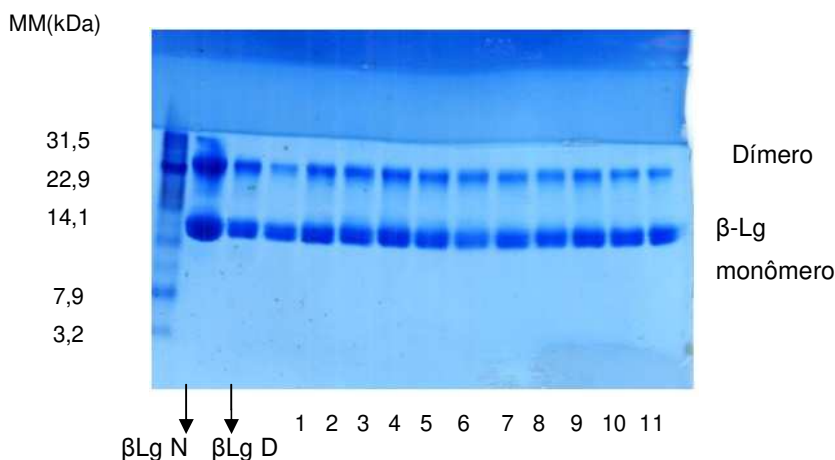


Figura 16. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor, de β -Lg, β -Lg tratada na presença do agente redutor AA, polimerizadas pela TG, digeridos por pepsina: β Lg N (β -Lg nativa); β Lg D (β -Lg digerida) (1): 7,5 TG U TG g⁻¹ e 0,003 mol/L AA (2): 44,1 U TG g⁻¹ e 0,003 mol/L AA; (3) 44,1 U TG g⁻¹ e 0,017 mol/L AA; (4) 44,1 U TG g⁻¹ e 0,017 mol/L AA; (5) 0,01 mol/L AA; (6) 51,6 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA; (7) 25,8 U TG g⁻¹; (8) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,02 mol/L AA (9) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA; (10) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA; (11) 25,8 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA.

5.4 Avaliação da Antigenicidade

Efeito da polimerização com TG na presença dos agentes redutores GSH ou AA na antigenicidade da β -Lg

Foram avaliados os níveis séricos de IgE dos grupos de animais utilizados como controle: imunizados com solução salina (0,9% NaCl) e solução alúmen (3% AlOH_3) e avaliados contra as amostras de β -Lg polimerizadas com TG na presença de GSH ou AA. Os níveis séricos de IgE nestes grupos foram significativamente menores ($\leq 11,5 \mu\text{g/mL}$) que os dos grupos de animais imunizados com a proteína nativa avaliados contra β -Lg polimerizada com TG na presença de GSH ou AA ($P < 0,05$).

A Tabela 9 apresenta a resposta de IgE específica (IgE anti- β Lg) analisada frente às amostras obtidas com os tratamentos com TG e GSH e à β -Lg N. Os valores de IgE variaram de 395 a 441,3 $\mu\text{g/L}$, conforme as condições utilizadas no processo de polimerização. Os pontos centrais apresentaram um coeficiente de variação de 2,42, indicando boa reprodutibilidade do processo.

Tabela 9. Resultados experimentais da resposta IgE de acordo com o planejamento experimental com glutatona (GSH) como agente redutor.

Real	Variáveis Independentes		Codificado		Resposta IgE ($\mu\text{g/L}$) ¹
	E/S (U TG/ g proteína)	[GSH] (mmol/L)	E/S	[GSH]	
1	7,5	0,1	-1	-1	417,3 $\pm$ 3,58
2	44,1	0,1	1	-1	436,5 $\pm$ 20,8*
3	7,5	0,58	-1	1	414,5 $\pm$ 25,7
4	44,1	0,58	1	1	424,0 $\pm$ 9,3
5	0	0,34	-1,41	0	408,4 $\pm$ 15,4
6	51,6	0,34	1,41	0	414,2 $\pm$ 21,
7	25,8	0	0	-1,41	433,9 $\pm$ 5,6 *
8	25,8	0,67	0	1,41	395,6 $\pm$ 11
9	25,8	0,34	0	0	441,3 $\pm$ 3,1*
10	25,8	0,34	0	0	423,2 $\pm$ 7,7*
11	25,8	0,34	0	0	423,4 $\pm$ 7,4*
β -Lg N					396,6 $\pm$ 18,5

* Diferença significativa entre β -Lg N e as demais amostras dos ensaios ($P < 0,05$).

¹ Os valores de IgE ($\mu\text{g/L}$) são médias de resultados obtidos com soro de 5 animais [GSH] concentração de glutatona.

A β -Lg polimerizada com TG na presença de GSH de acordo com os ensaios do experimento fatorial comparados à proteína nativa mostraram respostas semelhantes à β -Lg N (IgE 396,6 $\mu\text{g/mL}$) ($P > 0,05$), sendo que houve aumento significativo da resposta de IgE anti-BLg das amostras dos ensaios 2 e 7 e para os pontos centrais (ensaios 9,10,11). Para a amostra apenas com GSH, sem TG (ensaio 5), não houve diferença significativa em relação a resposta de IgE comparada a β -Lg-N.

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre a resposta IgE estão apresentados na Tabela 10, onde os valores em negrito são significativos a 90% de confiança ($P \leq 0,1$). Observa-se efeito negativo do fator [GSH] (L), ou seja, seu aumento leva a diminuição da resposta IgE. Para o presente estudo esse é um efeito benéfico, pois ocasionou a diminuição da antigenicidade. Observa-se também que os fatores E/S (L), E/S (Q), [GSH](Q) e a interação E/S X [GSH] foram considerados não estatisticamente significativos, ao nível de confiança de 90%.

Tabela 10. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para resposta de IgE do experimento utilizando glutathione (GSH) como agente redutor.

	Efeito	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	429,2	6,4	66,6	0
E/S (L)	8,7	7,9	1,1	0,316935
E/S (Q)	-13,1	9,4	-1,3	0,221994
GSH (L)	-17,9	7,9	-2,2	0,072648
GSH (Q)	-9,8	9,4	-1	0,343828
E/S X GSH	-5,8	11,1	-0,5	0,623252

Verificou-se a significância da regressão ao nível de confiança 90% através de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste-F (Tabela 11). A razão do F calculado/F tabelado não é superior a 1 indicando que a regressão não é estatisticamente significativa.

O R^2 do modelo ajustado foi 0,64 para a resposta IgE, indicando que o modelo explica apenas 64% da variação dos dados observados. O F calculado abaixo do tabelado e o coeficiente de determinação para o modelo ajustado muito baixo, indicam que não houve um bom ajuste dos valores experimentais ao modelo, não sendo adequado para avaliar a tendência através da superfície de resposta.

Tabela 11. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta IgE do experimento utilizando glutathione (GSH) como agente redutor.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Regressão	1126,9	4	281,7	2,71	3,18
Resíduos	623,2	6	103,8		
Total	1750,1	10	175		
R^2	0,64				

Foi também avaliada a resposta de IgE específica (ou IgE anti- β Lg) analisada frente às amostras obtidas com os tratamentos com TG e AA e à β -Lg N (Tabela 12). Os valores de IgE variaram de 373,8 a 826 μ g/L, conforme as condições utilizadas

nos ensaios. Os pontos centrais apresentaram coeficiente de variação de 1,46, indicando boa reprodutibilidade do processo.

Tabela 12. Resultados experimentais da resposta IgE de acordo com o planejamento experimental com ácido ascórbico (AA) como agente redutor.

Variáveis Independentes					
Real			Codificado	Resposta	
	E/S (U TG/ g proteína)	[AA] (mol/L)	E/S	[AA]	IgE ($\mu\text{g/L}$) ¹
1	7,5	0,003	-1	-1	766,0 $\pm$ 10,18*
2	44,1	0,003	1	-1	373,8 $\pm$ 16,81
3	7,5	0,017	-1	1	387,0 $\pm$ 24,72
4	44,1	0,017	1	1	824,0 $\pm$ 40,79*
5	0	0,01	-1,41	0	806,3 $\pm$ 58,79*
6	51,6	0,01	1,41	0	411,3 $\pm$ 14,76
7	25,8	0	0	-1,41	409,7 $\pm$ 16,2
8	25,8	0,02	0	1,41	792,5 $\pm$ 40*
9	25,8	0,01	0	0	802,5 $\pm$ 8,07*
10	25,8	0,01	0	0	826,0 $\pm$ 28*
11	25,8	0,01	0	0	811,0 $\pm$ 29,6*
β -L N					396,6 $\pm$ 18,5

*Diferença significativa entre β -Lg N e as demais amostras dos ensaios ($P < 0,05$).

¹Os valores de IgE ($\mu\text{g/L}$) são médias de resultados obtidos com soro de 5 animais.

[AA] concentração de ácido ascórbico.

A β -Lg polimerizadas com TG na presença de AA de acordo com as condições dos ensaios do planejamento fatorial, comparados à proteína nativa (IgE 396,65 $\mu\text{g/mL}$), não apresentaram redução de resposta ao IgE-anti- β Lg ($P < 0,05$), sendo que houve aumento significativo da resposta quando obtidas nas condições dos ensaios 1 (7,5 TG U g⁻¹ e 0,0029 mol/L AA), 4(44,1 TG U g⁻¹ e 0,017 mol/L AA), 5 (0,01 mol/L AA), 8 (25,8 TG U g⁻¹ e 0,02 mol/L AA) e pontos centrais, 9, 10 e 11(25,8 TG U g⁻¹ e, 0,01 mol/L AA).

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre a resposta IgE estão apresentados na Tabela 13, onde os valores em negrito são significativos a 90% de confiança. Observa-se efeito negativo dos fatores E/S (L) e [AA] (Q), ou seja, o aumento leva à diminuição da resposta IgE. A interação E/S e [AA] teve

efeito positivo no aumento da antigenicidade. Observa-se também que os fatores concentração de E/S (L), AA(L) foram considerados como não estatisticamente significativos, ao nível de confiança de 90%.

Tabela 13. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para resposta de IgE para o experimento utilizando ácido ascórbico (AA) como agente redutor.

	Efeito	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	813,4	70,3	11,5	0,000085
E/S (L)	-126,3	86,3	-1,4	0,203186
E/S (Q)	-212,8	102,9	-2	0,093671
AA (L)	155,3	86,3	1,8	0,131709
AA (Q)	-220,5	102,9	-2,1	0,085199
E/S X AA	418,8	121,8	3,43	0,018501

Verificou-se a significância da regressão ao nível de confiança 90% através de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste-F (Tabela 14). A razão do F calculado/F tabelado é superior a 1, indicando que a regressão é estatisticamente significativa, sendo adequado para avaliar a tendência através da superfície de resposta.

O R^2 do modelo ajustado foi de 0,83 para a resposta IgE, indicando que o modelo explica 83% da variação dos dados observados. Devido ao baixo R^2 ($<0,90$), os fatores não significativos foram mantidos. Sendo assim, modelo codificado ajustado para o parâmetro IgE é dado por:

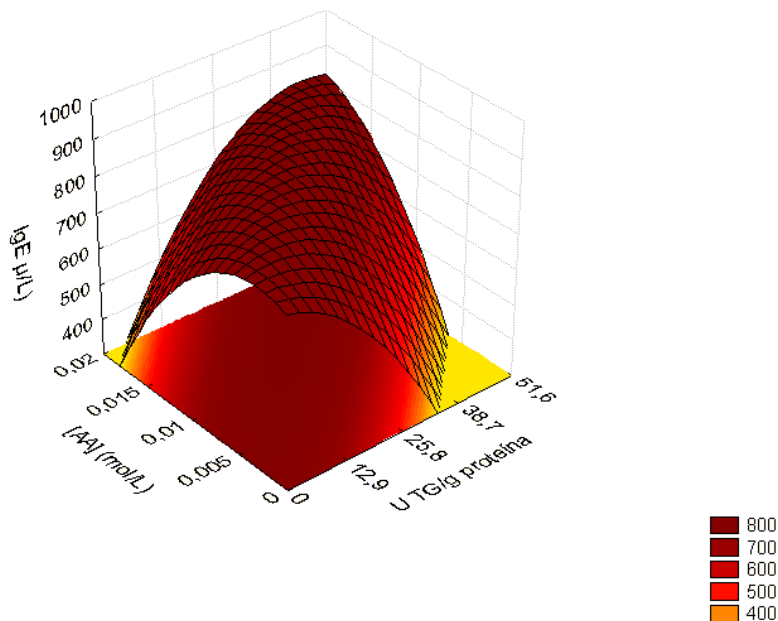
$\text{IgE } (\mu\text{g/L}) = 813,4 - 126,3 \cdot \text{E/S} - 212,8 \cdot \text{E/S}^2 + 155,3 \cdot [\text{AA}] - 220,5 \cdot [\text{AA}]^2 - 418,8 \cdot \text{E/S} \cdot [\text{AA}]$ (equação 7).

Tabela 14. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta IgE do experimento utilizando ácido ascórbico (AA) como agente redutor.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Regressão	357267,9	4	89316,9	7,2	3,18
Resíduos	74268,7	6	12378,1		
Total	431536,7	10	43153,6		
R^2	0,83				

A Influência das variáveis independentes sobre a resposta IgE para o experimento utilizando ácido ascórbico (AA) como agente redutor está apresentada no gráfico de superfície de resposta e curvas de níveis na Figura 17.

a-)



b-)

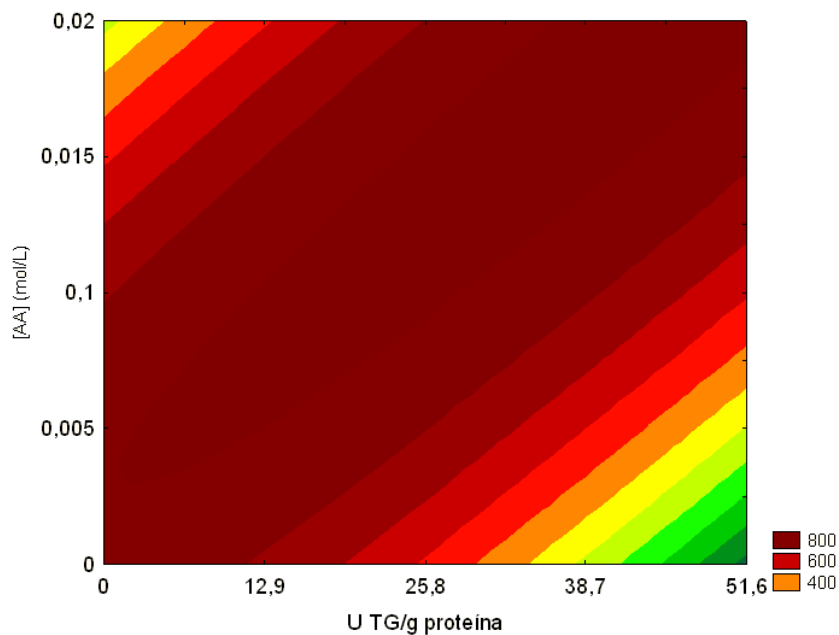


Figura 17 (a). Superfície de resposta e(b). Curvas de níveis para IgE (%) em função da relação enzima: substrato E/S (U TG g^{-1}) e GSH (mmol/L) para a resposta IgE ($\mu\text{L/mL}$).

O gráficos de superfície de resposta e curvas de níveis (Figura 17) indicam que a menor resposta para IgE foi observada para [AA] em torno de $+\alpha$ e E/S em torno de $-\alpha$ ou para [AA] em torno de $-\alpha$ e E/S $+\alpha$. O efeito conjunto do aumento da [AA] e da E/S levou ao aumento da resposta de IgE.

No presente estudo observou-se que a polimerização pela TG tanto na presença de GSH como na de AA resultou no aumento da antigenicidade da β -Lg, quando avaliada frente aos soros dos animais sensibilizados com a proteína nativa. Estes resultados podem ser explicados pela exposição de epítomos antes ocultos na β -Lg em decorrência do tratamento com os agentes redutores e/ou posterior polimerização, levando à mudança conformacional da proteína (MERZEJEWSKA e KUBICKA, 2006). Zhong et al. (2011) estudaram a resposta antigênica da β -Lg tratada com alta pressão em diferentes temperaturas e observaram por teste ELISA aumento da antigenicidade após o tratamento. Os autores relatam que a alta pressão pode ter induzido a mudança na conformação da β -Lg resultando em melhor acessibilidade para os anticorpos. Otani et al. (1985) e Kurisaki et al. (1982) mostraram que a estrutura terciária da β -Lg era necessária para sua imunorreatividade. Clement et al. (2002) verificaram que havia regiões antigênicas não só na α -hélice e arcos externos, mas também as folhas- β continham epítomos.

Ao contrário do que foi obtido com os agentes redutores AA e GSH, Villas-Boas et al. (2010) verificaram que a polimerização da β -Lg na presença de agente redutor Cys promoveu redução da resposta antigênica da proteína, sugerindo que nestas condições ocorrem alterações nas regiões de determinantes antigênicos presentes na proteína.

5.4.1 Análise dos níveis séricos de IgE dos digeridos pépticos

Os digeridos pépticos foram avaliados quanto à capacidade de ligação com IgE anti- β Lg, a fim de observar diferenças de resposta antigênica da β -Lg tratada com os agentes redutores e os produtos da digestão.

Para este estudo, foram escolhidas as amostras obtidas nas condições dos ensaios 5, 6, 7 e 8, que são relativos aos níveis extremos do planejamento

experimental ($\pm 1,41$) e um ponto central, ensaio 9, para os experimentos realizados com os agentes redutores GSH ou AA.

Comparados à β -Lg digerida (IgE 213 $\mu\text{g/mL}$), os digeridos pépticos das amostras tratadas com TG e GSH (Figura 18) e os digeridos das amostras tratadas com TG e AA (Figura 19), não apresentaram redução significativa de ligação com IgE anti- β -Lg ($P < 0,05$).

A β -Lg nativa tratada com TG na presença de GSH ou AA não influenciou a digestão pela pepsina e também não influenciou sua resposta antigênica. Estes resultados podem ser devidos ao fato que os epítomos existentes na estrutura da β -Lg não terem sido modificados, ou pela criação e/ou exposição de novos epítomos não susceptíveis à digestão pela pepsina, mantendo assim a antigenicidade da proteína. Stanic et al. (2010) observaram que os digeridos com pepsina da β -caseína tratada com TG não apresentaram diminuição da imunogenicidade (ELISA) em relação à β -caseína nativa digerida. Os autores consideraram que a reticulação por TG não foi capaz de alterar os epítomos existentes na proteína.

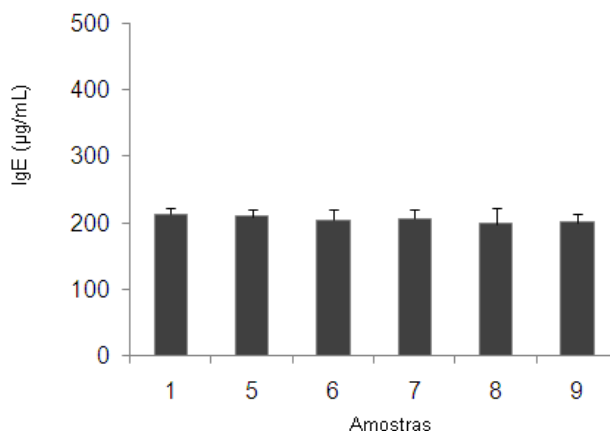


Figura 18. Níveis séricos de IgE no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-N), avaliados contra as seguintes amostras de β -Lg e posteriormente digeridas pela pepsina: (1) β Lg nativa; (5) β -Lg tratada com 0,34 mmol/L GSH; (6) β -Lg tratada com 51,6 U TG g^{-1} e 0,34 mmol/L GSH; (7) 25,8 U TG g^{-1} ; (8) 25,8 U TG g^{-1} e 0,67 mmol/L GSH (9) 25,8 U TG g^{-1} e 0,34 mmol/L GSH. Comparação entre β -Lg N digerida e as demais amostras digeridas ($P < 0,05$).

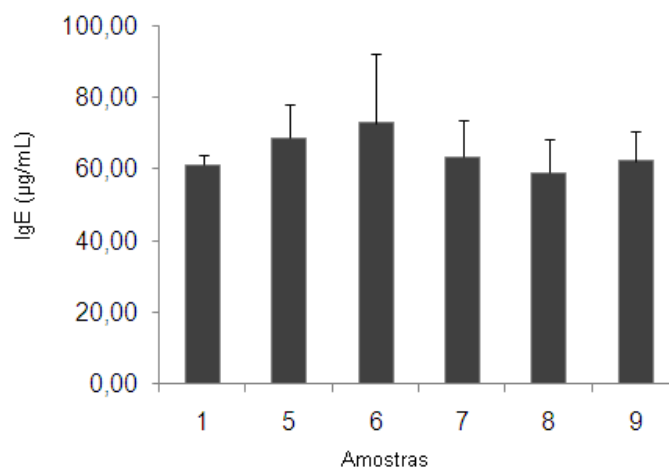


Figura 19. Níveis séricos de IgE no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-N), avaliados contra as seguintes amostras de β -Lg e posteriormente digeridas pela pepsina: (1) β -Lg nativa, (5) β -Lg tratada com 0,01 mol/L AA (6) β -Lg tratada com 51,6 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA (7) β -Lg tratada com 25,8 U TG g⁻¹ (8) β -Lg tratada com 25,8 U TG g⁻¹ e 0,02 mol/L AA (9) β -Lg tratada com 25,8 U TG g⁻¹ e 0,01 mol/L AA.

Comparação entre β -Lg N digerida e as demais amostras digeridas ($P < 0,05$).

6. Conclusão

A desnaturação por agentes redutores, seguida da reação de polimerização pela enzima TG levou à formação de polímeros de β -Lg de alta massa molar (acima de 97,4 kDa), porém não houve diminuição perceptível da intensidade da banda referente à β -Lg monomérica, sugerindo que apenas uma parte da proteína foi polimerizada pela TG. Os tratamentos realizados na β -Lg com TG e os agentes redutores seguidos de digestão pela pepsina não levaram a formação de peptídeos de baixo peso molecular, o que indica que não houve alteração na digestibilidade da β -Lg pela pepsina após polimerização.

A polimerização da β -Lg na presença dos agentes redutores GSH e AA, promoveu alterações na proteína que levaram ao maior reconhecimento da β -Lg pelas IgE específicas presente nos soros dos animais sensibilizados. Estes resultados sugerem que a polimerização na presença dos agentes redutores manteve ou aumentou o potencial antigênico da β -Lg ao criar ou expor regiões de epítomos na proteína.

A presença dos agentes redutores e a polimerização por TG não facilitaram a clivagem da β -Lg pela enzima pepsina, e não geraram peptídeos com menor potencial antigênico, comparados ao digerido da proteína nativa.

Portanto o tratamento da β -Lg com TG e agentes redutores levou a maior polimerização e ao aumento da antigenicidade de algumas amostras tratadas com TG e com os agentes redutores GSH ou AA. As amostras de β -Lg tratadas com TG e agentes redutores quando digeridas não apresentaram diminuição da antigenicidade em relação à proteína digerida com pepsina. Os resultados indicam que os tratamentos realizados na β -Lg foram capazes de modificar a estrutura da proteína devido a sua polimerização, porém não foram capazes de diminuir o potencial antigênico da β -Lg.

7. Referências bibliográficas

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

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

ADEL-PATIENT, K.; CRÉMINON, C.; BERNAND, H.; CLEMENT, G.; NEGRONI, L. L. FROBERT, Y.; GRASSI, J.; WAL, J. M.; CHATEL, J. M. Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine β -lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allerg-specific IgE, IgG1 and IgG2a in β -lactoglobulin - sensitized mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 235, n.1, p. 21-32, 2000. AGYARE, K.K.; XIONG, Y.L.; ADDO, K. Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase treated wheat gluten hydrolysate **Food Chemistry**, v. 107, p. 1131-1137, 2008

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

ARBAB M.E., TINA, A.H.. Effect of cooking and treatment with sodium bisulphite or ascorbic acid on the *in vitro* protein digestibility of two sorghum cultivars. **Food Chemistry**, v. 59, p. 339-343, 1997.

ASSELIN, J.; HEBERT, J.; AMIOT, J. Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. **Journal of Food Science**, v.54, p. 1037- 1039. 1989.

BABIKER, E.E.; HIROYUKI, A.; MATSUDOMI, N.; IWATA, H.; OGAWA, T.; BANDO, N.; KATO, A. Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.3, p. 866-871, 1998.

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

BELLIDO G.G., HATCHER, D.W. Effects of a cross-linking enzyme on the protein composition, mechanical properties, and microstructure of Chinese-style noodles **Food Chemistry**, v. 125, p. 813–822, 2011.

BANNON, G.; FU, T.; KINBER, I.; HINTON, D. M. Protein digestibility and relevance to allergenicity. **Environmental Health Perspectives** v.111 n.81, 2002.

BEVERIDGE, T., TOMA, S.J.; NAKAI, S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 49-51, 1974.

BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J. M.; CLEMENT, G.; ADEL-PATIENT, K.; PELTRE, G.; CRÉMINON, C.; WAL, J. M. Molecular basis of IgE crossreactivity between human β -casein and bovine β -casein, a major allergen of milk. **Molecular Immunology**, v. 37, n.3, p. 161-167, 2000.

BESLER, M. Determination of allergens in foods. **Trends in analytical chemistry**, v. 20, n. 11, 2004.

BLIGH, E. G; DYER, W.J.A rapid method of total lipid extration and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n.8, p. 911-917, 1959.

BONISCH, P. M.; LAUBER, S.; KULOZIK, U. Improvement of enzymatic cross-linking of casein micelles with transglutaminase by glutathione addition. **International Dairy Journal**, v.17, p. 3-11, 2007.

BREITENEDER, H. E MILLS, E. N. C. Molecular properties of food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, p. 14-23, 2005

BRITO, R. B. S. L.. Modulação da resposta imunológica (Th2/Th1) em camundongos BALB/c previamente sensibilizados com ovalbumina (OVA) e injetados com microesferas de PLGA encapsuladas com OVA. 2006, 76 p. Dissertação (Mestre em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BROWNLOW, S.; CABRAL, J. H. M; FLOWER, D.R.; YEWDALL, S.J.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A. C. T.; SAWYER, L. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still en enigmatic lipocalin. **Structure**, v.5, n.4, p. 481-495, 1997.

BUCHERT, J., SELINHEIMO, E., KRUUS, K., MATTINEN, M.-L., LANTTO, R., & AUTIO, K. Using crosslinking enzymes to improve textural and other properties of food. In R. Rastall (Ed.), **Novel enzyme technology for food applications**, p. 101-139, 2007.

BUCK, J.; HATTERSLEY S.; KIMBER, I. Food allergy – science and policy needs – The UK Food Standards Agency Research Programme. **Toxicology**, v. 278, p. 319–325, 2010.

BURKS, W., BALLMER-WEBER, B.K. Food Allergy : Review. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 50, p. 595-603, 2006.

BYUM, M. W.; LEE, J.W.; YOOK, H.S.; JO, C.; KIM, H.Y. Application of gamma irradiation of inhibition of food allergy. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 63, p. 369-270, 2002.

CHO, Y. S; SONG,K.B.; KOJI YAMDA,K. Effect of ultraviolet irradiation on molecular properties and Immunoglobulin Production-regulating Activity of β -Lactoglobulin **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 595-602, 2010.

CLARE, D.A.; GHARST, G.; SANDERS, T.H. Transglutaminase polymerization of peanut proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.2, p.432-438, 2007.

CLEMENT, G.; BOQUET, D.; FROBERT, Y.; BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J.M.; ADEL-PATIENT, K.; CREMINON, C.; WAL, J.M.; GRASSI, J. Epitopic characterization of native β -Lactoglobulin. **Journal of Immunological Methods**, v.266, n.1, p. 67-78, 2002.

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

CORDLE, C. L. Control of food allergies using protein hydrolysates. **FoodTechnology**, v. 48, p. 72-76, 1994.

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

DONG, W.; HOSENEY. R.C. Effects of certain breadmaking oxidants and reducing agents on dough rheological properties. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 58-64.

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

EISSA, A. S.; PUHL, C.; KADLA, J. F.; KHAN, S. A. Enzymatic cross-linking of β -Lactoglobulin: Conformational properties using FTIR spectroscopy. **Biomacromolecules**, v.7, n.6, p.1707-1713, 2006.

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

FERNANDES, M. A.. Efeito da enzima transglutaminase na digestibilidade e antigenicidade da β -Lactoglobulina. 2009, 94 p. Dissertação de mestrado em Alimentos e Nutrição – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

FOLK, J.E. and COLE, P.W. Mechanism of action of pig liver transglutaminase. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 23, p. 5518-5525, 1966.

FOLK, J.E.; FINLAYSON, J. S. The ϵ -(γ -glutamina)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminase. **Advances in Protein Chemistry**, v.31, p. 1-133, 1977.

FORT, N.; CARRETERO, C.; PARÉS, D.; TOLDRA, M.; SAGUER. E. Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: effects on the heat-induced gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n.3, p. 463-471, 2007.

FORNARO, A.; COICHEV, N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. **Química Nova**, v. 21, p. 01-05, 1997.

FU, T.; ABBOTT, U. R.; HATZOS, C. Digestibility of food Allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.50 p.7154-7160, 2002.

GANAI, N.A.; BOVENHUIS, H.; ARENDONK, J.A.A.; VISKER, M. H. P. W. Novel polymorphisms in the bovine β -Lactoglobulin gene and their effects on β -Lactoglobulin protein concentration in milk. **Animal Genetics**, v. 40, p. 127-133, 2009.

GAUCHE, C. JOANA, T.C. VIEIRA, P. J. O, MARILDE, T. B.L..Crosslinking of milk proteins by transglutaminase. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 788-794, 2008.

GAUDRY, P. A.; FERNANDES, J.; REISH, R.; ROUX, K. H.; SATHE, S. K.; TEUBER, S. S.; REESE, G.; LEHRER, S. B.; Murine IgE and IgG antibody responses to allergenic and non-allergenic foods: potential model for allergenicity assessment of foods in man. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n.2, p. S234, 2004.

HATTORI, M.; MIYAKAWA, S.; OHAMA, Y.; KAWAMURA, H.; YOSHIDA, T.; TO-O, K.; KURIKI, T.; TAKAHASHI, K. Reduce immunogenicity of β -Lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 4546-4553, 2004.

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

HINZ, K., HUPPERTZ, T., KULOZIK, U., & KELLY, A. L. Influence of enzymatic crosslinking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. **International Dairy Journal**, v.17, n.4, p. 289-293, 2007.

HILLER, B., LORENZEN, P. C. (2009). Effect of phosphatase/transglutaminase treatment on molar mass distribution and techno-functional properties of sodium caseinate. **LWT e Food Science and Technology**, v. 42, n.1, p. 87-92.

HINZ, K., HUPPERTZ, T., KULOZIK, U., & KELLY, A. L. Influence of enzymatic crosslinking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. **International Dairy Journal**, v.17, n.4, p. 289-293, 2007.

HUBER, C. H.; ALMEIDA, A. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUDSON, L.; HAY, F.C. **Practical Immunology**, 3 ed. Blackwell Scientific Publications.1989.

IAMETTI, S.; RASMUSSEN, P.; FRAKIAER, H.; FERRATI, P.; ADDEO, F.; BONONI, F. et al. Proteolysis of β -Lactoglobulin during thermal treatment in subdenaturing highlights some structural features of temperature-modified protein and yields fragments with low immunoreactivity. **European Journal of Biochemistry**, v.269, p.1362-1372, 2002.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**, 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

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

JEDRYCHOWSKI, L.; WROBLEWSKA, B. Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic and fermentation. **Food and Agricultural Immunology**, v.11, n.1, p.91-99, 1999.

JIANG, S. T.; LAN, C. C.; TSAO, C. Y. New approach to improve the quality of minced fish products from freeze-thawed cod and mackerel. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 310-311, 1986.

JIANG, S., ZHAO, X. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation in soybean protein isolates and its impacts on some functional properties of the products **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 5, p. 679-689, 2010.

JIANG, S. J.; ZHAO, X. H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 198-205, 2011

JONG, G. A. H.; KOPPELMAN, S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. **JFS: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science**, v. 67, p. 2798-2006, 2002.

JOYE, I. J., LAGRAIN, B., DELCOUR, J.A. Endogenous redox agents and enzymes that affect protein net work formation during breadmaking – A review. **Journal of Cereal Science**, v.50, p. 11-21, 2009.

M.L. KAKADE, M.L.; LIENE, I.E. Determination of available lysine in proteins. **Analytical Biochemistry**. v. 27, n. 2, p. 273-280, 1969.

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

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

KIM, S. B. et al. Peptic and tryptic hydrolysis of nature and heated whey proteins to reduce its antigenicity. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4043-4050, 2007.

KLEBER, N.; KRAUSE, I.; ILLGNER, J.H.; HINRICHS, J. The antigenic response of β -Lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research Technology**. v. 219, p. 105-110, 2004.

KOPPELMAN, S. J.; HEFLE, S. L. **Detecting allergens in food**. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006.

KURISAKI, J.; NAKAMURA, S.; KAMINOGAWA, S. YAMAUCHI, K. The antigenic properties of β -lactoglobulin examined with mouse IgE antibody. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, v. 46, n.8, p. 2069-2075, 19

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGRAIN, B. THEWISSEN, B.G, BRISJ, K., DELCOUR, J.A., Impact of redox agents on the extractability of gluten proteins during bread making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5320-5325.

LAKSHMANA, P. L. N.; TOYOKAWAA, Y.; TACHIBANAB, S.; TOYAMAB, H.; TAIRAB T.; YASUDAB, M.; Reducing the antigenicity of milk whey protein using acid proteinases from *Monascus pilosus*. *Process Biochemistry*, v. 46, 806-810, 2011.

LEE, J.W.; KIM, J.H.; YOOK, H.S.; KANG, K.O.; LEE, S.Y.; HWANG, H.J; BYUN, M.W. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 272-276, 2001.

LORAND, L. Transglutaminase: Remembering Heinrich Waelsch. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 7-12, 2002.

LORENZEN, P. CHR.; SCHILIMME, E.; ROOS, N. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. **Nahrung**, v. 42, p. 151-154, 1998.

LORENZEN, P. C. Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. **Milchwissenschaft**, v. 55.n.12, p. 667-670, 2000.

MIWA, NORIKO; KAWASAKI-SHI, KANAGAWA-KEN. **Method for modifying raw material milk and dairy product prepared by using the modified raw material milk**. n. 01123902.7, 17 de abril, 2002.

MACEDO, J.A; SETTE, L.D; SATO, H.H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618-626, 2007.

MAIER, I.; OKUN, V.M., PITTNER, F., LINDNER, W. Changes in peptic digestibility of bovine β -Lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 841, p. 160-167, 2006.

MARSHALL, K. R.; HARPER, R. J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 233, p. 21-32, 1988.

MARTOS G., Patricia CONTRERAS, P.; Molina, E. and Rosina LOpez-Fandi, R.L. Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 2010, v. 58, n.9, p. 5640–5648.

MAYNARD, F.; WEINGANG, A.; HAU, J.; JOST, R. Effects of high pressure treatment on the tryptic hydrolysis of bovine β -Lactoglobulin AB. **International Dairy Journal**, v.8, p. 125–133, 1998.

MEISTER, A.; TATE, S. S. Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 45, p.559-604, 1976.

MIERZEJEWSKA, D.; KUBICKA, E. Effect of temperature on immunoreactive properties of the cow milk whey protein β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft*, v.61, n.1, p.69-72, 2006.

MIWA, N.; KUMAZAWA, Y.; NAKAGOSHI, H.; SAKAGUCHI, S. **Method for modifying raw material milk and dairy product prepared by using the modified raw material milk**. European Patent 1 197 152 A2, 2002.

MIZUHA Y, SHIMIZUIKE A, YAMAMOTO S. Peptic digestibility of raw and heat-coagulated hen's egg white proteins at acidic pH range. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 635-640, 2004.

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

MONACO, H. L.; ZANOTTI, G.; SPADON, P.; BOLOGNESI, M.; SAEYER, L.; ELIOPOULOS, E.E. Cristal structure of the trigonal form of bovine β -Lactoglobulin and its complex with retinol at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.197, n.4, p.695-706, 1987.

MORENO, F. J. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**.v.61, p.50-60, 2007.

MORGAN F.; BOUHALLAB S.; MOLLE D.; HENRY G.; MAUBOIS JL; LEONIL J. Lactolation of β -Lactoglobulin monitored by electrospray ionization mass spectrometry. **International Dairy Journal**, v.8, n.2, p. 95-98,1998.

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

MOTOKI, M; NIO, N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 561-566, 1984.

MOUÉCOUCOU, J., VILLAUME C. , MARRION O., FRÉMONT S., LAURENT F., MÉJEAN, L. Effects of different levels of gum arabic, low methylatedpectin and xylan on in vitro digestibility of β -lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, n. 83, p. 3857-3865, 2003.

NACER, A. S. et al. Interactions between β -lactoglobulin and pectins during *in vitro* gastric hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 355-360, 2004.

NAKAMURA, T.; SADO, H.; SYUKUNOBE, Y. Production of low antigenic whey proteins hydrolysates by enzymatic hydrolysis and denaturation with high pressure. **Milchwissenschaft**, v. 48 p. 141-145, 1993.

NOKADE, Y.; FUKUMOTO, S.; FUKASAWA, M.; YAMASAKI, N.; SAKAMURA, R. Preparation and Immunological Characterization of β -Lactoglobulin-Amylose Conjugate. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.75, n. 1, p. 165-167, 2011.

OBRETENOV, C.; DEMYTTENAERE, J; TEHRANI, K. A.; ADAMS, A.; KERSÿIENE, M.; KIMPE, N. D. Flavor Release in the Presence of Melanoidins Prepared from L-(+)-Ascorbic Acid and Amino Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4244-4250, 2002.

O` SULLIVAX, M. M.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Influence of transglutaminase treatment on some physic-chemical properties of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 433-422, 2002.

OTANI, H.; UCHIO, T.; TOKITA, F. Antigenic reactives of chemically modified β -Lactoglobulins with antiserum to bovine β -Lactoglobulin. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.49, p. 2531-2536, 1985.

OTANI, H. X. D.; HOSONO, A. Preparation of low-immunogenic peptide fragments from cow Milk casein. **Milchwissenschaft**, v. 45, p. 217-220, 1990.

OTTE, J. et al. Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 835-848, 1997.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I.C.; FLORES, S.H.;JONG, .E.V. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição** v.20, n.2, p. 231-239, 2009.

PAPIZ, M.Z.; SAEYER, L.; ELIOPOULOS, E.E.; NORTH, A.C.T.; FINDLAY, J.B.C.; SIVAPRASADARAO, R.; JONES, T.A.; NEWCOMER, M.E.; KRAULIS, P.J. The structure of β -Lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. **Nature**, v. 324, n.6095, p.383-385, 1986.

PASTORELLO, E. A.; TRANBAIOLI, C. Isolation of food allergens. **Journal of Cromatography B: Biomedical Science and Applications**. v. 765, n. 1, p. 71-84,2001.

PAHUD, J.J.; MONTI, J.C.; JOST, R. Allergenicity of whey protein: its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**.v.4, n.3, p.408-413, 1985.

PAOLICCHI, A.; DOMICI, S.; PIERI, L.; MAELLARO, E.; POMPELLA, A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. **Biochemistry Pharmacology**, v. 64, p. 1027-35, 2002.

PEÑAS, E., GOMEZ, R., FRIAS, J., BAEZA, M.L., VIDAL-VALVERDE, C. High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. **Food Chemistry**, v. 125, p.423–429, 2011.

PEÑAS, E.; PRÉSTAMO, G.; BAEZA, M. L.; MOLERO, M. I. M.; GOMEZ, R. Effect of combined high pressure and enzymatic treatment on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 831-839, 2005.

PENNINCKX, M. A short review on the role of glutathione in the responses of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 737-742, 2000.

POULSEN, L.K. Allergy assessment of foods or ingredients derived from biotechnology, gene-modified organisms, or novel foods. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, p. 413-423, 2004.

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

PUERTA, A.; DIEZ-MASA, J. C.; FRUTOS, M. Immunochromatographic determination of β -Lactoglobulin and its antigenic peptides in hypoallergenic formulas. **International Dairy Journal**, v.16, p. 406-414, 2006.

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

ROGACHEVA, S.M.; KUNTICHEVA, M. J.; PANCHEV I. N.; OBTRENOV T. D. Melanoidin formation in L-ascorbic acid-a-amino acids interaction. A comparative study. **Nahrung**, v. 43, p. 105-108, 1999.

ROSSA, P. N.; SÁ, E. M. F.; BURIN, V. M.; LUIZ, M. T. B. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p. 39-44, 2011

ROUVINEN, J.; RAUTIANEN, J.; VIRTANEN, T.; ZEILER, T.; KAUPINEN, J. Probing the molecular basis of allergy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 2337-2343, 1999.

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

SANLI, T.; SEZGIN, E.; DEVECI, O.; SENEL, E., BENLI, M. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. **Food Hydrocolloids**, v 25, p.147,1481, 2011.

SAWYER, L.; BARLOW, P. N. B.; BOLAND, M. J. CREAMER, L.K.; DENTON, H.; EDWARDS, P. J. B.; HOLT, C.; JAMESIN, G. B.; KONTOPIDIS, G.; NORRIS, G. E.; UHRÍNOVÁ, S.; WU, S. Y. Milk protein structure – what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p. 299-310, 2002.

SCHNELL, S.; HERMAN, R.A. Should digestion assays be used to estimate persistence of potential allergens in tests for safety of novel food proteins? **Clinical Molecular Allergy**. v. 15, n.7, 2009.

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

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

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

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

SHIGEOKA, T.; ONISSHI, T.; NAKANO, Y.; KITAOKA, S. Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis* z. **Biochemistry Journal**, v. 242, p. 511-515, 1987.

SPIEGEL, T.; HUSS, M. Whey protein aggregation under shear conditions: effects of pH-value and removal of calcium. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.5, p.559, 2002.

SOOTTAWAT, B., CHUTIMAN, T. E WONNOP, V. Effect of reducing agents on physicochemical properties and gel-forming ability of surimi produced from frozen fish. **European Food Research Technology**, p. 316-321, 2004.

STANIC, D., MONOGIUDIE, DILEK, E., RADOSAVLJEVIC, J., ATANASKOVIC-MARKOVIC, M., VUCKOVIC, O., RAIJA, L., MATTINEN, M., BUCHERT, J., TANJA CIRKOVIVELICKOVIC, T.C. Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked β -casein. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 9, p. 1273–1284, 2010.

STAPELFELDT, H. et. al. Effect of high hydrostatic pressure on enzymatic hydrolysis of β -Lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 111–118, 1996.

SUNG-IL JOO, JI-EUN KIM, SAM-PIN LEE. Physicochemical properties of whole soybean curd prepared by microbial transglutaminase. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 437- 444, 2011.

THOMAS, K. et al. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 39, p. 87–98, 2004.

TRAORÉ, F.; MEUNIER, J. C. Cross-linking activity of placental F XIII, on whey proteins and caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.3, p.399-402, 1992.

TRUONG, V.D. CLARE, D.A., CATIGNANI G.L., SWAISGOOD, H. Cross linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. **Journal Agricultural of Food Chemistry**.v.52,p. 1170-1176, 2004

BUCHANAN; BOB B., MORIGASAKI; SUSUMU, DEL VAL; GREGORIO, FRICK; OSCAR L. **Stabilization of hypoallergenic, hyperdigestible previously reduced proteins**. n. 6,677,433, 7 fevereiro 2001.

VAN, W. R. W. G.; FITZGERALD, R. J. Tryptic and chymotryptic hydrolysis of β -Lactoglobulin A, B and AB at ambient and high pressure. **Milchwissenschaft**, v. 50, p. 183–185, 1995.

VAN BERESTEIJN, E. C. H. et al. Molecular Mass Distribution, Immunological Properties and Nutritive Value of Whey Protein Hydrolysates. **Journal of Food Protection**. v.57, n.7,p. 619- 625, 1994.

VAN HOEYVELD, E. M. MONGE, E.; SWERT, D., STEVENS. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 28, p. 1131- 1137, 1998.

VILLAS BOAS, M. B. **Efeito da enzima transglutaminase na antigenicidade da β -Lactoglobulina**, 78 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VILLAS-BOAS, M. B., VIEIRA K. P., TREVISAN, G., ZOLLNER, R. L., & NETTO, F. M. The effect of transglutaminase-induced polymerization in the presence of cysteine on β -Lactoglobulin antigenicity. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 386–392, 2010.

VILJANEN, M.; SAVILAHTI, E.; HAAHTELA, T.; BACKMAN, J. K.; KORPELA, R.; POUSSA, T.; TUURE, T.; KUITUNEN, M. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. **Allergy**. v. 60, n.4, p.494-500, 2005.

WILCOX, C. P.; SWAISGOOD, H. E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5546-555, 2002.

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

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

WALSH, D. J.; CLEARY, D.; MCCARTHY, E.; MURPHY, S.; FITZGERALD, R.J. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. **Food Research International**, v 36, p.677-683, 2003.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

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

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

WRÓBLEWSKA, B.; KOAKOWKI, P.; PAWLILOWSKA, K.; TROSZUNSKA, A.; KALISZEWSKA, A. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2434–2445, 2008 b.

WROBLEWSKA, B., KALISZEWSKA, A., KOLAKOWSKI, P., PAWLIKOWSKA, K., TROSZYNSKA, A. Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 27, (2): 215-227, 2010.

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

YOSHIN, K.; SAKAI, K; MIZUHA,Y.; SHIMIZUIKE, A.; YAMAMOTO, S. Peptic digestibility of raw and heat-coagulated hen's egg white proteins at acidic pH range. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 55, n. 8, p. 635-640, 2004

ZHONG, J.; LIU, C.; LIU, W.; CAI,X.; TU· Z.; JIE WAN, J. Effect of dynamic high-pressure microfluidization at different temperatures on the antigenic response of bovine β -lactoglobulin. **European Food Research and Technology**. v. 233, n. 1, p. 95-102,2011.

8. Anexo

8.1 Anexo 1: Certificado da Comissão de ética na experimentação Animal CEEA/Unicamp




**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

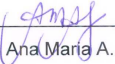
CERTIFICADO

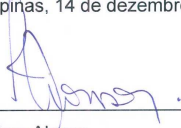
Certificamos que o Protocolo nº 2039-1, sobre "Efeito da polimerização catalisada pela enzima transglutaminase em condições redutoras na antigenicidade da beta-lactoglobulina", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Flavia Maria Netto / Milena Morandi Vuolo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 14 de dezembro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2039-1, entitled "Effect of polymerization catalized by transglutaminases in reducing conditions on antigenicity of beta-lactoglobulin", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on December 14, 2009.

Campinas, 14 de dezembro de 2009.


 Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
 Caixa Postal 6109
 13081-970 - Campinas, SP

Telefone: (19) 3521-6359
 E-mail: comisib@unicamp.br
 Site: www.unicamp.br/ceua