



UNICAMP

CELIA DE JESÚS FRANÇA

**EFEITO DA POLIMERIZAÇÃO COM A ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA
REDUÇÃO DO POTENCIAL ALERGÊNICO DO ISOLADO PROTÉICO DE
SORO DO LEITE**

CAMPINAS

2012



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

CELIA DE JESÚS FRANÇA

**EFEITO DA POLIMERIZAÇÃO COM A ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA
REDUÇÃO DO POTENCIAL ALERGÊNICO DO ISOLADO PROTÉICO DE
SORO DO LEITE**

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Maria Netto

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, NA ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL E APLICADA À TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CELIA DE JESÚS FRANÇA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. FLAVIA MARIA NETTO.

CAMPINAS

2012

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

França, Celia de Jesús, 1979-

F844e Efeito da polimerização com a enzima
transglutaminase na redução do potencial alergênico do
isolado protéico de soro do leite / Celia de Jesús França. --
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Flavia Maria Netto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas do soro de leite. 2. Transglutaminase.
3. Digestão in vitro. 4. 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 polymerization with the enzyme transglutaminase in
reduction the potencial allergenic of isolate whey protein

Palavras-chave em inglês:

Whey Protein

Transglutaminase

Digestion in vitro

Antigenicity

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de
Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Ricardo Lima Zoller

Lucia Del Carmen De La Hoz Urrejola

Data da defesa: 30-11-2012

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Profª Drª Flavia Maria Netto
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Lima Zoller
(Membro)

Drª.Lucia Del Carmen De La Hoz Urrejola
(Membro)

Profª. Drª Adriane Elisabete Costa Antunes de Morais
(Membro)

Profª. Drª. Maria Tereza Bertolo Pacheco
(Membro)

Bem sei eu que tudo podes e nenhum dos seus
pensamentos podem ser impedido.

(Jó 42.2)

**Ao meu Pai Sebastião Tavares de França
e ao meu irmão Eli França (*in memoriam*).**

**A minha mãe Nadir pela força, meus
irmãos (Gisleni, Rosely, Ezequiel e
Rozilda) pelo apoio constante.**

Dedico com todo meu amor e carinho!

AGRADECIMENTOS

Á Deus autor e consumidor da minha vida, pois sem ele certamente não teria chegado até aqui.

À Professora Dr^a Flavia Maria Netto, pela orientação e aprendizado que Deus possa abençoar sua vida.

Ao Professor Dr. Ricardo Zollner, por permitir que parte da pesquisa fosse realizada no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE), seu incentivo foi muito importante para mim.

Aos professores que aceitaram com muito carinho participar da banca: Prof^a Dr^a Maria Teresa Bertolo Pacheco, Prof^a. Dr^a. Adriane Elisabete Costa Antunes de Moraes, Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner e Dr^a Lucia De La Hoz, a colaboração de todos para a finalização desse trabalho foram muito valiosas.

A minha Família minha base, sem vocês não teria a força para continuar a batalhar por esse sonho, cada incentivo de idas e voltas à Campinas, foram fundamental! Mãe, Gisa, Rose, Quiel e Zil amo vocês!!

A minha igreja e amigos que fiz por lá, obrigada pelas constantes orações em momentos de tristeza, somente Deus pode recompensá-los!

Aos amigos que conquistei no LBN Eliana, Bete e Chico são muito especiais para mim, que Deus continue a abençoar a vida de todos!

As meninas companheira e amigas de laboratório, agradeço pela força, pelas risadas, pela companhia em todos os momentos sem vocês não teria tido nenhuma graça, Mariana, Milena, Isabele, Fernanda, Elisa, Janaína, Cássia e Tássia.

Aos meus professores e amigos da graduação, são responsáveis por parte desse sonho.

A Escola Superior de Educação e Tecnologia de Rio Claro pela oportunidade de estar lecionando no Curso de Nutrição a todas as minhas alunas e as minhas Coordenadoras Valéria e Carla.

Aos funcionários do Bom Prato por entenderem que este é um momento muito importante na minha vida!

E a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram neste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos, e lembrem-se sempre que somente a Deus seja dado toda honra, glória e louvor...

...Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.

RESUMO

Estudos indicam que cerca de 2,5% dos recém-nascidos sofrem reações de hipersensibilidade ao leite bovino. Os principais componentes alergênicos do soro do leite bovino são as proteínas β -Lactoglobulina (β -Lg) e α -Lactoalbumina (α -La). A enzima transglutaminase (TG) tem sido utilizada para modificar as proteínas do soro do leite, podendo reduzir o seu potencial antigênico. O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito do pH e relação enzima substrato (E:S) na polimerização do Isolado proteico do soro do leite (IPS) com a TG em diferentes condições utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, e avaliar a redução do potencial antigênico das proteínas pela suscetibilidade dos produtos obtidos à digestão com pepsina. O estudo da polimerização do IPS foi realizado por meio de experimentos fatoriais 2^2 , nos quais as variáveis independentes foram a relação enzima:substrato (E:S) (15,7 – 56,9 U TG /g de proteína) e pH (5,0 – 8,4). A variável dependente foi a polimerização das amostras avaliada pela concentração relativa das proteínas β -Lg ($[\beta$ -Lg]) e α -La ($[\alpha$ -La]) após a reação de polimerização, medida por densitometria do gel. Para o estudo da polimerização, foram realizados dois DCCR(Delineamento Composto Central Rotacional): DCCR 1 no qual foi utilizado o IPS sem qualquer tratamento e DCCR 2 no qual foi utilizado o IPS tratado termicamente. Para condição do DCCR 2, foi realizado um experimento preliminar afim de obter as melhores condições de tempo e temperatura de polimerização pela TG. A caracterização das amostras de IPS polimerizado foi realizada por eletroforese (SDS-PAGE). As amostras que apresentaram a menor $[\beta$ -Lg] foram empregadas para o estudo de resistência à pepsina, foram utilizados dois modelos de simulação da digestão gástrica: o adulto (182 U de pepsina/g de proteína, pH 2,0) e o infantil (23 U de pepsina/g de proteína, pH 4,0) seguida por caracterização por eletroforese (SDS-PAGE). A avaliação *in vitro* da antigenicidade dos digeridos gástricos foi realizada por ELISA, utilizando soro de camundongos BALB/c sensibilizados com β -Lg na forma nativa. A polimerização do IPS pela TG foi mais eficiente quando a proteína foi previamente desnaturada por tratamento térmico. No DCCR 1 ocorreu maior polimerização da α -La do que da β -Lg, indicando que esta proteína reage facilmente com a TG, mesmo sem tratamento térmico prévio. A digestão *in vitro* do IPS foi mais eficiente nas condições fisiológicas simulando o modelo adulto do que o infantil. Em ambos os modelos, a amostra tratada termicamente e polimerizada com TG (IPS/TT-TG) foi mais susceptível à pepsina e também foi a que apresentou a menor resposta frente IgE anti- β -Lg. A diminuição moderada do potencial alergênico após os tratamentos realizados sugerem que houve modificação e ou ocultação de epítomos da estrutura da proteína.

Palavra chave: Proteínas do soro de leite; Transglutaminase; Digestão *in vitro*; Antigenicidade.

ABSTRACT

Studies indicate that about 2.5% of newborns suffer from hypersensitivity reactions to cow's milk. The main allergenic components of bovine whey proteins are β -lactoglobulin (β -Lg) and α -lactalbumin (α -La). The enzyme transglutaminase (TG) has been used for modifying whey proteins, and may reduce their antigenic potential. The present work aimed at studying the effect of pH and enzyme substrate (E:S) on the polymerization of the IPS with TG under different conditions using Response Surface Methodology, and evaluate the reduction of potential of the antigenic proteins using the susceptibility of products to pepsin digestion. The study of the IPS polymerization was performed by factorial experiments 2^2 , in which the independent variables were enzyme: substrate ratio (E: S) (15.7 to 56.9 U TG / g of protein (U g^{-1})) and pH (5.0 - 8.4). The dependent variable was polymerization of the samples evaluated by the relative concentration of the β -Lg ($[\beta\text{-Lg}]$) and α -La ($[\alpha\text{-La}]$) after the polymerization reaction, evaluated by densitometry of the gel. To study the polymerization, two CRCD (Central Rotatable Composite Design) were performed: CRCD 1 in which untreated WPI was used and CRCD 2 in which WPI denatured by heat treatment was used. The characterization of the samples was performed by SDS-PAGE. The evaluation of the polymerization was achieved by the relative concentration of the proteins β -Lg ($[\beta\text{-Lg}]$) and α -La ($[\alpha\text{-La}]$) after polymerization, determined by densitometry. The samples with the lowest $[\beta\text{-Lg}]$ were chosen for the study of resistance to pepsin using two simulation models of gastric digestion, the adult (182 U pepsin / g of protein and pH 2.0) and infant (23 U pepsin / g of protein, pH 4.0). The resistance of the proteins to the action of pepsin was evaluated by SDS-PAGE. Evaluation of the antigenicity of the samples before and after gastric digestion was performed by ELISA using sera from BALB/c mice sensitized with β -Lg in its native form. Between the two designs carried out for the polymerization of WPI by TG, the one in which the WPI has previously been denatured by heat treatment was more effective. The *in vitro* digestion of WPI was more efficient under conditions simulating the physiological adult model than the infant model. In both models the sample which was heat treated and subsequently polymerized by TG was more susceptible to pepsin, and showed the lowest anti-IgE response against β -Lg, indicating that the allergenic potential was decreased after treatment. These results suggested that there was a modified and/or hidden of the epitopes.

Keyword: Whey Protein, Transglutaminase, Digestion *in vitro*; Antigenicity.

LISTA DE ABREVIações

| | |
|-----------|---|
| Ala | Alanina |
| Alúmen | Hidróxido de alumínio |
| Asp | Aspartato |
| BSA | Soro Albumina Bovina |
| CYS | Cisteína |
| DCCR | Delineamento composto central rotacional |
| E:S | Relação enzima substrato |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FSG | Fluido Similar ao Gástrico |
| Gly | Glicina |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IPS | Isolado protéico de soro de leite bovino |
| IPS/TT-TG | Isolado protéico de soro de leite bovino tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase |
| IPS-N | Isolado protéico de soro de leite bovino sem tratamento |
| IPS-TG | Isolado protéico de soro de leite bovino polimerizado com a transglutaminase |
| LF | Lactoferrina |
| MM | Massa molecular |
| PBS | Solução salina fosfatada |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |

| | |
|-------------------|--|
| pI | Ponto isoelétrico |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS |
| SH | Grupo sulfidril livre |
| S-S | Ponte dissulfeto |
| TG | Transglutaminase |
| U g ⁻¹ | Unidade de atividade enzimática por grama de substrato |
| Val | Valina |
| α-La | Alfa- Lactoalbumina |
| β-Lg | Beta- Lactoglobulina |
| [α-La] | Concentração relativa de Alfa- Lactoalbumina |
| [β-Lg] | Concentração relativa de Beta- Lactoglobulina |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reações catalisadas pela transglutaminase. Fonte: Sharma, Lorenzen e Qvist, 2001 (adaptado).....08
- Figura 2:** Fluxograma geral do experimento.....20
- Figura 3:** Fluxograma geral do ensaio biológico e imunoquímico.....27
- Figura 4:** Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais.....28
- Figura 5:** Perfil eletroforético (A): SDS-PAGE. Coluna 1: padrão massa molar 97,4 -14,4 kDa, coluna 2: IPS- (a) Imunoglobulina, (b) LF, (c) BSA, (d) Caseína, (e) Caseína, (f) β -Lg e (g) α -La. Densitograma (B) Quadro 1: padrão de massa molar 97,4 14,4 kDa, quadro 2 IPS: (a) Imunoglobulina, (b)LF, (c) BSA, (d) Caseína, (e) Caseína, (f), β -Lg e g) α -La.....30
- Figura 6:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE em meio redutor) e densitograma dos ensaios do DCCR 1.....32
- Figura 7:** Superfície de resposta e curvas de contorno para a resposta concentração relativa β -Lactoglobulina ($[\beta$ -Lg]) em função do pH e da relação enzima: substrato do DCCR1.....36
- Figura 8:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE em meio redutor) e densitograma das amostras do delineamento experimental tempo versus temperatura.....38
- Figura 9:** (A, B) Superfície de resposta e curva de contornos para a resposta da concentração relativa da β -Lactoglobulina ($[\beta$ -Lg]). (C,D) Superfície de resposta e curva de contornos resposta da concentração relativa da α -Lactoalbumina ($[\alpha$ -La]) em função do pH relação enzima:substrato.....43
- Figura 10:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE em meio redutor) e densitograma das amostras do delineamento experimental do IPS tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG).....45
- Figura 11:** Superfície de resposta e curvas de contorno para a resposta da concentração relativa β -Lactoglobulina ($[\beta$ -Lg]) em função do pH e da relação enzima:substrato.....49
- Figura 12:** Perfil eletroforético SDS-PAGE em meio redutor das amostras digeridas em condições simulando o modelo adulto. Isolado protéico do soro de leite sem tratamento (IPS-N) (A); isolado protéico do soro de leite polimerizado com a trasglutaminase (TG) IPS-TG (B) e isolado protéico do soro de leite tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG) IPS/TT-TG (C). Coluna1 padrão de MM (97- 14 kDa), coluna 2 IPS sem digestão(controle, para a o IPS-N a amostra não sofreu nenhum tipo de tratamento, as demais amostras foram tratadas, porém, sem a digestão), coluna 3 amostra digerida após 15 min do

início da digestão; coluna 4 após 30 min do início da digestão; coluna 5 após 45 min do início da digestão; coluna 6 após 60 min do início da digestão.....53

Figura 13: Perfil eletroforético SDS-PAGE em meio redutor das amostras digeridas em condições simulando o modelo infantil. Isolado protéico do soro de leite sem tratamento (IPS-N) (A); isolado protéico do soro de leite polimerizado com a trasglutaminase (TG) IPS-TG (B) e isolado protéico do soro de leite tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG) IPS/TT-TG (C). Coluna1 padrão de MM (97- 14 kDa), coluna 2 IPS sem digestão(controle, para a o IPS-N a amostra não sofreu nenhum tipo de tratamento, as demais amostras foram tratadas, porém, sem a digestão), coluna 3 amostra digerida após 15 min do início da digestão; coluna 4 após 30 min do início da digestão; coluna 5 após 45 min do início da digestão; coluna 6 após 60 min do início da digestão.....55

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial 2 ² com as variáveis independentes pH e relação enzima:substrato, respectivamente, no modelo codificado e real..... | 21 |
| Tabela 2: Concentração relativa das principais frações das proteínas do soro avaliadas pela densitometria dos géis..... | 31. |
| Tabela 3: Matriz do DCCR 1 e as respostas da concentração β-Lactoglobulina ([β-Lg]) e α-Lactoalbumina ([α-La])..... | 34 |
| Tabela 4: ANOVA para a resposta da concentração relativa da β-Lactoglobulina ([β-Lg] após a reação com a transglutaminase ([β-Lg]))..... | 35 |
| Tabela 5: Matriz do DCCR e as respostas concentração relativa de β-Lactoglobulina ([β-Lg]) e α-Lactoalbumina ([α-La])..... | 40 |
| Tabela 6: ANOVA para a resposta da concentração relativa da β-Lactoglobulina ([β-Lg]..... | 42 |
| Tabela 7: ANOVA para a resposta concentração relativa da α-Lactoalbumina ([α-La])..... | 43 |
| Tabela 8: Matriz do delineamento e as respostas da concentração relativa de β-Lactoglobulina ([β-Lg]) e α-Lactoalbumina ([α-La])..... | 47 |
| Tabela 9: ANOVA para a resposta concentração relativa da α-Lactoalbumina ([α-La])..... | 48 |
| Tabela 10: Níveis séricos de IgE (µg/mL) no soro de animais imunizados com a proteína nativa β-Lg (IgE-anti β-Lg) frente as amostras antes e após digestão com pepsina: IPS sem tratamento (IPS-N); IPS polimerizado com a transglutaminase (TG) (IPS-TG) e IPS tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG) (IPS/TT-TG). * Diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05), com n=6..... | 58 |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 01 |
| 2. Objetivos | 03 |
| 2.1 Objetivo Geral | 03 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 03 |
| 3. Revisão Bibliográfica | 04 |
| 3.1 Proteínas do soro de leite..... | 04 |
| 3.2. Modificação de proteínas com a enzima transglutaminase (TG)..... | 07 |
| 3.3 Alergia alimentar | 10 |
| 3.4 Estratégias utilizadas que podem reduzir antigenicidade das proteínas do soro de leite..... | 13 |
| 3.5. Avaliação do potencial alergênico de proteínas | 15 |
| 4- Material e Métodos..... | 19 |
| 4.1- Material | 19 |
| 4.2- Métodos | 20 |
| 4.2.1 Planejamento Experimental..... | 20 |
| 4.2.1.1 DCCR-1: Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS com a TG | 22 |
| 4.2.1.2 DCCR 2: Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS tratado termicamente com a TG..... | 23 |
| 4.2.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) | 23 |
| 4.2.2.2 Densitometria dos géis de eletroforese | 24 |
| 4.2.3 Digestão in vitro..... | 24 |
| 4.2.4 Ensaios biológicos e imunoquímicos..... | 25 |
| 4.2.5 Animais | 26 |
| 4.2.5.1 Fase de sensibilização dos animais | 27 |
| 4.2.6. ELISA – Análise dos níveis séricos de imunoglobulinas | 28 |
| 4.3 Análise Estatística | 29 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 30 |
| 5.1 Caracterização do IPS..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 5.2 Polimerização do IPS | 31 |
| 5.2.1 Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS com a TG (DCCR 1)..... | 31 |
| 5.2.2 Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS tratado termicamente com a TG (DCCR 2) | 37 |
| 5.3 Avaliação da suscetibilidade do IPS modificado ou não à pepsina Utilizando os modelos de digestão gástrico adulto e infantil | 50 |
| 5.4 Avaliação do potencial alergênico por ELISA..... | 57 |
| 6. Conclusões..... | 60 |
| 7. Referências Bibliográficas | 61 |
| Anexo1 | 73 |

1. Introdução

O leite bovino é a causa mais comum de alergia na infância e considerada uma das principais preocupações em relação à segurança dos alimentos (NOWAK-WEGRZYN et al., 2008; WANG et al., 2009). Estudos indicam que cerca de 2,5% dos recém-nascidos apresentam reações de hipersensibilidade ao leite bovino, e dentre as doenças alérgicas causadas por alimentos, a alergia ao leite bovino é responsável por 60% dos casos (SAMPSON, 1999; WANG et al., 2009).

Os principais alérgenos alimentares identificados são de natureza protéica (TAYLOR, 1992). Os principais componentes alergênicos do soro do leite bovino são as proteínas β -Lactoglobulina (β -Lg), α -Lactoalbumina (α -La) e a albumina de soro bovino (BSA) (SVENNING et al., 2000). Segundo Yoshino et al. (2004), as proteínas alergênicas apresentam as seguintes características: resistência às enzimas digestivas, estabilidade térmica e a presença de epítomos alergênicos na sua estrutura. As ligações dissulfeto intra moleculares também são importante fator na antigenicidade das proteínas, pois aumentam a capacidade de um alérgeno resistir à desnaturação (BANON et al., 2002).

As proteínas dos alimentos são degradadas pelas enzimas do trato gastrointestinal formando principalmente peptídeos. Algumas delas, no entanto, resistem ao processo de digestão e podem ser absorvidas pelo epitélio intestinal, podendo induzir a produção de anticorpos IgE específicos e causar alergia (BANON et al., 2002; YOSHINO et al., 2004). O alérgeno pode ser absorvido na sua forma intacta e imunologicamente ativa, sensibilizando o sistema imune da mucosa intestinal. Por essa razão, a digestibilidade e a permeabilidade intestinal são fatores importantes a serem considerados, pois podem influenciar no potencial alergênico das proteínas (MORENO, 2007).

A resistência das proteínas à pepsina foi proposta como uma das avaliações do potencial de antigenicidade, pois parece ser uma característica compartilhada por muitos dos alérgenos alimentares. Existe controvérsia sobre a validação deste método como um teste de avaliação do potencial alergênico das proteínas. No entanto, a resistência à digestão com pepsina utilizando um fluido similar ao fluido

gástrico (FSG) vem sendo considerada um critério relevante para avaliar o potencial alergênico de novas proteínas (MORENO, 2007). A avaliação desta característica foi incluída na árvore decisória de investigação para a avaliação da antigenicidade dos alimentos geneticamente modificados (IFBC/ILSI Decision Tree) adotado pela WHO/FAO (POULSEN, 2004).

Uma forma de modificar as proteínas do soro do leite é a utilização da enzima transglutaminase (TG). Essa enzima reduz o potencial alergênico das proteínas ao introduzir ligações cruzadas covalentes inter ou intra molecular promovendo a sua polimerização, ocultando regiões de epítomos (GAUCHE et al., 2008). Estudos mostram que a β -Lg é resistente à ação da pepsina, pela sua estrutura globular e a presença de epítomos na sua molécula, e que a sua antigenicidade pode ser reduzida pelo uso de TG (GAUCHE et al., 2008; VILLAS-BOAS et al., 2010). Estudos realizados anteriormente por nosso grupo avaliaram o efeito da reação de polimerização catalisada pela TG sobre a digestibilidade e atividade antigênica da β -Lg, indicando que houve mudanças estruturais que facilitaram a clivagem da β -Lg pelas enzimas digestivas, gerando peptídeos com baixo potencial antigênico comparados aos digeridos da proteína nativa (VILLAS-BOAS et al., 2012).

Em continuidade a esses estudos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ação da TG no potencial alergênico do isolado protéico de soro do leite bovino (IPS). Como método de avaliação foi utilizado a resistência das proteínas a ação da pepsina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar efeito da ação da enzima transglutaminase no potencial alergênico do isolado protéico de soro do leite bovino (IPS).

2.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar o IPS modificado com a enzima TG.
- Estudar o efeito do pH e relação enzima:substrato na polimerização do IPS não tratado ou tratado termicamente com a TG utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.
- Avaliar a redução do potencial antigênico das proteínas pela suscetibilidade dos produtos obtidos à digestão com pepsina e pelo teste imunológico *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Proteínas do soro de leite

O leite bovino tem aproximadamente 3,5% de proteína sendo 2,9% correspondente às caseínas e 0,6% as proteínas do soro (SGARBIERI, 1996). Caseína pode ser definida como a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado com enzima renina a pH 4,6 a 20 °C. O líquido remanescente é o lactosoro que contém cerca de 20% das proteínas, sendo que a β -Lg e a α -La constituem 70-80% desta fração (SGARBIERI, 1996).

Além dessas, são encontradas sub-frações ou peptídeos secundários, assim denominados por apresentarem em pequenas concentrações no soro de leite, compostos por: glicomacropéptido, imunoglobulinas, soroalbumina, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (HARAGUCHI et al., 2006; VAN ESCH et al., 2011).

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas; precipitação ácida no pH isoelétrico, resultando na caseína isoelétrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; e por separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e proteínas do soro na forma de concentrado ou isolado protéico (ZINSLY et al., 2001; BORGES et al., 2001).

A indústria tem se interessado pelas proteínas do soro devido à sua alta qualidade nutricional e por suas propriedades funcionais na sua forma nativa (HARPER, 1994). Quando não desnaturadas, as proteínas do soro do leite são altamente solúveis, boas formadoras de espumas e emulsões, além de formar géis a 85 °C (PELEGRINE e GASPARETTO, 2003). Formado por uma mistura de proteínas com numerosas e diversas propriedades funcionais, o soro tem um potencial considerável de utilizações (SILVA; BOLINI; ANTUNES, 2004).

O valor nutricional das proteínas do soro de leite quando comparado com outras proteínas alimentícias (ovo, queijo, carne, soja e peixes) apresenta-se superior por conter aminoácidos indispensáveis em maior concentração e também aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína, além de elevada digestibilidade (SMITHERS, 2008).

As proteínas do soro contêm várias sequências de aminoácidos com propriedades bioativas e sua hidrólise pode liberar peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades: imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, antihipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, anticolesterolemica e fatores de crescimento celular (PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001; GAUTHIER e POULIOT, 2003; SGARBIERI, 2004; PACHECO et al., 2005).

A β -Lg é uma proteína globular de massa molecular de 18,3 kDa e pI 5,2. Representa cerca de 50% do total das proteínas do soro do leite bovino. Pertence à família lipocalina e possui a capacidade de ligar e transportar pequenas moléculas hidrofóbicas (SGARBIERI, 1996; CHEISON et al., 2010). A sua estrutura primária é composta de 162 aminoácidos, contém um grupo sulfidila livre (-SH) e duas pontes dissulfeto intra moleculares (-S-S-), ligando a Cys⁶⁶-Cys¹⁶⁰ e a Cys¹⁰⁶-Cys¹¹⁹. A estrutura secundária da β -Lg consiste em folhas β antiparalelas (50%), formando nove cordas β (β -strands), em α -hélice (15%), estruturas ao acaso (15%) e estruturas em curvas (*turn structures*) (20%) (PAPIZ et al., 1986; MONACO et al., 1987). Sua estrutura terciária consiste em nove fitas β antiparalelas, oito das quais formam uma barreira hidrofóbica ao lado de uma α -hélice, o que explica a resistência desta proteína as enzimas digestivas (SGARBIERI, 1996; SÉLO et al., 1999). Já foram identificadas 11 variantes da β -Lg, sendo as mais estudadas as A e B, que diferem apenas nas posições 64 (Asp-Gly) e 118 (Val-Ala) e ambas apresentam potencial antigênico (SÉLO et al., 1999; WAL, 2004).

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 (SGARBIERI, 1996; SAWYER et al., 2002). 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).

Wit (1998) atribui à β -Lg a propriedade de transportador de retinol. A estrutura globular da β -Lg é estável aos ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, tornando-a um resistente carreador de retinol materno para o filhote. Porém, esta função biológica parece não ser importante para bebês humanos, uma vez que a β -Lg não está presente no leite humano (WIT, 1998).

A α -La é uma proteína monomérica globular, representando aproximadamente 25% das proteínas do soro do leite bovino. Já foram identificadas duas variantes genéticas (A e B), porém somente a variante B tem sido encontrada em leite das raças bovinas ocidentais. A variante B contém 123 resíduos de aminoácidos e massa molecular 14,2 kDa, apresentando quatro pontes dissulfeto. Caracteriza-se pela tendência de formar associações em pH abaixo do seu ponto isoelétrico (pI). No pH natural do leite, 6,6, e acima, a α -La apresenta-se como monômero com sua estrutura terciária, além de apresentar alta afinidade para ligação com íons cálcio, levando à maior estabilidade da estrutura secundária desta proteína (MONACI et al., 2006, SGARBIERI, 2005). Possui um perfil excelente de aminoácidos indispensáveis, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cisteína (KINSELLA e WHITEHEAD, 1989; SGARBIERI, 1996) e similaridade estrutural e composicional em relação a principal proteína do leite materno humano. É também utilizada em alimentos protéicos para esportistas, pois constitui uma boa fonte de aminoácidos de cadeia ramificada, os quais estão envolvidos no fornecimento de energia e síntese protéica muscular (WALZEN et al., 2002; HA e ZEMEL, 2003).

A soro albumina bovina (BSA) é solúvel em água, tem conformação nativa globular formada por uma cadeia polipeptídica com cerca de 580 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular 66,2 kDa e pI 4,7. É responsável por aproximadamente 5% do total das proteínas do soro de leite (SGARBIERI, 2005). Apresenta um grupo sulfidril livre na posição 34 (N-terminal) e 17 pontes dissulfeto intra moleculares (CARTER, 1994). Muitas dessas ligações dissulfeto estão protegidas no núcleo da proteína e, conseqüentemente, não são facilmente acessíveis (RESTANI et al., 2004).

A lactoferrina (LF) é uma metaloproteína com massa molecular de 86,1 kDa, que se liga fortemente a dois átomos de ferro por mole de proteína. Tem característica básica, com pI ao redor de pH 8,0. Com o conteúdo normal de ferro esta proteína é bastante resistente à desnaturação térmica, química e à ação enzimática (SGARBIERI, 1996).

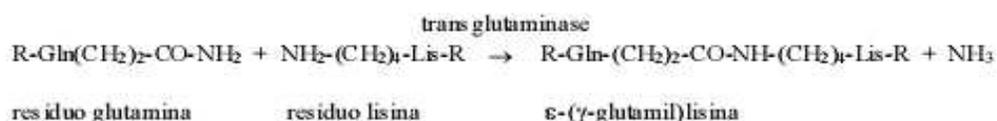
3.2. Modificação de proteínas com a enzima transglutaminase (TG)

A TG (EC 2.3.2.13) é uma enzima existente na maioria dos tecidos biológicos e fluídos corporais, exerce papel importante na coagulação sanguínea, é a única enzima utilizada comercialmente na indústria de alimentos que catalisa reação de acil transferência, introduzindo uma ligação covalente entre os resíduos de glutamina e uma grande variedade de amins primárias (GAUCHE, 2008; MOTOKI e SEGURO, 1998).

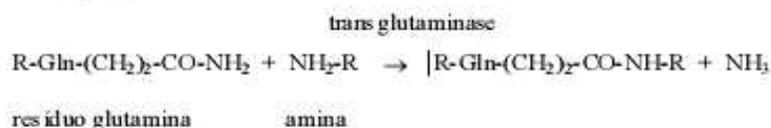
A TG catalisa três reações diferentes como mostradas na Figura 1. A TG é capaz de introduzir ligações cruzadas covalentes em sistemas protéicos por catalisar reações de acil transferência entre o grupo γ -carboxilamida de peptídeos ou glutamina ligada a peptídeos (doador de acil) e amins primárias (receptores de acil), incluindo o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina. Quando grupo ϵ -amino da lisina ligada à proteína age como um acil receptor, ligações cruzadas covalentes intra e/ou inter moleculares são formadas (ligação isopeptídica ϵ -(γ -glutamil) lisina), resultando na polimerização de proteínas. Na ausência de amins

primárias, a água pode agir como um receptor de acil, levando à desaminação dos resíduos de glutamina, formando ácido glutâmico e amônia (LORENZEN et al., 1998; JAROS et al., 2006). A reação de transferência de grupos acil pode ser usada para introduzir peptídeos ou aminoácidos em uma proteína. Assim, o uso da TG representa um instrumento importante para modificar as propriedades nutricionais de proteína dos alimentos (ZHU et al., 1995; MOTOKI e SEGURO, 1998; JAROS et al., 2006; GAUCHE et al., 2008).

Polimerização



Incorporação de aminas



Desaminação

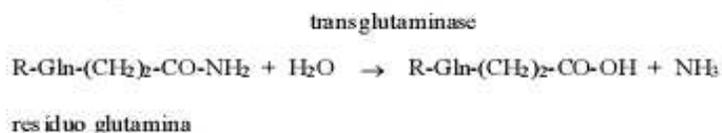


Figura 1. Reações catalisadas pela transglutaminase. Fonte: Sharma, Lorenzen e Qvist, 2001 (adaptado).

A legislação Brasileira permite a utilização da TG de origem microbiana na indústria de alimentos em concentração suficiente para o efeito desejado, sem especificar o limite máximo permitido (BRASIL, 2003). A comunidade científica reconhece a TG como uma substância segura para a ingestão humana (KURASHI et al., 2001). Pedersen et al (2004) relataram que a TG derivada da

Streptoverticillium morabense, não apresenta potencial alergênico, sendo considerada, componente seguro na modificação e produção de alimentos.

O tratamento com a TG parece favorecer aspectos sensoriais tais como: aroma, sabor, aparência e textura, e também o aumento da vida de prateleira, absorção de minerais e redução dos efeitos alérgicos de certos alimentos (SANTOS e KOBLITZ, 2008). O uso da TG está em crescimento na indústria alimentícia, pois pode melhorar as propriedades físico-químicas dos alimentos, tais como solubilidade, viscosidade, elasticidade, gelificação, capacidade emulsificante e espumante (JAROS et al., 2006). Na indústria de laticínios, a TG pode ser utilizada para aumentar a firmeza, viscosidade e cremosidade de iogurtes e sorvetes, além de reduzir a sinerese em queijos (JAROS et al., 2006).

A ligação ϵ -((γ -glutamil) lisina) catalisada pela TG é resistente à hidrólise das enzimas digestivas dos mamíferos podendo ser absorvida no intestino na forma intacta. Porém, a enzima γ -glutamilttransferase, presente nos rins, cliva essa ligação e libera para os tecidos corporais o aminoácido indispensável lisina e o ácido glutâmico (SEGURO et al., 1995).

A quantidade de ligações cruzadas induzidas pela adição da TG depende da estrutura da proteína que é utilizada como substrato. As proteínas do soro de leite, β -Lg e α -La, tendem a formar reações cruzadas menos efetivas com a TG por apresentarem estrutura globular (GAUCHE et. al., 2008).

De acordo com Sharma et al. (2001), o pré-aquecimento do leite afeta a estabilidade e leva ao desdobramento e maior flexibilidade da estrutura protéica, aumentando a suscetibilidade das proteínas à reação catalisada pela TG e, subsequentemente, a formação de polímeros. No entanto, a α -La reage tanto no leite não tratado como no tratado termicamente, enquanto a β -Lg mostrou-se bom substrato apenas quando o leite foi submetido ao tratamento térmico (SHARMA et al., 2001).

Eissa et al. (2004) avaliaram o efeito do pH (6, 7 e 8) no tratamento enzimático de proteínas isoladas de soro de leite incubando as amostra a 50 °C

por 5 horas, com 100 U TG/g de proteína. O perfil eletroforético (SDS-PAGE) mostrou que banda de β -Lg permaneceu inalterada após o tratamento enzimático em pH 6 e 7, enquanto que em pH 8 mostrou-se muito fraca, isso porque a β -Lg requer condições fracamente alcalina para que ocorresse a polimerização. No entanto, a α -La reagiu com a TG em todos os pH, indicando que pode ser rapidamente polimerizada em diferentes condições de pHs (EISSA et al., 2004).

3.3 Alergia alimentar

Alergia alimentar é caracterizada por resposta imunológica anormal a um alimento ou componente nele encontrado (HELM e BURKS; 2000). 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).

A alergia é resultado da ação de vários mecanismos, entre eles, os mediados pela imunoglobulina E (IgE) por meio de dois tipos de sensibilização: aferente e eferente. Na fase aferente ocorre um primeiro contato com o alérgeno no qual o sistema imune é sensibilizado. Já na fase eferente, ocorre um segundo contato com esse alérgeno, que irá resultar na reação alérgica e em algumas manifestações clínicas, tais como: reações cutâneas (dermatite atópica, urticária), respiratórias (rinite, asma), gastrointestinais (vômito, diarreia, cólica) e em casos extremos, choque anafilático (MORENO, 2007; BUCK, HATTERSLEY e KIMBER, 2010).

Nas doenças mediadas pelas IgE, o aparecimento dos sinais e sintomas após a ingestão de um alimento alergênico é, em geral, agudo. Após exposição subsequente, os alérgenos alimentares ligam-se às moléculas de IgE específicas e liberam os mediadores que causam os sintomas alérgicos (FERREIRA e SEIDMAN, 2005). A IgE é a que está mais associada às reações alérgicas

(BOWMAN e SELGRADE, 2007), e as proteínas são os alérgenos naturalmente mais encontrados nos alimentos (TAYLOR, 1992).

Diversos alimentos podem causar algum tipo de reação alérgica, sendo os mais citados a soja, o trigo, o ovo, o peixe, alguns cereais e o leite bovino (CLARE, GHARST e SANDERS, 2007).

Segundo Yoshino et al. (2004), as proteínas alimentares consideradas alergênicas apresentam as seguintes características: resistência às enzimas digestivas, estabilidade térmica e a presença de epítomos alergênicos na sua estrutura.

Epítomo pode ser definido como parte da estruturação da superfície de uma proteína (MORENO, 2007). São a uma sequência de aminoácidos que se liga especificamente aos anticorpos (KOPPELMAN e HEFLE; 2006). Existem dois tipos de epítomos: contínuo ou linear e conformacional. No contínuo ou linear os aminoácidos estão em sequência na estrutura primária e no conformacional, os aminoácidos estão muito próximos devido à estrutura tridimensional da proteína. O sítio de ligação do anticorpo-antígeno pode acomodar um epítomo formado por cerca de seis aminoácidos (BALL et al., 1994). Segundo Van Beresteijn et al. (1994), a proteína para ser alergênica deve ter massa molecular de 3 a 5 kDa, porém, outros autores consideram que a maioria dos alérgenos alimentares apresentam massa molecular na faixa de 10 a 36 kDa (TAYLOR et al., 1987; FERGUSON, 1984). Segundo Dupont (2010), para a ligação com o anticorpo ser possível, o alérgeno deve conter pelo menos dois epítomos que se liguem com a IgE, e cada epítomo com no mínimo 15 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos das proteínas do soro do leite bovino gerados no processo de digestão precisam ter um peso molecular maior que 3 kDa (cerca de 25 resíduos de aminoácidos) para estimular o sistema imune e causar reação alérgica (DUPONT, 2010).

As proteínas dos alimentos são degradadas pelas enzimas do trato gastrointestinal formando principalmente peptídeos. Algumas delas, no entanto, resistem ao processo de digestão e podem ser absorvidas pelo epitélio intestinal,

podendo induzir a produção de IgE específicas e causar alergia (YOSHINO et al., 2004, BANON et al., 2002). Entre os alimentos potencialmente alergênicos, o leite bovino é um dos mais comuns (MONACI et al., 2006).

Clement et al. (2002), utilizando anticorpos monoclonais, verificaram na estrutura terciária da β -Lg regiões antigênicas não só na α -hélice, *loops* externos mas também nas fitas- β . No entanto, nenhuma forma estrutural em particular foi responsável pela maior antigenicidade da β -Lg, pois os epítomos são numerosos e amplamente difundidos ao longo da proteína, podendo estar localizados nas partes hidrofóbicas da molécula, inacessíveis para as IgE na conformação nativa da proteína, porém, acessíveis depois da digestão no trato gastrointestinal (SÉLO et al., 1999).

Monaci et al. (2006) realizaram estudos com pacientes alérgicos ao leite bovino e mostraram que houve ligação de IgE sérica destes pacientes com a α -La nativa, confirmando a presença de epítomos conformacionais na estrutura desta proteína, esse mesmo estudo os autores verificaram que após a digestão, os peptídeos da α -La foram igual ou de maior capacidade de ligação com IgE, sugerindo a existência de epítomos lineares, localizados possivelmente em regiões hidrofóbicas, que podem ser expostos pela desnaturação da proteína.

Em mapeamento dos epítomos da α -La, foram identificados quatro epítomos lineares em peptídeos ligantes de IgE. No entanto, nenhuns desses epítomos foram reconhecidos pelo soro de crianças com suspeita de alergia ao leite bovino. Os autores verificaram que 72% da sequência aminoacídica da α -La do leite bovino é similar à α -La do leite humano, essa similaridade torna o seu uso possível para a alimentação de bebês, pela sua baixa antigenicidade (MONACI et al., 2006).

3.4 Estratégias que podem reduzir antigenicidade das proteínas do soro de leite

Vários processos para reduzir a antigenicidade das proteínas do leite bovino vêm sendo estudados e utilizados. Entre eles estão: hidrólise enzimática, os processos térmicos, polimerização com a enzima TG, o uso de agentes redutores, desnaturação por alta pressão entre outros processos.

As proteínas do soro são amplamente utilizadas na indústria de alimentos por apresentarem ótimas propriedades funcionais, nutracêuticas e tecnológicas. São capazes de nutrir e proteger o organismo de enfermidades; são boas formadoras de espumas, emulsões e géis (KULMYRZAEV e SCHUBERT, 2004).

A hidrólise das proteínas do leite é uma estratégia comumente empregada na redução da antigenicidade e na prevenção da sensibilização por alguns produtos alimentícios considerados alergênicos (PENG et al., 2003; IAMETTI et al., 2002; PAHUD et al., 1985). Uma desvantagem do processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de gosto amargo, relacionado à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontram no interior das moléculas protéicas. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (MINAGAWA et al., 1989; SAHA e HAYASHI, 2001).

A especificidade enzimática é um fator importante do processo de hidrólise que influi na degradação dos epítomos responsáveis pelas reações imunológicas (VAN BERESTEIJN et al., 1994). Kananen et al. (2000) mostraram que pela hidrólise da proteína do soro do leite com pepsina por 3 h e com a tripsina por 30 min resultaram em peptídeos com massa molecular < 5 kDa e foi possível alcançar um nível quase nulo de antigenicidade. A proteólise com pepsina seguida pela α -quimotripsina foi indicada como a combinação de enzimas mais eficientes na redução a antigenicidade da α -La e da β -Lg e indicando que o hidrolisado obtido poderia ser considerado um ingrediente adequado para ser aplicado às fórmulas infantis de baixa antigenicidade (ASSELIN et al., 1989; EI-AGAMY et al., 2006).

A desnaturação térmica ou química pode alterar a conformação dos epítomos, resultando na perda da estrutura terciária, conseqüentemente reduzindo o potencial alergênico (MONACI et al., 2006). Geralmente, o efeito desnaturante é provocado pela combinação de vários fatores, os quais modificam a conformação original da proteína, estes incluem temperatura, pH, força iônica entre outros (MONACI et al., 2006; ARAÚJO, 2004). O tratamento térmico, comumente utilizado para redução de patógenos, foi proposto como um procedimento para reduzir a antigenicidade de proteínas do leite (PEYRON et al., 2006; ZEECE et al, 2008).

As proteínas do leite diferem marcadamente em sua resistência ao tratamento térmico, a α -caseína é mais estável enquanto a BSA é mais instável, já a β -Lg é relativamente estável ao calor (EL-AGAMY, 2006). A β -Lg sofre desnaturação térmica em temperaturas superiores a 60 °C. Porém, a 95 °C ocorre desnaturação completa, e a β -Lg passa por extensa transformação conformacional, com exposição do seu núcleo, que são altamente reativos, e de suas áreas hidrofóbicas (SGARBIERI, 1996).

Temperaturas acima de 65 °C podem promover a formação de agregados da β -Lg, com a formação de pontes dissulfeto que podem esconder seus epítomos. Desse modo, os anticorpos somente têm acesso aos epítomos localizados na superfície da proteína agregada, podendo levar à diminuição da antigenicidade (KLEBER et al., 2004). Zeece et al (2008) e Kleber et al. (2004) relataram que a β -Lg tratada a 90 °C por 15 min teve sua capacidade de ligação com IgE reduzida significativamente, pois ocorreram modificações nas estruturas terciárias e quaternárias da proteína, com formação de pontes dissulfeto entre β -Lg e caseína. Como consequência, a disponibilidade ou exposição de epítomos da β -Lg ficou menor, levando à redução da resposta alergênica. Já a BSA e Ig perde sua antigenicidade em temperaturas de 70 – 80 °C e 100 °C respectivamente (EL-AGAMY, 2006).

Peñas et al., (2005) avaliaram o tratamento com alta pressão em conjunto com hidrólise enzimática, e consideraram como sendo a combinação uma

alternativa viável para a substituição do tratamento térmico na redução da antigenicidade. Segundo Dumay et al. (1994), a desnaturação das proteínas do soro do leite induzidas pela aplicação de alta pressão pode favorecer a exposição dos epítomos para a ação das proteases, uma vez que a pressurização altera a estrutura da molécula, facilitando a hidrólise e reduzindo a antigenicidade da proteína. A β -Lg é particularmente sensível à desnaturação por alta pressão, quando comparadas com as outras proteínas do soro do leite (KNUDSEN et al., 2002).

A polimerização com TG também tem sido utilizada para redução da antigenicidade das proteínas alimentares. A TG pode reduzir o potencial antigênico das proteínas do soro do leite, pois estas enzimas, ao introduzir ligações cruzadas covalentes inter ou intramolecular, promovem a polimerização das proteínas, ocultando regiões de epítomos (GAUCHE et al., 2008). Segundo Villas Boas et al. (2010), a β -Lg polimerizada com TG apresentou potencial antigênico reduzido, sugerindo que nestas condições ocorreram alterações nos epítomos desta proteína, avaliados por ELISA.

Wróbleswska et al. (2004) relataram que a hidrólise do concentrado protéico do soro de leite com enzima Alcalase causou diminuição significativa na imunorreatividade das proteínas do soro. No entanto, o hidrolisado permanecia alergênico, mesmo com os peptídeos apresentando baixa massa molecular. Wróbleswska et al. (2008) avaliaram a imunorreatividade dos principais alérgenos (α -La e β -Lg) do concentrado protéico de leite modificada pelas enzimas TG e Alcalase, e observaram que houve redução na imunorreatividade e antigenicidade dessas proteínas devido à alteração de sua estrutura, principalmente na área de epítomos responsáveis pela reação com IgE.

3.5. Avaliação do potencial alergênico de proteínas

A resistência à degradação proteolítica é descrita como uma das propriedades de diversas proteínas alergênicas (POULSEN, 2004). Astwood et al.

(1996) foram os primeiros a utilizarem o método da digestão com Fluido Similar ao Gástrico (FSG) para avaliar o potencial alergênico de proteínas. Neste estudo foi demonstrado que a resistência à digestão pela pepsina estava relacionada à antigenicidade de proteínas. No entanto, trabalhos como o de Fu et al. (2002) mostraram que apenas algumas dentre as proteínas alergênicas avaliadas eram resistentes ao FSG. Martos et al. (2010) verificaram falta de correlação entre a digestibilidade *in vitro* e a antigenicidade de proteína. Os autores sugerem que a falta de correlação pode ser devido às condições de avaliação.

Vários fatores, tais como: características da amostra, atividade enzimática, composição iônica, tensões mecânicas aplicadas e digestão têm influências significativas nos resultados da digestão *in vitro*. Portanto, as condições *in vivo* nunca podem ser simuladas completamente nas condições *in vitro* (HUR et al., 2010). Fatores fisiológicos e componentes das estruturas alimentares podem proteger as proteínas no ambiente digestivo, essa variação da estabilidade digestiva dos alérgenos alimentares devem ser avaliadas e assim simular o ambiente do sistema digestivo humano (MORENO, 2007).

Mesmo tendo em conta estas controvérsias, a resistência das proteínas à pepsina foi proposta como um potencial marcador para a antigenicidade. A resistência à digestão com pepsina utilizando FSG vem sendo considerada um critério relevante para avaliar o potencial alergênico de novas proteínas (MORENO, 2007). O método foi desenvolvido baseado em um fluido gástrico padrão (FGP) utilizado em ensaios pré-clínicos de fármacos, como a descrita pela *United States Pharmacopeia* (USP) (MANDALARI et al., 2009). A avaliação desta característica foi incluída na árvore decisória de investigação para a avaliação da antigenicidade dos alimentos geneticamente modificados (IFBC/ILSI Decision Tree) adotado pela WHO/FAO (POULSEN, 2004).

A abordagem central recomendada pela FAO/OMS para avaliação do potencial antigênico são as seguintes: conhecer a fonte de proteína estudada, identificação de similaridade da sequência entre os peptídeos e proteínas alergênicas conhecidas e a resistência das proteínas à hidrólise pela pepsina. As

principais etapas de recomendação da FAO/OMS foram interpretadas e utilizadas como orientação e como parte de uma avaliação global da probabilidade de antigenicidade para novas proteínas (BADERSCHNEIDER et al., 2002).

Os protocolos utilizados para avaliação da resistência das proteínas à pepsina utilizando FSG tem grande influência nos resultados obtidos (THOMAS et al., 2004) mas, mesmo sem um protocolo padronizado, a resistência à digestão com pepsina utilizando o FSG tem sido empregada para avaliar a antigenicidade de novas proteínas (MORENO, 2007).

Dupont et al. (2010) desenvolveram modelo de digestão gastrointestinal infantil a partir de análises realizadas *in vivo*. A análise foi realizada por meio da aspiração gástrica e duodenal de pacientes ileostomizados. Através dessa aspiração, os autores obtiveram informações que possibilitaram o desenvolvimento da simulação nas condições que imitavam o modelo gástrico infantil, fase da vida, no qual são mais comuns ocorrerem as alergias alimentares.

A digestão insuficiente das proteínas do soro é considerada uma das razões da sua alergenicidade, pois algumas delas em sua forma nativa não são facilmente hidrolisadas pelas enzimas digestivas, pepsina e tripsina (UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2008; KANANEN et al., 2000). Nos recém-nascidos, cuja acidez estomacal é menor que a dos adultos, as proteínas do soro de leite não são completamente hidrolisadas pela pepsina, limitando a proteólise gástrica no estômago da criança (SCHNELL e HERMAN, 2009; DUNKER et al., 2008; MONACI et al., 2006; UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2006; YOSHINO et al., 2004).

A β -Lg, principal proteína do soro de leite, em sua forma nativa, apresenta comportamento diferente das demais proteínas do soro quanto à susceptibilidade às enzimas gastrointestinais, sendo resistente à ação da pepsina (KITABATAKE e KINEKAWA, 1998; KIM et al., 2007). Esta resistência é importante e explica em parte porque as proteínas do soro de leite bovino podem causar reação alérgica

em bebês e em indivíduos que apresentam a função gástrica reduzida (UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2008; MORENO, 2007).

A β -Lg contém em sua estrutura primária cerca de 50 ligações que são potenciais sítios de clivagem da pepsina, porém, grandes partes destas ligações estão localizadas no centro hidrofóbico da molécula não sendo acessível à enzima (NACER et al., 2004). A resistência da β -Lg à pepsina pode ser atribuída a sua estrutura em cálice, onde os resíduos de aminoácidos ficam escondidos no núcleo da proteína (NIK et al., 2010).

A α -La quando na forma nativa também é muito suscetível à hidrólise pela pepsina, gerando peptídeos pequenos após a digestão (NIK et al., 2010).

Outras proteínas consideradas alergênicas são as caseínas e a ovoalbumina (MARTOS et al., 2010; YOSHINO et al., 2004; SAKAI et al., 2000). Sakai et al. (2000), em estudo sobre a resistência da caseína do leite bovino à pepsina, relataram que esta proteína foi facilmente degradada em pH entre 1,5 e 3,5 enquanto que em pH 4,0 a degradação ocorreu lentamente. Segundo os autores, esses resultados são importantes e explicam o desenvolvimento da alergia ao leite bovino em crianças.

Martos et al. (2010) avaliaram o potencial alergênico da proteína da clara de ovo (ovoalbumina) e observaram que esta proteína resiste à hidrólise com pepsina, como outros alérgenos alimentares, pois mantém a integridade dos epítomos que ocasionam a reação. Yoshino et al. (2004) avaliaram por SDS-PAGE a proteína da clara de ovo em diferentes pH (1,5 - 4,0) e observaram que a ovoalbumina foi digerida pela pepsina em pH de 1,5 e 2,0, e resistente à enzima em pH de 2,5 ou maior podendo ter potencial ligação com IgE e causar reação alérgica.

4. Material e Métodos

4.1- Material

Utilizou-se isolado proteico do soro de leite bovino (IPS) e β -Lg (variantes A e B, ~ 95% de proteína) doados pela Davigo Food International Inc. (Le Sueur, MN, EUA). As enzimas utilizadas foram: transglutaminase (Activa WM), fornecida pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), produzida por *Streptovorticillium sp.* (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 100 U/g de produto, segundo informações da empresa. A pepsina utilizada foi a de mucosa de estômago de suíno (2500 – 3500 U mg⁻¹, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

Os anticorpos utilizados foram: *Purified Mouse IgE antibody*, *Purified Rat Anti mouse IgE monoclonal antibody* (BD Biosciences San Diego, CA, EUA).

Para o ensaio biológico, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas adquiridas do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica – UNICAMP). Os demais reagentes utilizados para as análises foram de grau analítico.

A Figura 2 ilustra o fluxograma geral do experimento. O IPS foi submetido à polimerização com a TG na sua forma nativa (IPS-TG) e após desnaturação térmica (IPS/TT-TG). As amostras polimerizadas com TG foram caracterizadas por SDS-PAGE (item 4.2.2.1) e as amostras polimerizadas com TG e depois digeridas foram caracterizadas pela mesma técnica. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto à antigenicidade da proteína por meio de ensaios biológico e imunoquímicos (item 4.2.8).

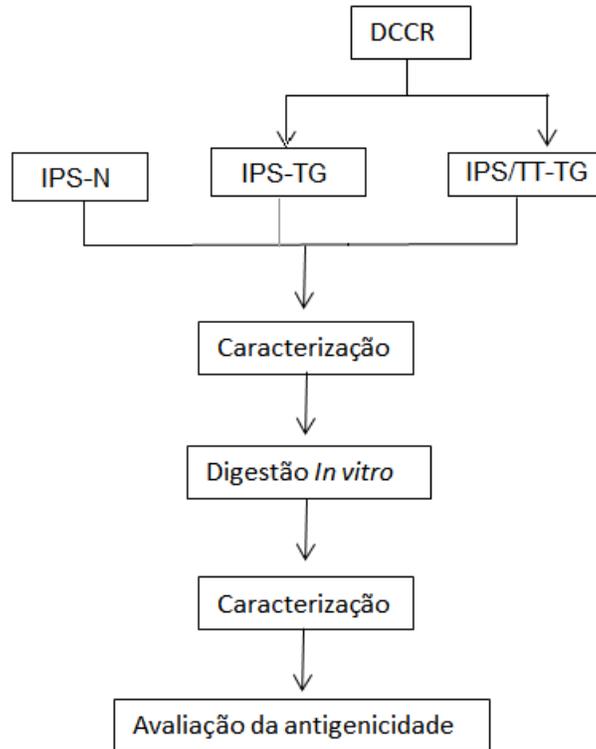


Figura 2: Fluxograma geral do experimento.

4.2. Métodos

4.2.1 Planejamento Experimental

Para o estudo da polimerização do IPS, foram realizados experimentos fatoriais do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , nos quais as variáveis independentes foram relação enzima: substrato (E:S) (15,7 – 56,9 U TG /g de proteína (U g⁻¹)) e pH (5,0 – 8,4). A variável dependente foi a polimerização das amostras avaliada pela concentração relativa das proteínas β -Lg ([β -Lg]) e α -La ([α -La]) após a reação de polimerização, avaliada pela densitometria do gel (item 4.2.2.2).

O estudo da polimerização foi realizado utilizando o IPS na forma não tratada (DCCR 1) e o IPS desnaturado por tratamento térmico (DCCR 2).

Na Tabela 1 estão as condições estabelecidas para cada um dos DCCR.

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial 2^2 com as variáveis independentes pH e relação enzima:substrato, respectivamente, no modelo codificado e real

| Ensaio | Codificado | | Real | |
|--------|------------|-------|------|------|
| | pH | E:S | pH | E:S |
| 1 | -1 | -1 | 5,5 | 26 |
| 2 | 1 | -1 | 7,9 | 26 |
| 3 | -1 | 1 | 5,5 | 46,6 |
| 4 | 1 | 1 | 7,9 | 46,6 |
| 5 | -1,41 | 0 | 5 | 36,3 |
| 6 | 1,41 | 0 | 8,4 | 36,3 |
| 7 | 0 | -1,41 | 6,7 | 15,7 |
| 8 | 0 | 1,41 | 6,7 | 56,9 |
| 9 | 0 | 0 | 6,7 | 36,3 |
| 10 | 0 | 0 | 6,7 | 36,3 |
| 11 | 0 | 0 | 6,7 | 36,3 |

Pelo fato das análises realizadas serem referentes a processos enzimáticos (possuírem grande variação), foi considerado estatisticamente significativo o nível de confiança 80% com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes. Para a elaboração dos modelos do planejamento experimental, foi utilizado o software

Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA). Também foram realizadas análises de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação (R^2), verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado aos dados experimentais.

Para a avaliação das respostas $[\beta\text{-Lg}]$ e $[\alpha\text{-La}]$ foram geradas pelo programa Statistica 7,0 a descrição gráfica dos modelos (superfícies de respostas), bem como, a projeção de seus cortes sobre o plano dos fatores gerando as curvas de contorno.

Em todos os experimentos foram realizados com 7% de proteína (m/v em água destilada) e a reação conduzida a 50 °C (EISSA et al., 2006) por 180 min, em banho termostatizado e interrompida por aquecimento das amostras a 80 °C por 2 min, seguido de resfriamento em banho de água gelada. As amostras foram liofilizadas e armazenadas para utilização posterior. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.1.1 DCCR-1: Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS com a TG

Os ensaios foram realizados de acordo com os valores apresentados na Tabela 1 da matriz do delineamento experimental. O IPS foi disperso em água destilada e a reação foi conduzida de acordo com descrito anteriormente, nas condições de pH e E:S de cada ensaio.

4.2.1.2 DCCR 2: Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS tratado termicamente com a TG

Para o desenvolvimento deste delineamento, foi realizado um estudo preliminar a fim de se obter a melhor condição do tratamento térmico (tempo/temperatura) a ser aplicado às proteínas (IPS) antes da sua polimerização com a TG. Para este estudo foi realizado um planejamento fatorial *Box-Behnken designs* 3², com as variáveis independentes: temperatura (x_1) (70 - 90 °C) e tempo (x_2) (15,0 - 60,0 min). O IPS foi disperso em água destilada (7% m/v) e após o tratamento térmico, nas condições de cada ensaio, as amostras foram resfriadas e tratadas com 15,7 U g⁻¹ TG a 50 °C por 180 min, definindo-se, então, a melhor condição de tempo e temperatura (variável dependente) para ser utilizada na polimerização do IPS com TG e realização do DCCR 2. Para o desenvolvimento do DCCR 2, o IPS foi previamente desnaturado em condições de tempo/temperatura obtidos do DCCR descrito anteriormente (72 °C / 22 min). Após o tratamento térmico, a TG foi adicionada e a reação ocorreu conforme as condições de ensaio do delineamento (Tabela 1).

4.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

As amostras de IPS e IPS polimerizado com a TG foram caracterizadas pelo perfil eletroforético determinado em sistema SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), utilizando equipamento Mini Protean II System, Bio Rad Laboratories (BioRad Laboratories, CA, EUA) e espaçadores de 1mm. O gel de separação foi 12% e o gel de empilhamento 4% acrilamida. As amostras (0,4% proteína m/v) foram diluídas em tampão redutor (0,0625 mol L⁻¹ Tris- HCl, 2,0% SDS, 20% glicerol, 5,0 % β - mercaptoetanol e azul de bromofenol, pH 6,8) e aquecidas a 96 °C/10 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 μ L por poço. Após a corrida, os géis foram corados com 0,1% Coomassie Blue R-250 (BioRad Laboratories, CA, EUA) e descorados por meio de várias lavagens em solução de ácido acético/ metanol/

água (1:4:5). Utilizou-se Kits de marcadores de massa molecular entre 14,4 a 97,4 kDa (Amersham, Upsala, Suécia).

4.2.2.1 Densitometria dos géis de eletroforese

Para avaliar o efeito do pH e da relação E:S na reação de polimerização, utilizou-se a concentração relativa das proteínas β -Lg ([β -Lg]) e α -La ([α -La]), que deve diminuir caso participem da formação dos polímeros. A concentração relativa das proteínas foi obtida pela densitometria dos géis de eletroforese. Para tanto, os géis foram escaneados (Lexmark X644 - China) e as imagens obtidas foram analisadas utilizando o software *Image J* (v1.46h). Os resultados foram expressos como % da área de cada pico em relação à somatória da área de todos os picos detectados em cada amostra. Os valores obtidos pela densitometria foram utilizados como resposta dos delineamentos experimentais realizados neste trabalho.

4.2.3 Digestão *in vitro*

Como as condições gástricas de adultos e crianças são diferentes (DUPONT et al., 2010), a digestão gástrica *in vitro* foi realizada simulando a suscetibilidade das proteínas do soro à pepsina nos diferentes estágios da vida (MARTOS et al, 2010). Foram realizados dois experimentos:

- 1- Simulação das condições fisiológicas da digestão gástrica em adultos: foi utilizado 182 U de pepsina/g de proteína e o pH ajustado para 2,0. Para avaliar o tempo em que a amostra leva para ser digerida, foram retiradas alíquotas nos tempo 15, 30, 45,60 min após o início da digestão.
- 2- Simulação das condições fisiológicas da digestão gástrica em crianças: realizada como descrita no experimento anterior, porém utilizou-se 23 U de

pepsina/g de proteína e o pH ajustado para 4,0. Também foram retiradas alíquotas para avaliar o tempo que a amostra leva para ser digerida.

Em ambos os experimentos a digestão *in vitro* com pepsina foi realizada de acordo com Martos et al. (2010) com adaptações. As amostras foram diluídas em fluido similar ao gástrico (FSG) (35 mM NaCl, ajustando o pH 2 com 1N HCl). A pepsina foi diluída no FSG na concentração para cada uma das simulações (adulto e infantil) e a concentração final da proteína foi de 5 mg/mL. A digestão foi realizada sob agitação a 37 °C por 60 min. A reação foi interrompida adicionando 1 M NaHCO₃, elevando o pH para 7-7,5. Os digeridos foram congelados e armazenados a -18 °C para posterior utilização. A avaliação da suscetibilidade das proteínas à pepsina foi feita por eletroforese em SDS-PAGE.

As amostras avaliadas foram as obtidas nas condições dos ensaios 6 (pH 8,4 e E:S 36,3 U TG g⁻¹) dos dois DCCR realizados neste trabalho. O critério utilizado para a escolha foram as amostras que apresentaram maior polimerização representada pela diminuição da [β -Lg] e da [α -La]. Além dessas amostras, foi avaliado o IPS na sua forma nativa. A nomenclatura das amostras utilizadas na digestão gástrica tanto em adultos com em crianças estão a seguir:

IPS- TG: IPS sem tratamento, polimerizado com TG nas condições indicadas pelo DCCR 1;

IPS/TT-TG: IPS tratado termicamente, polimerizado com TG nas condições indicadas pelo DCCR 2;

IPS- N (IPS na forma nativa).

4.2.4 Ensaio biológicos e imunoquímicos.

Os ensaios biológicos e imunoquímicos foram realizados com soro de animais sensibilizados com a proteína isolada β -Lg na forma nativa. A imunização dos animais foi realizada no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental

(LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – FCM da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. O fluxograma dos experimentos encontra-se na Figura 3.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNICAMP (CEEA), protocolo de número 2481-1 (Anexo 1).

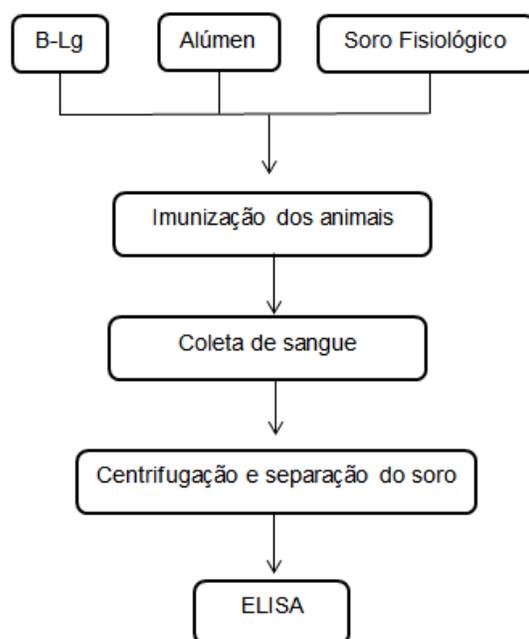


Figura 3: Fluxograma geral do ensaio biológico e imunoquímico, aprovado pelo Comitê de Ética da Unicamp.

4.2.5 Animais

O ensaio biológico foi realizado utilizando 24 fêmeas de camundongos da linhagem BALB-c com 4 semanas de vida obtidas do CEMIB da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 4 em cada, sob condições livres de patógenos (SPF) com umidade e temperatura controladas, no biotério do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – FCM da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Os

animais receberam água e ração autoclavadas *ad libitum* (padrão – Nuvilab CR-1) (Nuvital Nutrients Ltda, Colombo – PR, Brasil).

4.2.5.1 Fase de sensibilização dos animais

A sensibilização foi realizada de acordo com Villas-Boas et al. (2010). A primeira imunização realizada nos animais foi na quinta semana de vida. Os animais foram divididos em 3 grupos, e receberam por via intraperitoneal (ip) e subcutânea (sc), um total de 50 µg da proteína (β-Lg) suspensa em solução contendo adjuvante 3% Al(OH)₃ (alúmen). O grupo 1 recebeu β-Lg, o grupo 2 (controle) solução 3% Al(OH)₃ (alúmen) e grupo 3 (controle) solução salina (NaCl 09%) estéril; com volume total de 200 µL por animal.

No 14º e no 21º dia após a sensibilização inicial, os animais receberam dose de reforço via intraperitoneal. As doses foram de 20 e 50 µg respectivamente, em 200 µL de solução fisiológica estéril no 14º dia e solução 3% Al(OH)₃ no 21º dia.

Após o 30º dia da sensibilização inicial, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 70 µL com cloridrato de ketamina (Dopalen – Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia- SP Brasil) diluídos em 225 µL de soro fisiológico. Aplicou-se 0,3 µL de anestésico em cada animal para a realização da punção cardíaca e coleta de sangue. Depois de retirado, o sangue foi centrifugado a temperatura ambiente 380 x g por 5 min para obtenção do soro.

O protocolo de sensibilização está esquematizado na Figura 4.

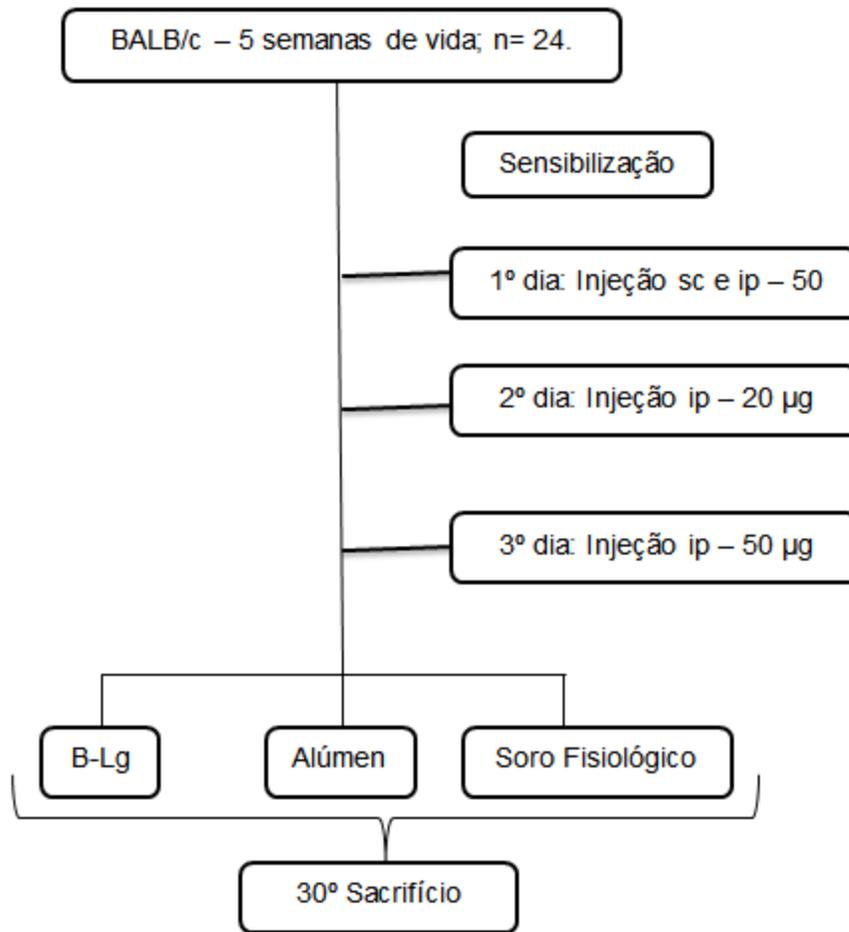


Figura 4: Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais.

4.2.6. ELISA – Análise dos níveis séricos de imunoglobulinas

A análise dos níveis séricos de imunoglobulina foi realizada segundo Brito (2006) com algumas modificações. Para análise de IgE, placas de polietileno contendo 96 poços foram adsorvidas com 100 µL das proteínas (polimerizadas e digeridas), (10 µg por poço), em 0,05 M de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 16 horas a 4 ° C em câmara úmida.

As placas foram lavadas por 3 ciclos de 10 min cada, com solução 0,05% de Tween 20 em solução salina fosfatada tamponada 0,1 M pH 7,4. Para bloqueio

dos sítios inespecíficos, utilizou-se solução de PBS e Tween 20 2,5% por 2 horas em temperatura ambiente. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL das amostras de soro correspondentes a cada animal imunizado, previamente diluídas (1:250) em solução de PBS e Tween 20 a 0,5%. Os poços destinados à realização da curva padrão foram adsorvidos com IgE (*Purified Mouse IgE*) com concentração inicial de 2000 ng/mL, seguida por diluições seriadas (1:2) em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) até a concentração de 3,9 ng/mL.

Após incubação de 16 horas, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL de anticorpo (*Anti-Rat IgG Whole molecule* – Sigma) diluído 1:500 em solução de PBS e Tween 20 0,5% e 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*) na diluição 1:60000 em PSB e Tween 20 0,5%. Após incubação de 1 hora, as placas foram lavadas novamente, seguindo-se a adição de tetrametilbenzidina (TMB), e a reação foi bloqueada após 15 min com H₂SO₄ 1 N. Os valores de absorbância foram medidos a 450 nm, em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, Toronto, Canadá).

4.3 Análise Estatística

Para análise do DCCR foi utilizado o *software STATISTICA* versão 7.0 (*Stat Soft, Tulsa, EUA*). Devido à grande variabilidade inerente aos processos que envolvem enzimas, foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 20% ($p < 0,20$) para análise de efeitos e para cálculo da análise de variância (ANOVA).

Para análise estatística do teste ELISA, utilizou-se o programa computacional InSTAT (versão 3.05, 2000). Os valores encontrados foram expressos em média com \pm desvio padrão, utilizando testes Kruskal-Wallis (não-paramétrico- ANOVA) com post-test Dunn ou teste T-student bicaudal. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do IPS

O IPS apresentou $97,8 \pm 0,8$ % de proteínas. O perfil eletroforético obtido pelo sistema SDS-PAGE 12% de acrilamida em meio redutor e por densitometria estão apresentados na Figura 5. Verificou-se que as principais frações presentes no IPS são a β -Lg, que representa 79,2% do total e a α -La, 12,8% (Tabela 2).

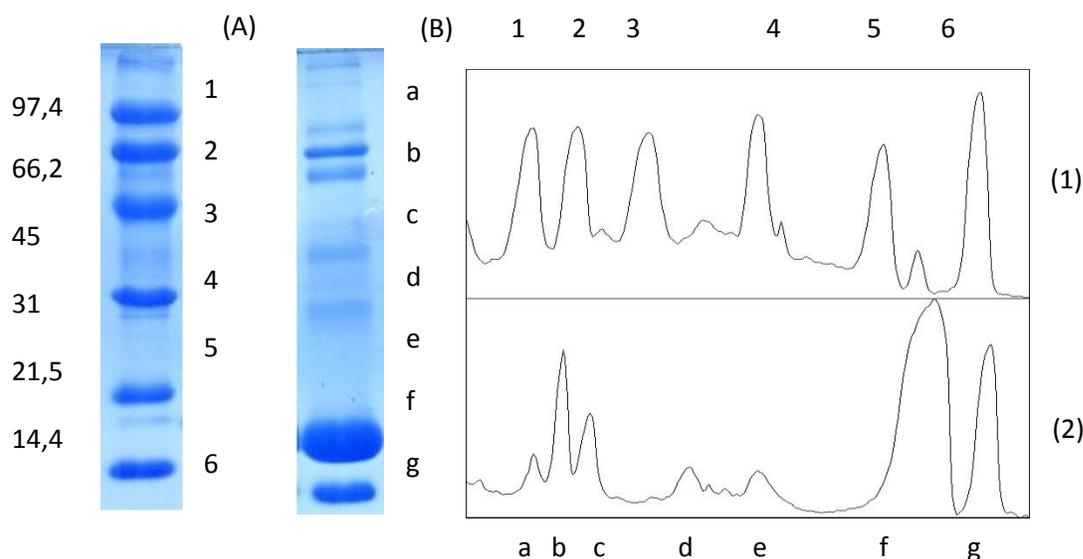


Figura 5: Perfil eletroforético (A): SDS-PAGE. Coluna 1: padrão massa molar 97,4 -14,4 kDa, coluna 2: IPS- (a) LF, (b) BSA, (c) Imunoglobulina, (d) Caseína, (e) Caseína, (f) β -Lg e (g) α -La. Densitograma (B) Quadro 1: padrão de massa molar 97,4 14,4 kDa, quadro 2 IPS: (a) Imunoglobulina, (b) BSA, (c), LF (d) Caseína, (e) Caseína, (f), β -Lg e (g) α -La.

Tabela 2: Concentração relativa das principais frações das proteínas do soro, avaliadas pela densitometria dos géis.

| IPS | MM (kDa) | % de área ¹ |
|----------------------|----------|------------------------|
| Lactoferrina | 86,1 | 1,8 ± 0,3 |
| Soro albumina bovina | 66,2 | 5,1 ± 0,8 |
| Imunoglobulina | 50,0 | 1,5 ± 0,4 |
| β- Lactoglobulina | 18,3 | 79,2 ± 2,0 |
| α-Lactoalbumina | 14,2 | 12,8 ± 1,8 |
| Total | | 100 |

¹ Os valores são médias de três determinações.

5.2 Polimerização do IPS

5.2.1 Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS com a TG (DCCR 1)

O perfil eletroforético e o densitograma das amostras obtidas no DCCR-1 estão apresentados na Figura 6. Nos perfis de todas as amostras foi observada uma banda no topo do gel de separação, possivelmente polímeros de alta MM formados pela ação da TG. Foi também observada banda referente à β-Lg, que aparece com intensidade menor no perfil da amostra do ensaio 6 (pH 8,4 e relação E:S 36,3 U TG g⁻¹). A banda referente à α-La não foi observada nos perfis das amostras dos ensaios 3, 4, 5 e 6 (pH 5,5, 7,9, 5 e 8,4 e E:S 46,6, 46,6, 36,3 e 36,3 U TG g⁻¹ respectivamente), sugerindo que esta proteína participou efetivamente da formação dos polímeros. A amostra do ensaio 7 (pH 6,7 e E:S 15,7 U g⁻¹) apresentou intensidade da banda da α-La mais forte que as outras amostras, sugerindo que nestas condições, com a menor E:S dentre as condições estudadas, a polimerização não ocorreu de forma efetiva. Estes resultados sugerem que quanto maior a relação E:S (46,6 e 36,3 TG g⁻¹), mais efetiva é a polimerização da α-La pela TG. Faergemand et al. (1997) observaram, por eletroforese, que quanto maior a concentração da enzima e do substrato

disponível, maior a formação de polímeros de alta MM (>100 kDa) e que a α -La era mais eficientemente polimerizada que a β -Lg. Segundo os autores, a α -La apresenta resíduos de glutamina e lisina disponíveis para a ação com a TG, enquanto esses resíduos estão menos disponíveis na β -Lg (FAERGEMAND et al.,1997).

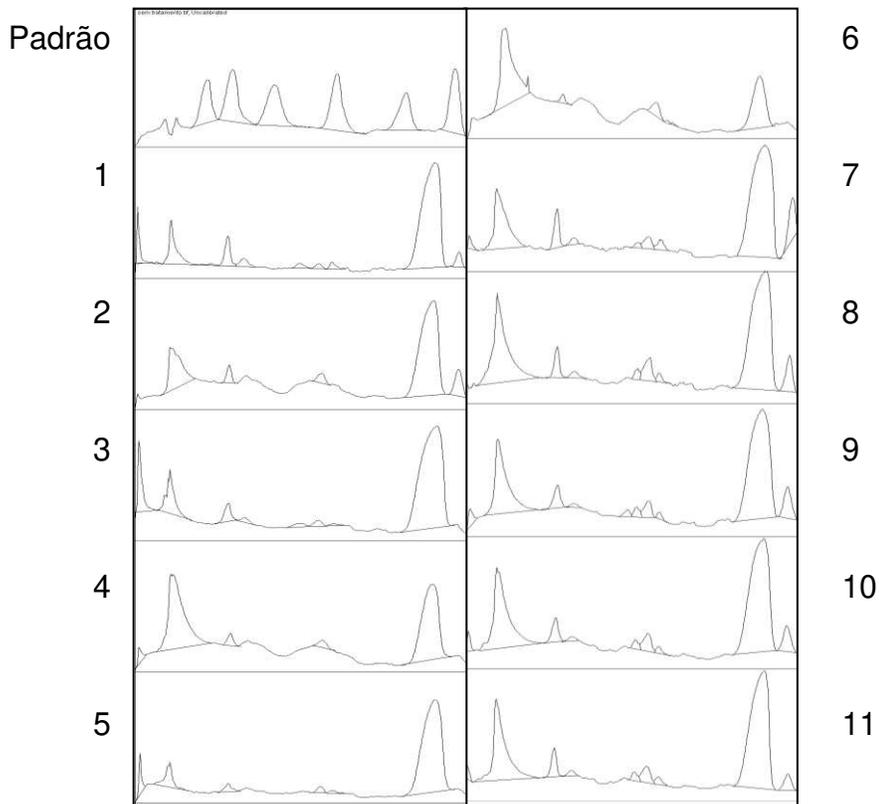
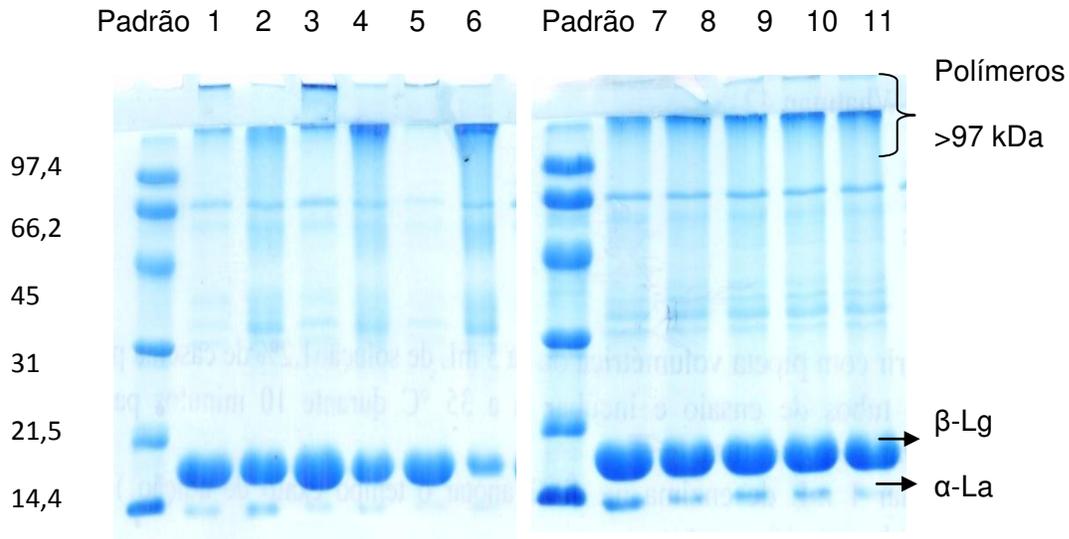


Figura 6: Perfil eletroforético (SDS-PAGE em meio redutor) e densitograma dos ensaios do DCCR 1.

A Tabela 3 apresenta a matriz do delineamento experimental do IPS polimerizado com TG e as respostas $[\beta\text{-Lg}]$ e $[\alpha\text{-La}]$. A $[\beta\text{-Lg}]$ variou de 24,8 a 86,5% enquanto a $[\alpha\text{-La}]$ variou de 0 (não detectada) a 11,4%. O menor e o maior valores da $[\beta\text{-Lg}]$ foram obtidos nas mesmas condições em que houve o total desaparecimento da $\alpha\text{-La}$ (ensaios 5 e 6) sugerindo que a $\alpha\text{-La}$ participa da formação dos polímeros em condições de pH mais amplas do que as que propiciam a polimerização da $\beta\text{-Lg}$.

Quando a reação se deu em pH 8,4, foi observado menor $[\beta\text{-Lg}]$, 24,8%, que em pH 5,0, 86,5%, o que sugere que a polimerização da $\beta\text{-Lg}$ pela TG é menos efetiva em pH ácido. Estes resultados estão em concordância com o obtido por Eissa, Bisram e Khan, (2004) que relataram que a menor concentração de $\beta\text{-Lg}$ residual após a polimerização de IPS com TG realizada em pH 8 que em pH 6 e 7. Nos valores de pH 5,1 a 6,7 a $\beta\text{-Lg}$ se apresenta como um dímero estável constituído de duas unidades esféricas. Esta conformação ocorre devido à interação eletrostática entre aspartato (Asp^{130}) e ácido glutâmico (Glu^{134}) de um determinado monômero e o resíduo lisina de outro monômero) e em pH menor que 3,0 ou maior que 8,0, os dímeros se dissociam em monômeros (SAWYER et al., 2002; SGARBIERI, 1996).

Para a resposta $[\beta\text{-Lg}]$ observa-se que o parâmetro considerado estatisticamente significativo ($p < 0,20$) foi o pH linear. Os demais parâmetros não foram considerados estatisticamente significativos, sendo excluídos do modelo matemático apresentado a seguir (Equação 1):

$$[\beta\text{-Lg}] = 61,3 - 16,5 \text{ pH}_1 \text{ (Equação 1)}$$

Tabela 3: Matriz do DCCR 1 e as respostas da concentração relativa de β -Lactoglobulina ($[\beta\text{-Lg}]$) e α -Lactoalbumina ($[\alpha\text{-La}]$)

| Ensaio | pH | E:S | $[\beta\text{-Lg}]^1$ (%) | $[\alpha\text{-La}]^1$ (%) |
|--------|-----|------|------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 5,5 | 26 | 79,3 \pm 0,2 | 2,5 \pm 1,4 |
| 2 | 7,9 | 26 | 58,4 \pm 1,7 | 5,0 \pm 2,1 |
| 3 | 5,5 | 46,6 | 67,6 \pm 5,5 | ND |
| 4 | 7,9 | 46,6 | 43,6 \pm 1,0 | ND |
| 5 | 5 | 36,3 | 86,5 \pm 5,1 | ND |
| 6 | 8,4 | 36,3 | 24,8 \pm 2,7 | ND |
| 7 | 6,7 | 15,7 | 64,7 \pm 0,8 | 11,4 \pm 3,3 |
| 8 | 6,7 | 56,9 | 59,0 \pm 4,0 | 4,7 \pm 1,0 |
| 9 | 6,7 | 36,3 | 62,8 \pm 3,0 | 6,0 \pm 2,7 |
| 10 | 6,7 | 36,3 | 58,3 \pm 2,3 | 4,3 \pm 1,5 |
| 11 | 6,7 | 36,3 | 62,9 \pm 6,4 | 2,9 \pm 2,0 |

¹ Os valores de $[\beta\text{-Lg}]$ e $[\alpha\text{-La}]$ são médias dos ensaios realizados em duplicata do experimento e da eletroforese; ND: Não detectado pela densitometria.

Após eliminação dos fatores não significativos, verificou-se a significância da regressão ao nível de confiança 80% através de análise de variância (ANOVA). Na Tabela 4 está apresentada a ANOVA para resposta [β -Lg]. A porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 86,98%, satisfazendo os requisitos para a construção do gráfico de superfície de resposta e curvas de contorno.

Tabela 4: ANOVA para a resposta da concentração relativa da β -Lactoglobulina após a reação com a transglutaminase ([β -Lg]) .

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | de Quadrado Médio | R ² |
|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| Regressão | 2329,17 | 2 | 1164,59 | |
| Resíduos | 348,80 | 8 | 43,60 | 90,1 |
| Total | 2677,98 | 10 | | |

A influência das variáveis independentes sobre a resposta [β -Lg] está apresentada nos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 7). Observa-se que as melhores condições de polimerização do IPS sem tratamento seria acima do pH 8,4 e da E:S 56,9 U TG g⁻¹, que foram as condições extremas utilizadas. Como não se obteve o valor máximo pela curva, os resultados observados sugerem que as melhores condições de polimerização do IPS seriam acima dos maiores valores de pH e da relação E:S utilizados neste trabalho.

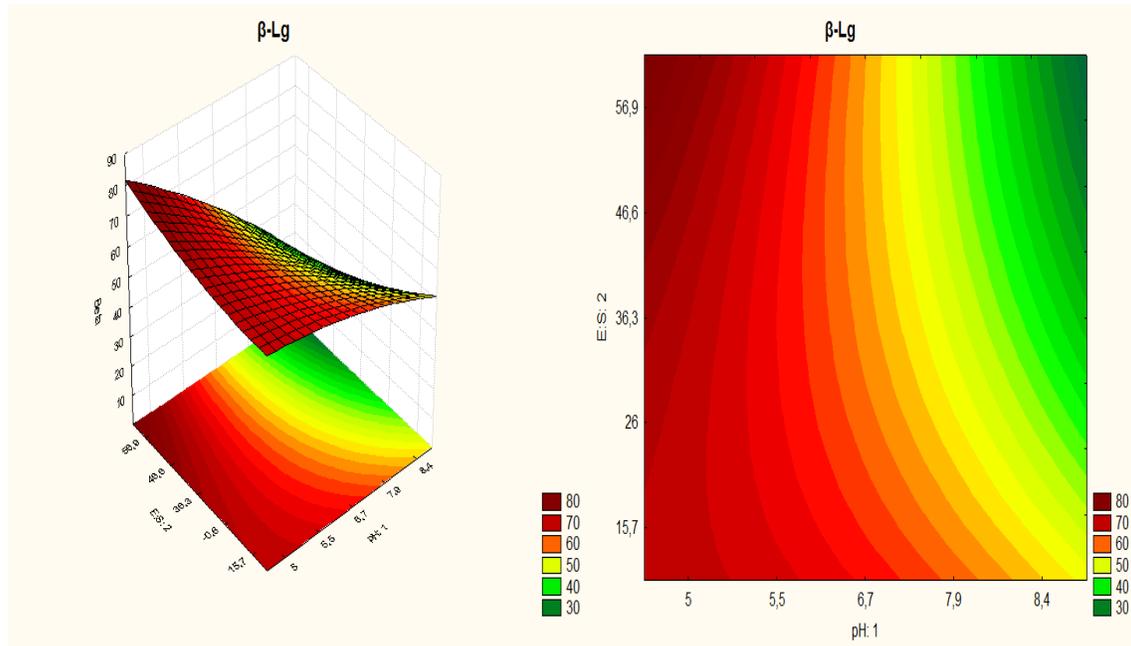


Figura 7: Superfície de resposta e curvas de contorno para a resposta concentração relativa β -Lactoglobulina ($[\beta\text{-Lg}]$) em função do pH e da relação enzima: substrato do DCCR 1

Para a resposta $[\alpha\text{-La}]$ não foi possível realizar a análise estatística, pois houve o desaparecimento total das bandas referentes a essa proteína no gel da eletroforese (ensaios 3 a 6), não sendo detectado pela densitometria e, dessa forma, não houve a geração de dados numéricos.

5.2.2 Influência do pH e relação E:S na polimerização do IPS tratado termicamente com a TG (DCCR 2)

Avaliação do tratamento térmico das proteínas do IPS

Para a avaliação do efeito do pH e relação E:S na polimerização do IPS desnaturado termicamente, foi realizado um estudo prévio para avaliar a melhor condição de tempo (15,0 - 60,0 min) e temperatura (70 - 90 °C) do tratamento térmico para a polimerização do IPS com a TG. A avaliação eletroforética e o densitograma dos polimerizados obtidos estão apresentados na Figura 8. Houve a formação de polímeros de alta MM, que podem ser vistos no topo do gel de separação. A intensidade da banda referente à α -La foi menor nas amostras referentes aos ensaios 1 a 4 que nos demais ensaios, com formação de polímeros de alta MM. Nos ensaios 5 a 11, realizados em temperatura 80 - 90 °C, a banda da β -Lg foi menos intensa que nos demais, indicando que esta proteína participou da formação dos polímeros.

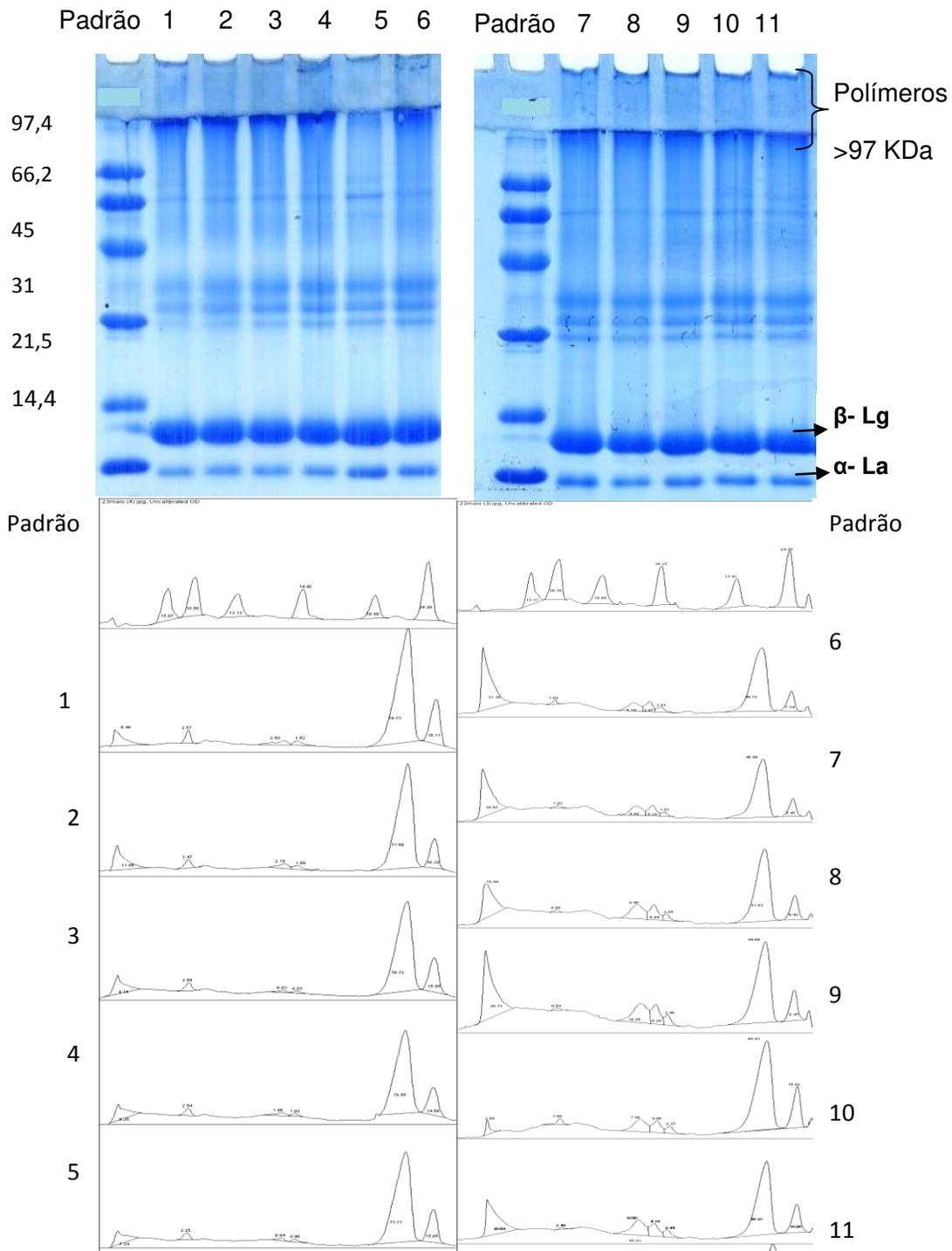


Figura 8: Perfil eletroforético (SDS-PAGE em meio redutor) e densitograma das amostras do delineamento experimental tempo versus temperatura.

As respostas [β -Lg] e [α -La] obtidas para o delineamento experimental para definição das condições de tempo e temperatura do tratamento térmico e a matriz experimental estão apresentadas na Tabela 5.

Os resultados mostraram que a [β -Lg] variou de 44,6 a 73,7 % enquanto a [α -La] variou de 7,1 a 16,1%. A menor [β -Lg] foi observada nos ensaios 4 (15 min, 80 °C), 1 e 2 com concentração relativa de 49,7 e 49,0 (15 – 37,5 min e 70 °C) respectivamente. A maior [β -Lg] ocorreu nos ensaios de 7-11, nos quais as temperaturas de tratamento foram de 80 a 90 °C, sendo que o tempo não interferiu nestas respostas. O mesmo comportamento foi observado para a resposta [α -La], onde a menor concentração relativa ocorreu em temperatura de 70 °C, e a maior nas temperaturas 80-90 °C. A β -Lg é desnaturada pelo aquecimento a temperaturas superiores a 60 °C. A 95 °C, ocorre completa desnaturação da β -Lg, refletindo em extensa transformação conformacional, com exposição de grupos nucleofílicos altamente reativos e de áreas hidrofóbicas (SGARBIERI, 1996) o que pode ter facilitado a ação da TG, pela abertura da molécula de proteína. Faergemand, Otte e Qvist (1997) observaram que α -La participou mais efetivamente na formação dos polímeros do que na β -Lg. A α -La apresenta resíduos de glutamina e lisina disponíveis para a reação cruzada com a TG, enquanto que na β -Lg esses resíduos estão menos disponíveis à reação.

Tabela 5: Matriz do DCCR e as respostas concentração relativa de β -Lactoglobulina ([β -Lg]) e α -Lactoalbumina ([α -La])

| Ensaio | Tempo | Temperatura | [β -Lg] % (X1) ¹ | [α -La] % |
|--------|-------|-------------|------------------------------------|-------------------|
| | Min | °C | | (X2) ¹ |
| 1 | 15 | 70 | 49,7 ± 0,8 | 7,1 ± 0,5 |
| 2 | 37,5 | 70 | 49,0 ± 1,1 | 7,4 ± 0,4 |
| 3 | 60 | 70 | 51,6 ± 0,05 | 9,4 ± 0,5 |
| 4 | 15 | 80 | 44,6 ± 0,5 | 8,4 ± 0,3 |
| 5 | 37,5 | 80 | 65,5 ± 4,4 | 15,0 ± 1,5 |
| 6 | 60 | 80 | 49,1 ± 1,9 | 11,1 ± 0,1 |
| 7 | 15 | 90 | 70,7 ± 0,7 | 16,1 ± 0,1 |
| 8 | 37,5 | 90 | 71,7 ± 0,4 | 10,3 ± 0,02 |
| 9 | 60 | 90 | 70,7 ± 1,7 | 15,9 ± 0,8 |
| 10 | 37,5 | 80 | 70,5 ± 2,7 | 14,7 ± 0,9 |
| 11 | 37,5 | 80 | 73,7 ± 2,8 | 15,0 ± 0,5 |

¹ Os valores de [β -Lg] e [α -La] são médias dos ensaios realizados em duplicata do experimento e da eletroforese

O parâmetro considerado estatisticamente significativo ($p < 0,10$) pelo modelo matemático foi a temperatura linear, tempo quadrático e a interação temperatura quadrática e tempo quadrático, os demais parâmetros não foram considerados estatisticamente significativos, sendo excluídos do modelo matemático apresentado a seguir:

$[\beta\text{-Lg}] = 69,9 + 11,3T_1 - 23,0t_2 + 23,4T_1^2t_2^2$ (Equação 2) onde, T= temperatura e t= tempo.

A ANOVA para a resposta $[\beta\text{-Lg}]$ está apresentada na Tabela 6. A porcentagem de variação explicada foi 90,1% para a resposta $[\beta\text{-Lg}]$, o que satisfaz os requisitos para a construção dos gráficos das superfícies de respostas e curvas de contorno (Figura 8).

O modelo de segunda ordem com as variáveis codificadas, incluindo os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,10$) está apresentado na Equação 3. A ANOVA do modelo está apresentada na Tabela 7. Os parâmetros lineares e quadráticos e as interações entre eles foram considerados estatisticamente significativos. O modelo matemático para todos os parâmetros está apresentado a seguir:

$$[\alpha\text{-La}] = 14,9 + 1,4T_1 + 1,3t_2 - 6,0T_1^2 - 5,4t_2^2 - 0,6T_1t_2 + 2,4T_1t_2^2 - 0,7T_1^2t_2 + 8,3T_1^2t_2^2$$

(Equação 3) onde, T= temperatura e t= tempo.

Tabela 6: ANOVA para a resposta concentração relativa da β -Lactoglobulina ([β -Lg])

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | R ² |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|
| Regressão | 1211,27 | 3 | 403,75 | |
| Resíduos | 133,20 | 8 | 16,65 | 90,1 |
| Total | 1344,48 | 11 | | |

A ANOVA (Tabela 7) da resposta [α -La] mostra que a porcentagem de variação do modelo pode ser explicada por 99,9%, com os parâmetros estatisticamente significativos ($p > 0,10$) satisfazendo os requisitos para a construção dos gráficos da superfície de respostas e curvas de contorno (Figura 9).

Para β -Lg, a região ótima para polimerização com a TG corresponde às condições de tratamento térmico entre 70 e 80 °C por 15 a 22 min, ou por 45 a 60 min. Para a α -La, a região ótima para a polimerização foi entre 70 a 75 °C por 15 a 22 min. Combinando-se as condições ótimas obtidas para as repostas [β -Lg] e [α -La], a melhor condição do tratamento térmico possivelmente ocorre entre 70 a 75 °C por 15 a 22 min, na qual as menores concentrações das proteínas indicam que ocorreu maior polimerização.

Tabela 7: ANOVA para a resposta concentração relativa da α -Lactoalbumina ($[\alpha$ -La])

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | R ² |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|
| Regressão | 124,23 | 8 | 15,53 | |
| Resíduos | 0,08 | 2 | 0,04 | 99,9 |
| Total | 124,31 | 10 | | |

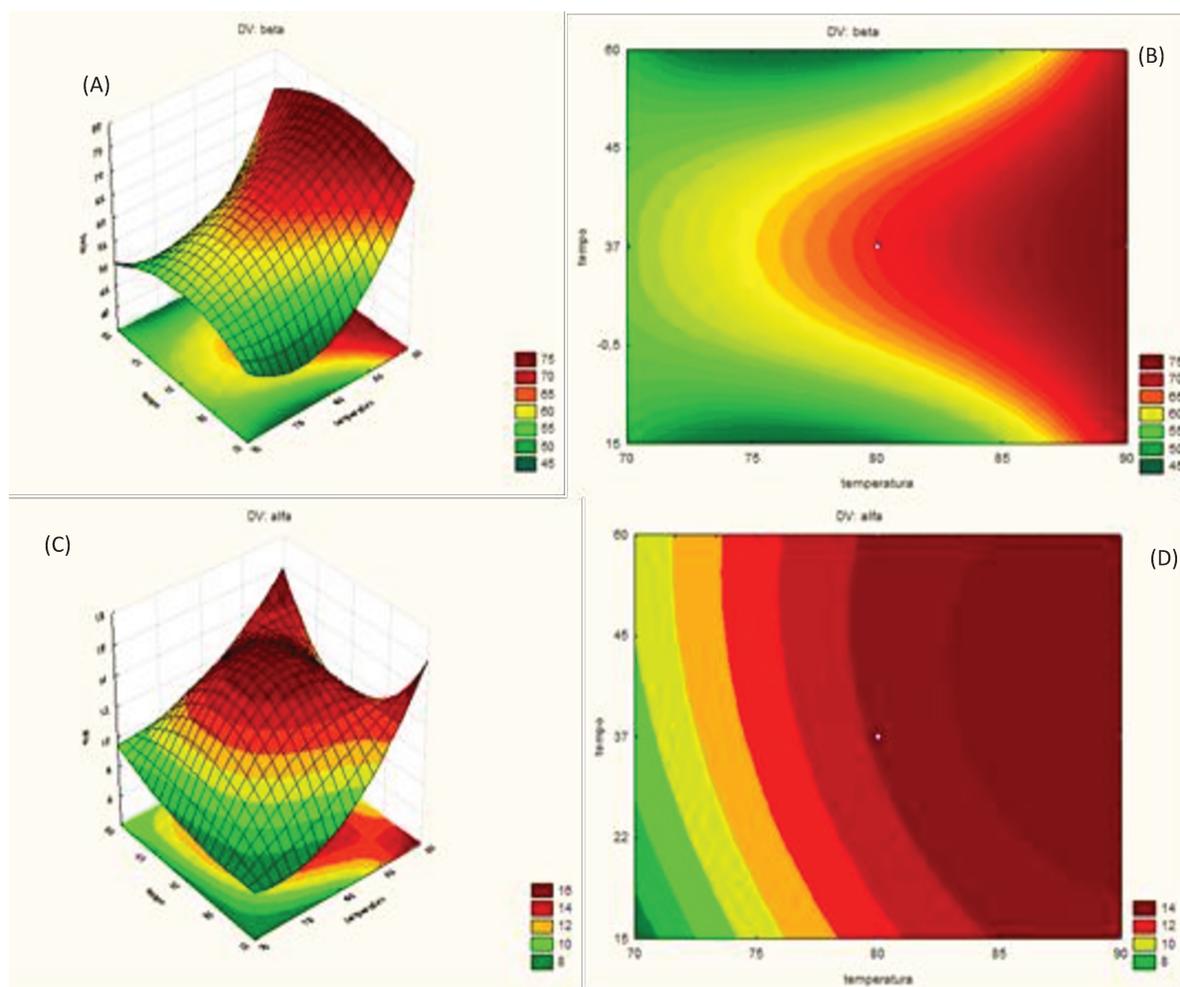


Figura 9: (A, B) Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta da concentração relativa da β -Lactoglobulina ($[\beta$ -Lg]). (C,D) Superfície de resposta para a resposta e curva de contornos da concentração relativa da α -Lactoalbumina ($[\alpha$ -La]) em função do pH e relação enzima:substrato.

Influência do pH e da relação E:S na polimerização do IPS pela TG

Utilizando a resposta do delineamento para definição das condições do tratamento (tempo /temperatura), foi realizado o DCCR 2 para avaliar o efeito do pH e da relação E:S na polimerização do IPS tratado termicamente. Desta forma, as amostras foram tratadas a 72 °C/ 22 min e, em seguida foi realizada a reação de polimerização com TG nas condições específicas de cada ensaio do delineamento experimental.

O perfil eletroforético das amostras do delineamento experimental e os densitogramas estão apresentados na Figura 10. Nas amostras obtidas nos ensaios 2, 4 e 6 (pH 7,9, 7,9 e 8,4 e E:S 26, 46,6 e 36,3 U TG g⁻¹ respectivamente) a intensidade da banda referente à β -Lg foi menor que a dos demais ensaios indicando que nestas condições a polimerização com a TG foi mais efetiva. O pH alcalino facilitou a ação da TG, mesmo considerando-se diferentes E:S. Nos ensaios com pH ácido e neutro (5 – 5,5 e 6,7), a polimerização ocorreu de forma parcial, com a banda da β -Lg aparecendo de forma mais intensa na eletroforese.

Os resultados do presente trabalho, em concordância com os obtidos por Eissa, Bisran e Khan (2004), sugerem que em pH alcalinos (7,9 -8,4) a polimerização com a TG é mais eficiente. Estes autores avaliaram o efeito do pH entre 6 e 8 sobre a polimerização de proteínas do soro de leite por TG com a reação ocorrendo a 50 °C/ 5h, com 100 U de TG g⁻¹, concluíram que o pH 8 é ideal para ocorrer à reação de polimerização das proteínas do soro de leite pela TG.

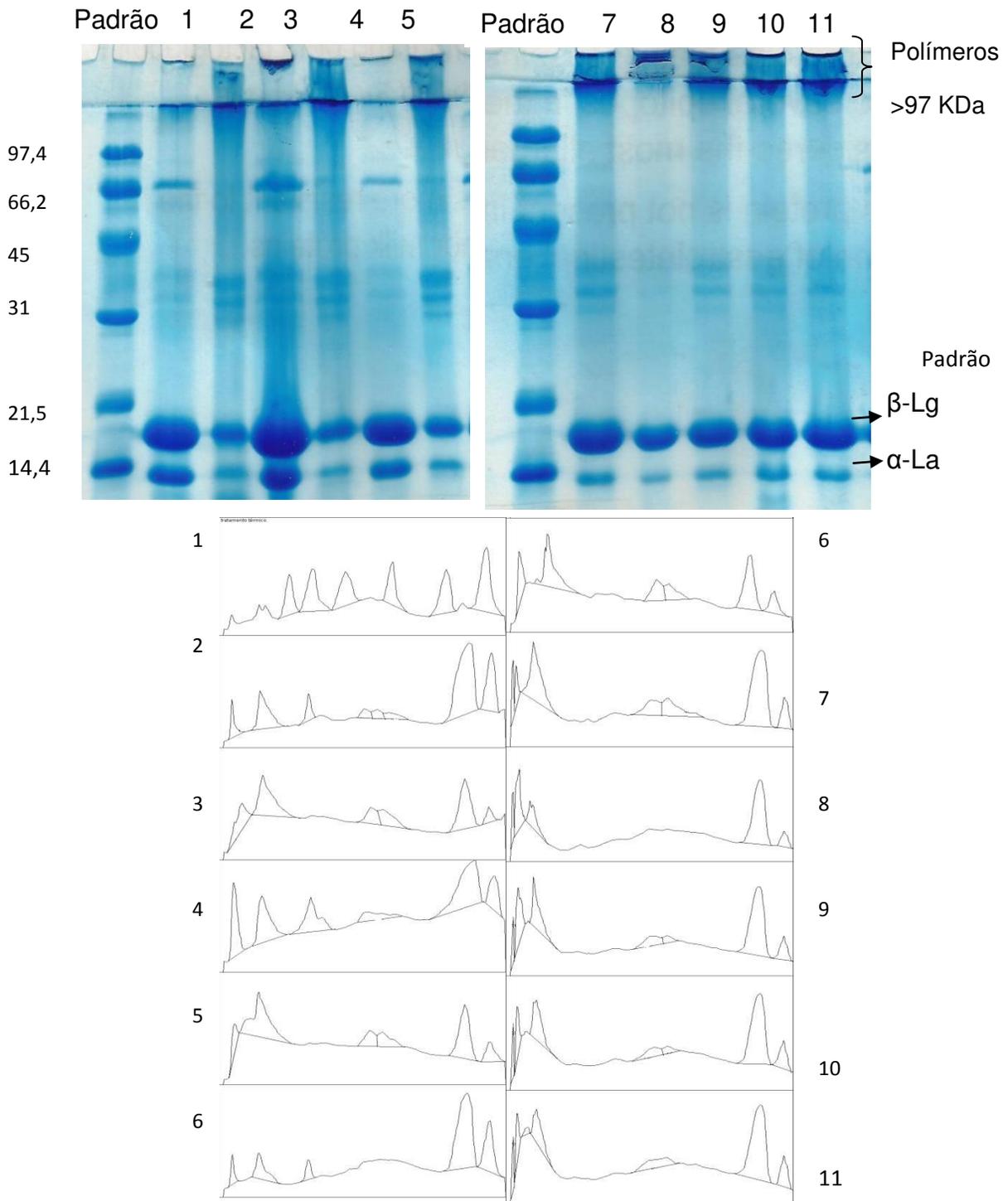


Figura 10: Perfil eletroforético (SDS-PAGE em meio redutor) e densitograma das amostras do delineamento experimental do IPS tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG).

O perfil eletroforético das amostras dos ensaios 1, 3 e 5 (pH 5,5, 5,5 e 5 e E:S 26, 46,6 e 36,3 U TG g⁻¹ respectivamente) apresentaram a banda referente à α -La mais intensa que dos demais. Foi possível observar que houve formação de polímeros de alta MM (>97 kDa), indicada pelo aparecimento de bandas que não conseguiram penetrar no gel de separação. Estes fatos sugerem que nestas condições a reação com a TG ocorreu, porém de forma parcial.

A Tabela 8 apresenta a matriz do delineamento experimental e as respostas [β-Lg] e [α-La]. A [β-Lg] variou de 33,6 a 55,5 % enquanto a [α-La] variou de 5,5 a 17,9 %. A menor [β-Lg] foi obtida nos ensaios 2,4 e 6, em pH entre 7,9 - 8,4, e em diferentes E:S (26, 46,6 e 33,3 U g⁻¹ de proteína), o que sugere que a E:S não interferiu na polimerização da β-Lg com a TG. Contudo, a maior [β-Lg], sugerindo menor participação desta proteína na formação de polímeros, foi obtida em pH 5 (ensaio 5) próximo ao pI desta proteínas (pI 5,2). Os demais ensaios apresentaram concentração relativa menor que 53% e foram obtidas em pH neutro (7,0).

A menor [α-La] foi obtida quando o IPS foi polimerizado com a maior relação E:S foi referente ao ensaio 8 (56,9 U g⁻¹ de proteína e em pH 6,7). A maior [α-La] foi obtida no ensaio 5 (36,3 U g⁻¹ de proteína e em pH 5,0), indicando que tanto a E:S quanto o pH são fatores interferente para os resultados obtidos.

Tabela 8: Matriz do delineamento e as respostas da concentração relativa de β -Lactoglobulina ($[\beta\text{-Lg}]$) e α -Lactoalbumina ($[\alpha\text{-La}]$)

| Ensaio | pH | E:S (U g ⁻¹) | $[\beta\text{-Lg}]$ (%) ¹ | $[\alpha\text{-La}]$ (%) ¹ |
|--------|-----|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 5,5 | 26 | 54,4 ± 0,3 | 20,9 ± 2,0 |
| 2 | 7,9 | 26 | 33,8 ± 2,7 | 6,1 ± 0,1 |
| 3 | 5,5 | 46,6 | 46,7 ± 3,9 | 12,1 ± 1,2 |
| 4 | 7,9 | 46,6 | 33,6 ± 0,5 | 8,5 ± 1,7 |
| 5 | 5 | 36,3 | 59,0 ± 0,4 | 17,9 ± 0,05 |
| 6 | 8,4 | 36,3 | 33,9 ± 4,2 | 8,5 ± 2,2 |
| 7 | 6,7 | 15,7 | 48,4 ± 0,6 | 6,9 ± 0,5 |
| 8 | 6,7 | 56,9 | 55,5 ± 3,2 | 5,5 ± 0,6 |
| 9 | 6,7 | 36,3 | 46,8 ± 0,7 | 6,6 ± 0,2 |
| 10 | 6,7 | 36,3 | 53,4 ± 1,9 | 7,9 ± 0,04 |
| 11 | 6,7 | 36,3 | 53,1 ± 0,8 | 7,2 ± 0,3 |

¹ Os valores de $[\beta\text{-Lg}]$ e $[\alpha\text{-La}]$ foram obtidos de são de ensaios realizados em duplicata e da eletroforese também realizada em duplicata

Para resposta [β -Lg], as variáveis estudadas (pH e a E:S) não exercem efeitos sobre a resposta ($p > 0,20$). Dessa forma, não foi possível estabelecer um modelo matemático em função destas variáveis.

Para a resposta da [α -La] os parâmetros considerados estatisticamente significativos foram: pH linear, pH quadrático e a interação entre pH e E:S. O parâmetro E:S quadrático não foi considerado estatisticamente significativo.

A ANOVA para a resposta [α -La] está apresentada na Tabela 9. Os parâmetros considerados estatisticamente significativos ($p > 0,20$) foram utilizados para se obter o modelo matemático. A porcentagem de variação explicada é de 90,14%, satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de respostas e curvas de contorno (Figura 11). O modelo matemático está a seguir:

$$[\alpha\text{-La}] = 7,2 - 3,9\text{pH}_1 - 3,5\text{pH}_1^2 + 2,7\text{pH}_1\text{E:S}_2 \text{ (Equação 4)}$$

Tabela 9: ANOVA para a resposta concentração relativa da α -Lactoalbumina ([α -La])

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | R ² |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|
| Regressão | 225,35 | 2 | 112,67 | |
| Resíduos | 24,64 | 8 | 3,08 | 90,14 |
| Total | 250,00 | 10 | | |

Nos gráficos da superfície de resposta e da curva de contorno geradas pelo modelo, observou-se que a menor [α -La] foi obtida em pHs acima de 7,9 e E:S menor que 26 U TG g⁻¹. Esta faixa de pH e E:S foi a melhor condição de polimerização dessa proteína quando o IPS foi tratado termicamente antes da reação com a TG. O tratamento térmico (80 °C/60 min) expõe resíduos de lisina e

glutamina das proteínas do soro de leite aumentando a suscetibilidade para formação de ligações cruzadas com a TG (JONG e KOPPELMAN, 2002; SHARMA, et al., 2002; EISSA et al., 2006; RODRIGUEZ- NOGALES, 2006). Lauber et al. (2001) reportaram maior da polimerização com a TG quando a β -Lg e outras proteínas globulares foram previamente desnaturadas por tratamento térmico.

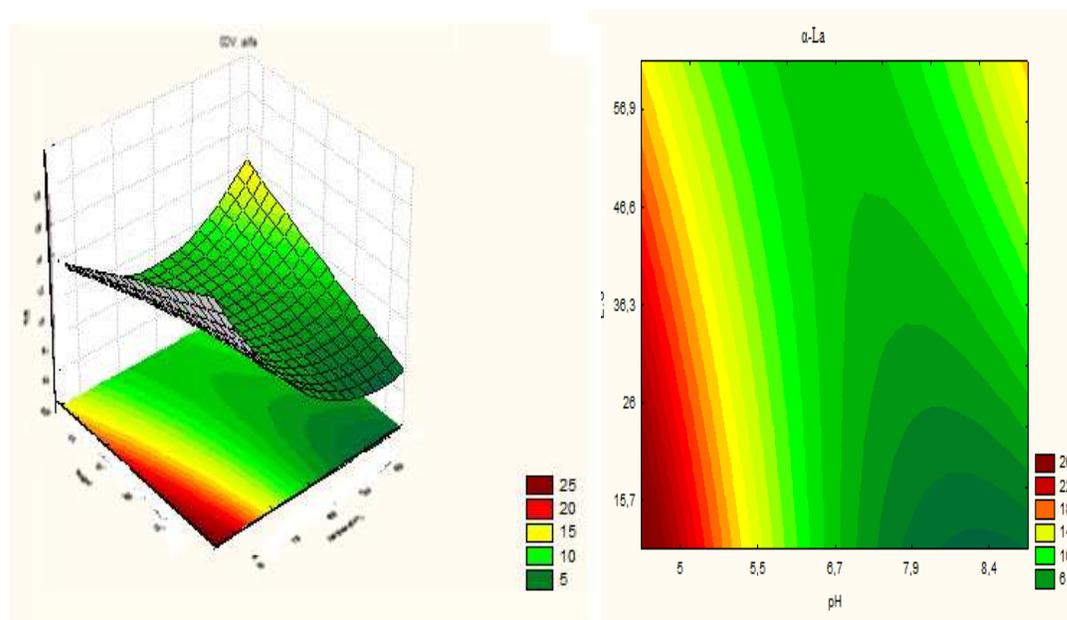


Figura 11: Superfície de resposta e curvas de contorno para a resposta da concentração relativa β -Lactoglobulina ($[\beta$ -Lg]) em função do pH e da relação enzima: substrato.

Comparando-se os resultados dos dois DCCR realizados neste trabalho observa-se que no DCCR 2 no qual o IPS foi tratado termicamente antes da polimerização com a TG, ocorreu maior formação de polímeros do que no DCCR realizado com o IPS não tratado, sugerindo que a desnaturação térmica facilitou a ação da enzima na formação de polímeros. No DCCR 1, no qual o IPS foi utilizado sem tratamento prévio, ocorreu maior polimerização da α -La do que da β -Lg, indicando que esta proteína reage facilmente com a TG, mesmo sem tratamento

térmico prévio. A [α -La] neste experimento variou de 2,5 a 11,4% enquanto que no DCCR 2 variou de 5,5 a 20,9%.

A [β -Lg] no DCCR 1 variou de 24,8 a 86,5% e no DCCR 2 de 33,6 a 59,0% sugerindo que a desnaturação térmica facilitou a ação da TG. Segundo De Jong e Koppelman (2002), algumas proteínas, como a β -Lg, precisam do pré-tratamento térmico para melhor ação da TG.

5.3 Avaliação da suscetibilidade do IPS modificado ou não à pepsina utilizando os modelos de digestão gástrico adulto e infantil

As proteínas dos alimentos sofrem alterações significativas à medida que passam pelo trato gastrointestinal. A hidrólise de proteínas inicia-se no estômago com a pepsina e continua no intestino através da ação de proteases pancreáticas, incluindo tripsina, quimotripsina, e peptidases. A α -La nativa em solução é suscetível à hidrólise por várias proteases, incluindo a pepsina, em contraste, a β -Lg nativa é resistente às enzimas proteolíticas presentes no tratogastrointestinal (NIK et al. 2010).

Uma proteína resistente à digestão no trato gastrointestinal mantém a integridade da sua estrutura e possui potencial maior de estimular reações no sistema imunológico. Pequenas quantidades de proteínas intactas ou parcialmente digeridas quando absorvidas pelo intestino podem entrar no sistema circulatório em circunstâncias normais do processo fisiológico. Por isso, a capacidade de alérgenos alimentares alcançar a mucosa intestinal intactos é considerada um dos requisitos para sua antigenicidade (FUCHS e ASTWOOD, 1996; NIK et al., 2010).

Outro fator importante a ser considerado é a quantidade de pepsina secretada no processo de digestão nas diferentes fases da vida. Nas crianças, o pH estomacal é mais alto e a secreção de pepsina é menor que em adultos, por essa razão as proteínas do soro de leite apresentam resistência à ação da

pepsina, principalmente quando consumidos por crianças (UNTERSMAYR e JENSEN-JAROLIM, 2006; YOSHINO et al., 2004).

O potencial alergênico das proteínas do soro de leite modificadas foi avaliado pela suscetibilidade da β -Lg e da α -La à pepsina. As amostras selecionadas para esta avaliação foram as que apresentaram maior polimerização, ou seja, as que apresentaram as menores [β -Lg] e [α -La] nos dois delineamentos realizados neste trabalho. As amostras analisadas foram, então, as obtidas nas condições do ensaio 6 dos delineamentos DCCR 1 e DCCR 2, denominadas IPS-TG e IPS/TT-TG, respectivamente. Também nesta fase do estudo foi analisado como controle o IPS não tratado (IPS-N).

Os perfis eletroforéticos dos digeridos da simulação da digestão gástrica de adultos e crianças, por até 60 min, das amostras polimerizadas ou não pela TG estão mostrados nas Figuras 12 e 13.

Após a digestão nas condições de adulto, o perfil da amostra IPS-N mostrou que banda da α -La desapareceu após 15 min de digestão, indicando que esta proteína não apresentou resistência à pepsina. Porém, a banda da β -Lg permaneceu inalterada, indicando que é resistente à digestão nas condições avaliadas por até 60 min. Resultados semelhantes foram encontrados por Dupont et al. (2010) que relataram que a β -Lg foi altamente resistente à pepsina, mantendo-se inalterada depois de 60 min de digestão em pH 2,0. A β -Lg em pH ácido tem em seu núcleo formado por folhas- β altamente ordenadas, no entanto, o restante da molécula possui estrutura mais flexível e desordenada, que permite maior acessibilidade da pepsina, porém, a maior parte da proteína ainda continua resistente à pepsina (DUPONT et al., 2010).

No perfil da amostra IPS-TG observa-se que após 15 min de digestão, não foi detectada a banda da α -La, sugerindo que esta proteína não foi resistente à ação da pepsina. A banda da β -Lg permaneceu mesmo após 60 min de digestão, indicando a resistência dessa proteína à pepsina quando polimerizada com a TG.

Para a amostra IPS/TT-TG, as bandas de β -Lg e α -La apresentaram bem definidas, no início da digestão. Após 15 min de digestão houve o desaparecimento da banda referente à α -La. A banda referente a β -Lg permaneceu em todos os tempos de digestão avaliados, indicando sua resistência à pepsina mesmo após o tratamento térmico e polimerização com a TG.

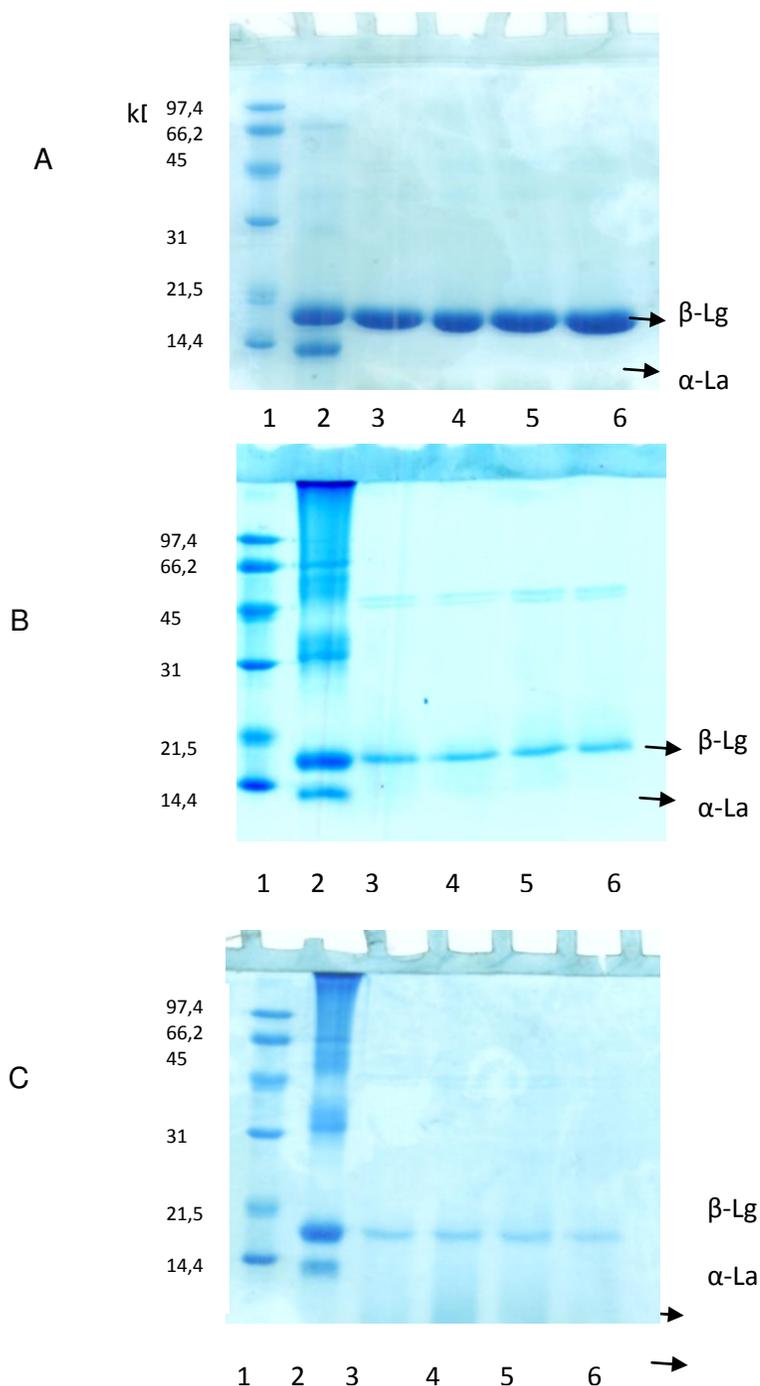


Figura 12: Perfil eletroforético SDS-PAGE em meio redutor das amostras digeridas em condições simulando o modelo adulto. Isolado protéico do soro de leite sem tratamento (IPS-N) (A); isolado protéico do soro de leite polimerizado com a trasglutaminase (TG) IPS-TG (B) e isolado protéico do soro de leite tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG) IPS/TT-TG (C). Coluna 1 padrão de MM (97- 14 kDa), coluna 2 IPS sem digestão(controle, para o IPS-N a amostra não sofreu nenhum tipo de tratamento, as demais amostras foram tratadas, porém, sem a digestão), coluna 3 amostra digerida após 15 min do início da digestão; coluna 4 após 30 min do início da digestão; coluna 5 após 45 min do início da digestão; coluna 6 após 60 min do início da digestão.

Os perfis eletroforéticos em sistema SDS-PAGE dos digeridos gástrico simulando as condições fisiológicas em crianças estão apresentados na Figura 13.

Após a digestão da amostra IPS-N, observa-se (Figura 13-A) que as bandas de α -La e de β -Lg permaneceram intactas após 60 min de digestão, indicando que estas proteínas são resistentes à ação da pepsina nas condições que simulam a digestão gástrica de crianças (pH 4,0 e 23 U de pepsina/g de proteína). Cabe ressaltar que o pH utilizado para a realização desta análise encontra-se acima da faixa ótima de ação da pepsina (pH 1,5 -2,5), mostrando a ineficácia da enzima no pH utilizado como simulação das condições gástricas em crianças (YOSHINO et al., 2004).

No perfil eletroforético do digerido da amostra IPS-TG (Figura 13- B) observa-se que a ação da pepsina sobre a amostra foi parcial, pela permanência de banda referente à proteína β -Lg, indicando que esta proteína é resistente à pepsina mesmo depois de 60 min de reação.

Após a digestão da amostra IPS/TT-TG (Figura 13-C), observou-se o desaparecimento da α -La após 30 min de digestão, assim como diminuição da intensidade das bandas referentes aos polímeros formados pela reação com a TG. Os resultados sugerem que os produtos formados pela reação com a TG após o tratamento térmico foram parcialmente digeridos pela pepsina. A β -Lg, porém, permaneceu em todos os tempos de digestão.

No modelo de digestão gástrica infantil, a banda da β -Lg, mesmo após tratamento térmico e polimerização com a TG, permaneceu intacta. Resultados semelhantes foram reportados por Kitabatake e Kinekawa (1998) e Nik et al. (2010) onde que após o tratamento de proteínas do leite com pepsina em pH 3,5 - 4,0, as bandas referentes à α -La e BSA desapareceram, enquanto que a banda referente à β -Lg permaneceu intacta.

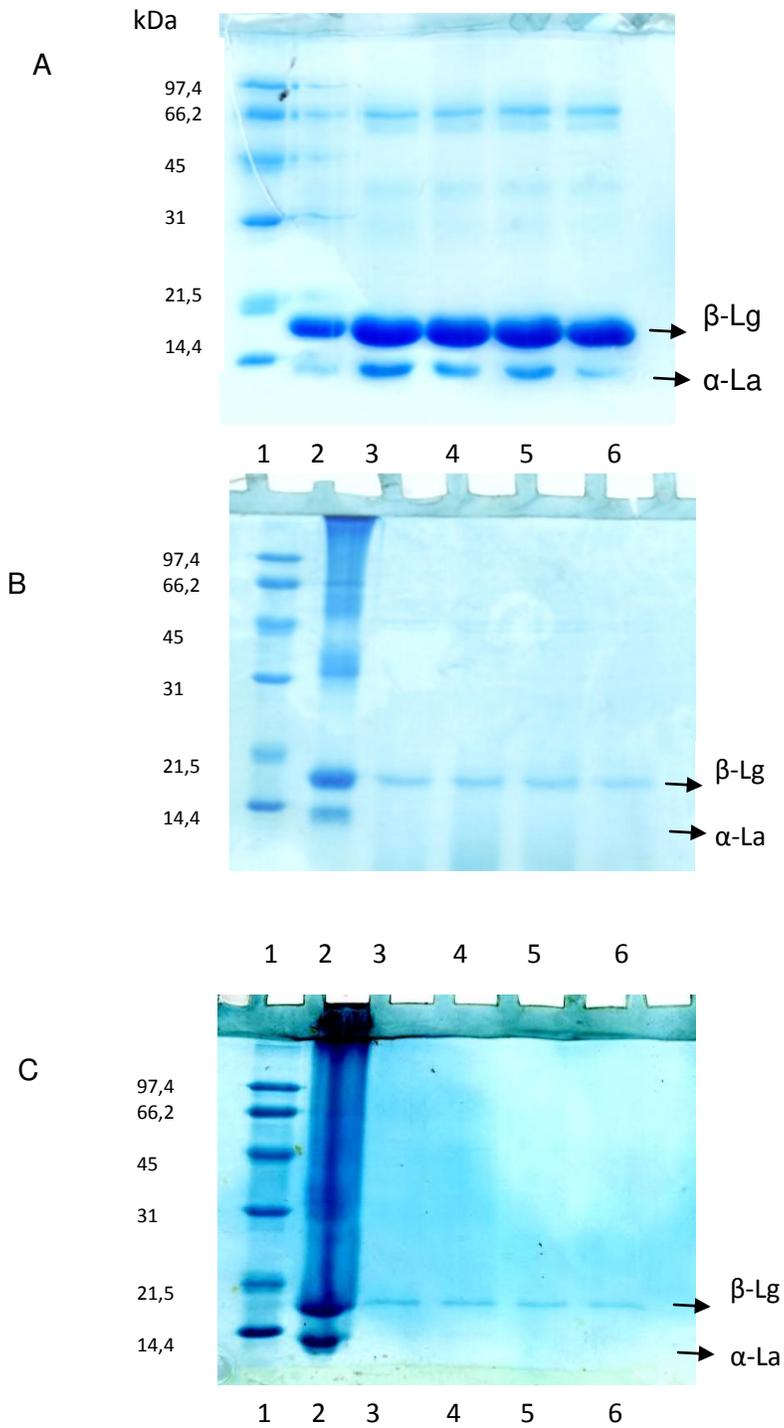


Figura 13: Perfil eletroforético SDS-PAGE em meio redutor das amostras digeridas em condições simulando o modelo infantil. Isolado protéico do soro de leite sem tratamento (IPS-N) (A); isolado protéico do soro de leite polimerizado com a trasglutaminase (TG) IPS-TG (B) e isolado protéico do soro de leite tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG) IPS/TT-TG (C). Coluna1 padrão de MM (97- 14 kDa), coluna 2 IPS sem digestão (controle, para a o IPS-N a amostra não sofreu nenhum tipo de tratamento, as demais amostras foram tratadas, porém, sem a digestão), coluna 3 amostra digerida após 15 min do

início da digestão; coluna 4 após 30 min do início da digestão; coluna 5 após 45 min do início da digestão; coluna 6 após 60 min do início da digestão.

Em ambos os modelos de digestão estudados, a banda da β -Lg da amostra IPS-N permaneceu, indicando que esta proteína é resistente à digestão com pepsina nos diferentes pHs e concentrações de pepsina utilizadas. A α -La, nas condições do modelo adulto, não apresentou resistência à pepsina, porém foi constatada sua presença nas condições do modelo infantil, indicando certo grau de resistência à enzima.

Quando comparada a digestão das amostras IPS-TG dos modelos adulto e infantil, os resultados mostraram que no modelo adulto ocorreu a diminuição da intensidade da banda da β -Lg e o desaparecimento da banda referente à α -La. Todavia, nas condições do modelo infantil, ocorreu a permanência da banda de β -Lg, indicando a sua resistência à pepsina em pH mais elevado. Comportamento semelhante foram encontrados por Sakai et al. (2000) para a caseína bovina, que 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 adulto e a secreção da pepsina é menor, assim as proteínas sofrem menor digestão possibilitando a sensibilização e potencial reação alérgica.

Para a amostra tratada termicamente e polimerizada com a TG (IPS/TT-TG) digerida nas condições de ambos os modelos, a α -La não apresentou resistência à ação da enzima, porém a β -Lg apresentou resistência parcial à pepsina nos dois modelos estudados. Villas-Boas et al. (2012) observaram que não ocorreu degradação da β -Lg na forma nativa pela pepsina, enquanto que a β -Lg polimerizada com TG, embora ainda não totalmente degradada, foi completamente hidrolisada.

5.4 Avaliação do potencial alergênico por ELISA

As amostras analisadas quanto à capacidade de ligação com IgE anti- β Lg foram IPS-TG, IPS/TT-TG e IPS-N antes e após a simulação da digestão com pepsina utilizando os modelos de digestão gástrica de adultos ou infantil.

Para esta análise foi utilizado o soro de animais imunizados com a β -Lg. A β -Lg foi empregada na imunização por ser a proteína majoritária no IPS e a mais alergênicas encontradas no leite (WAL, 2001) e por ser a fração mais resistentes ao processo de digestão utilizando dois modelos adulto e infantil.

Os soros dos animais sensibilizados com alúmen ou solução salina frente às amostras digeridas não apresentaram resposta quando comparadas às amostras testadas, quando avaliados frente à IgE-anti β Lg.

Os níveis séricos de IgE anti β -Lg frente às amostras IPS-TG, IPS/TT-TG e IPS-N e os seus digeridos do modelo gástrico de adulto (182 U pepsina/mg, pH 2,0), do modelo infantil (23 U pepsina/mg, pH 4,00 e também das amostras não digeridas (controle) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Níveis séricos de IgE ($\mu\text{g/mL}$) no soro de animais imunizados com a proteína nativa $\beta\text{-Lg}$ (IgE-anti $\beta\text{-Lg}$) frente as amostras antes e após digestão com pepsina: IPS sem tratamento (IPS-N); IPS polimerizado com a transglutaminase (TG) (IPS-TG) e IPS tratado termicamente e polimerizado com a transglutaminase (TG) (IPS/TT-TG).

| Amostra | IgE ($\mu\text{g/mL}$) | | |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Controle (não digerido) | Digerido modelo Adulto | Digerido modelo Infantil |
| IPS- N | 43,32 \pm 5,17 ^{a;A} | 18,46 \pm 2,93 ^{a;B} | 120,80 \pm 8,4 ^{a;C} |
| IPS-TG | 33,67 \pm 3,25 ^{a;A} | 17,57 \pm 4,60 ^{a;B} | 95,31 \pm 14,60 ^{a;C} |
| IPS/TT-TG | 20,53 \pm 3,69 ^{b;A} | 14,87 \pm 2,54 ^{b;A} | 86,44 \pm 17,68 ^{b;B} |

Os valores são médias de ensaios realizados com soro de seis animais, e avaliados em duplicata. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística, pos-teste Kruskal-Wallis, $p < 0.05$

A concentração de IgE anti- $\beta\text{-Lg}$ variou de 14,87 $\mu\text{g/mL}$ a 120,80 $\mu\text{g/mL}$, sendo a menor concentração frente ao digerido com o modelo adulto da amostra IPS/TT-TG e a maior concentração ao digerido com modelo infantil da amostra IPS-N.

As amostras digeridas utilizando o modelo infantil foram as que apresentaram maior resposta frente a IgE-anti $\beta\text{-Lg}$, quando comparadas ao digerido no modelo adulto e controle (não digerido). A pepsina é uma enzima proteolítica ativa em meio altamente ácido (pH ótimo de 1,8 a 3,5). Entretanto, em pH acima de 4,0 apresenta pouca atividade proteolítica e é totalmente inativada em pouco tempo (REMACLE e LAWSON; 2006). A especificidade enzimática é um fator importante na hidrólise, pois a posição de clivagem das ligações peptídicas resulta em fragmentos protéicos com diferentes sequências aminoacídicas. Esta especificidade influi na degradação dos epítomos responsáveis pelas reações imunológicas (VAN BERESTEIJN et al., 1994). As condições de pH (4,0) e a relação E:S (23 U/mg de proteína) da digestão simulando o modelo infantil não foram eficientes para a quebra da $\beta\text{-Lg}$. Epítomos

presentes na estrutura da β -Lg podem ter sido expostos ou e/criados e/ou levado a criação de novos epítomos mantendo assim a antigenicidade das proteínas. As condições do modelo adulto, pH 2,0 e 182 U/mg de proteína, foram mais eficientes na clivagem dos epítomos existentes e estes estavam menos disponíveis após a digestão, sugerindo este processo de digestão foi mais eficaz na diminuição da antigenicidade das proteínas do soro.

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. Possivelmente os sítios de clivagem da proteína podem ter sido ocultados pela à polimerização. Alguns autores sugerem que as ligações cruzadas formadas pela TG podem reduzir a ação da pepsina (TANG et al., 2006; STANIC et al.,2010). Villas-Boas et al (2012) concluíram 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. 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 polimerização por TG não foi capaz de alterar os epítomos existentes na proteína.

6. Conclusões

A polimerização das proteínas do soro de leite com a TG foi efetiva e promoveu à formação de polímeros de elevada MM >97 kDa, conforme avaliado por eletroforese (SDS-PAGE) e pela densitometria dos géis. A avaliação das concentrações relativas das proteínas α -La e β -Lg permitiu concluir que ambas participaram da formação de polímeros, sendo a α -La foi a que mais participou.

De acordo com o obtido pela utilização da Metodologia de Superfície de resposta a melhor condição de polimerização ocorreu quando o IPS foi tratado termicamente (DCCR2), nas condições de pH 8,4 e E:S 36,3 U g⁻¹.

A digestão *in vitro* do IPS, foi mais eficiente com a simulação com o modelo adulto do que com o modelo infantil. Em ambos os modelos a amostra tratada termicamente e polimerizada com TG (IPS/TT-TG) foi mais digerida e também foi a que apresentou menor resposta de ligação com a IgE, que as amostras IPS-N e IPS-TG. Estes resultados indicam que o potencial antigênico foi diminuído por modificar e ou ocultar regiões de epítomos na proteína.

Os tratamentos realizados no IPS foram capazes de modificar a estrutura da proteína devido a sua polimerização, e foram capazes de diminuir moderadamente o seu potencial antigênico.

7. Referências Bibliográficas

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.

ASTWOOD, J. D.; LEACH, J. N.; FUCHS, F. L.; Stability of food allergens to digestion in vitro. **Nature Biotechnology**, v.14, n.10, p.1269-1273, 1996.

BADERSCHNEIDER, B. et al. Sequence analysis and resistance to pepsin hydrolysis as part of an assessment of the potential allergenicity of ice-structuring protein type III HPLC 12 **Food and Chemical Toxicology** v. 40, p. 965–978, 2002.

BALL, G. et al. A major continuous allergenic epitope of bovine β -lactoglobulin recognized by human IgE binding. **Allergy**, v.24, p. 758-764, 1998.

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

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

BORGES, P. F. Z. et al. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 1-8, 2001.

BÖNISCH, M. P., 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.

BOWMAN, C. C., SELGRADE, M. K. Differences in allergenic potential of food extracts following oral exposure in mice reflect differences in digestibility: potential approaches to safety assessment. **Toxicological Sciences** v.102, p. 100-109, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 348, de 02 de dezembro de 2003 . Aprova de forma complementar ao Anexo da Resolução

CNNPA n.º 24 de 1976, a utilização de enzimas na indústria de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.

CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**. 1994.

CHEISON, S. C.; et al. Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of b-lactoglobulin: Analysis by LC–ESI-TOF/MS **Food Chemistry** v.121 p.457–467, 2010.

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

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

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

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

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

DUMAY, E.M.; KALICHEVSKY, M.T.; CHEFTEL, J.C. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and the baroprotective effects of sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 1861- 1868, 1994.

DUNKER, K. L.L.; ALVARENGA, M.; MORIEL, P. Grupo do Leite, Queijo e Iogurte. In: Philippi, S. T. **Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição**. Barueri, SP: Manole, p.101-165, 2008.

EISSA, A.S., BISRAM, S.; KHAN,S.A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low using transglutaminase enzyme. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, n.14, p. 4456-4464, 2004.

EI-AGAMY, E.I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**. v.68, p. 64–72. 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.

FERGUNSON, A. C. Food Allergy. **Program Food Nutrition Science**, v.8, p. 77-107, 1984.

FERREIRA, C. T.; SEIDMAN, E. Alergia alimentar: atualização prática do ponto de vista gastroenterológico. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 1, p. 7-20, 2007.

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.

FUCHS, R. L., ASTWOOD, J. D. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. **Food Technology**, v.50, p.83–88, 1996.

GAUCHE, C.; VIEIRA, J. T. C.; OGLIARI, P. J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase **Process Biochemistry** v.43 p. 788-794, 2008.

GAUTHIER, S.F. e POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Journal Dairy Science**., v.86, p.78-87, 2003.

GOMES, R. A. S.; BATISTA, R. P.; ALMEIDA, A. C.; FONSECA, D. N.; JULIANO, L.; HIAL, V A fluorimetric method for the determination of pepsin activity. **Analytical Biochemistry** v.316, p.11–14, 2003.

HA, E. e ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review) **Journal Nutrition Biochemistry**, v.14, p. 251-258, 2003.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HARPER, W.J. Whey proteins. **Food Technology New Zealand**, v.19, n.1, p.21-28, 1994.

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

HERMAN, R. A., et al. Stability of set of allergens and non-allergens in simulated gastric fluid. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.58, p. 125-141, 2007.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry** v.125 p. 1–12, 2011.

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

JAROS, D. et al. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications, **Journal of Texture Studies**, v. 37, p. 113-155, 2006.

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

JOYE, I. J., LAGRAIN, B., DELCOUR, J.A. Endogenous redox agents and enzymes that affect protein network formation during bread making – A review. **Journal of Cereal Science**, v.50, p. 1-10, 2009.

KANANEN, A.; et al. J, A. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal** v.10, p. 691-697, 2000.

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.

KINSELLA, J.E. ; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food & Nutrition Research.**, v.33, p.343-437,1989.

KITABATAKE, N.; KINEKAWA, Y. Digestibility of milk whey protein and β -Lactoglobulin in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 46,n. 12 4917-4923, 1998.

KLEBER, N. et al. The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induce aggregation. **European Food Research Technology**. V.219, p. 105-110, 2004.

KNUDSEN, J.C. et al. Effect of high hydrostatic pressure on the conformation of β -lactoglobulin A as assessed by proteolytic peptide profiling **International Dairy Journal** v.12, p.791–803, 2002.

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

KULMYRZAEV, A.; SCHUBERT, H. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids** , 18, 13–19, 2004.

KURASHI, C., YAMAZAKI, K.; SUSA, Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v.17, n.2, p. 221-246, 2001.

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

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

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

LUCEMA, M., ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C. Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates production of milk derivatives as a base for infant formulas. **Separation and Purification Technology**, v.52, 310–316, 2006.

MAIER, I., et al. 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.

MANDALARI, G. et al. In vitro digestibility of β -casein and β -lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 55, p. 372 -381, 2009.

MARTOS, G.; et al. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58 p. 5640-5648, 2010.

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

MONACI, L. et al. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, v.223, p. 149-179, 2006.

MONACO, H.L.; et al. Crystal structure of the trigonal form of bovine β -lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**., v. 197, p. 695- 706, 1987.

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

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

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.

NIK, A. M.; WRIGHT, A. J.; CORREDIG, M. Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion **Journal of Colloid and Interface Science** 344 - 372–381, 2010.

NOWAK-WEGRZYN, A.; et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. **Journal Allergy Clinic Immunology** v.122 p.342-347, 2008.

PACHECO, M.T.B; DIAS N.F.G; BALDINI, V.L; TANIKAWA, C e SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos do soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, n.2, p.333-338, 2005.

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.

PAPIZ, M.Z.; et al. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma and retinol-binding protein. **Nature**, v.324, p. 383-385, 1986.

PEDERSEN et al. Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO decision tree. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 48, n.6, p. 434 -440, 2004.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.1, p.57-65, 2003.

PENG, H.J. et al. Effect of ingestion of cow's milk hydrolysed formulas on whey protein-specific Th2 immune responses in naïve and sensitized mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p. 663-670, 2003.

PEREIRA. A.C. S.; MOURA, S. M.; CONSTANT, P. B. L. Food allergy: system immunologic and main food involved. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 189-200, 2008.

PEYRON, S. et al. Effects of treatment and pectin addition on β -lactoglobulin allergenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 5643-5650, 2006.

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

POMS, R. E.; KLEIN, C. L.; ANKLAN, E. Methods for allergens analysis in food: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 48, p. 413 – 423, 2004.

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

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

REMACLE M, LAWSON, G. Diagnosis and management of laryngopharyngeal reflux disease. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**.v. 14, p.143-149. 2006.

RESTANI, P.; et al. Characterization of bovine serum albumin epitopes and their role in allergic reactions Allergy. **Allergy Supplement**. v.59, n. 78 p. 21-24, 2004.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. Effect of preheats treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat Milk proteins. **Process Biochemistry**. v.41 p. 430-437, 2006.

SAHA B. C., HAYASHI K. Research review paper: Debittering of protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**., v. 19 p. 355-370, 2001.

SAKAI, K., et al. Effects of pH variation and NaCl on in vitro digestibility of cow's milk proteins in commercially available infant formulas. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v.46 p. 325 -328, 2000.

SAMPSON HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. **Journal Allergy Clinical Immunol**. v.103 p.717-728.1999.

SANTOS, L. F.; KOBLITZ, M. G. B. Proteases IN: KOBLITZ, M. G. B 2008 **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. 1ª ed., p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SAWYER, L., et al. Milk protein structure – what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p. 299-310, 2002.

SCHMIDT, D.G., MEIJER, R.J., SLANGEN, C.J., VAN BERESTEIJN, E.C., Raising the pH of the pepsin-catalyzed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. **Clinical and Experimental Allergy** v.25 n.10, p.1007–1017, 1995.

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

SEGURO, K. et al. ϵ -(γ -glutamyl) lysine: hydrolysis by γ -glutamyltransferase of different origins, when free or protein bound. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1997-1981, 1995.

SÉLO, L.; CLÉMENT, G.; BERNARD, H. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clinical and Experimental Allergy**, v.29, p.1.055-1.063, 1999.

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

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite **Brazilian Journal Food Technology**., v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

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

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

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A.; ANTUNES, A. J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

SMITHERS, G. Review Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal** , 18, 695– 704, 2008.

STANIC D.,MONOGIUDIE, et al; Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked β -casein. **Molecular Nutrition e Food Research**, v. 54, n. 9, p. 1273–1284, 2010.

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

TAYLOR, S. L. Chemistry and detection of food allergens. **Food Technology**., v.5, p.146- 152, 1992.

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.

UNTERSMARYR, E.; JENSEN-JAROLIN, E. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. **Journal Allergy Clinical Immunology**. V.121 p.1301-1308, 2008.

VAN ESCH, B. C. A. M. et al. In vivo and in vitro evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. **Toxicology Letters**, v. 201, p. 264-269, 2011.

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

VILLAS-BOAS, M. B.; VIEIRA-FERRO, 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.

VILLAS-BOAS, M. B.; FERNANDES, M. A.; ZOLLNER, R. D. L.; NETTO, F. M. Effect of polymerization with transglutaminase on in vitro digestion and antigenicity of β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 25, n. 2, p. 123-131, 2012.

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

WANG, C. H.; DAMODARAM, S. Thermal gelation of globular proteins: weight-average molecular weight dependence of gel strength. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n.5, p. 1157- 1164, 1990.

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

WANG,J.; et al. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy **Journal Allergy Clinic Immunology**, v.125 p. 695-702. 2010.

WHITHAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food science**. 2 ed. California: Marcel Dekker, 1994, 625 p.

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

WRÓBLEWSKA, B., et al. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p. 839–850, 2004.

WRÓBLEWSKA, B., et al. Influence of Alcalase and Transglutaminase on Immunoreactivity do Cow Milk Whey Proteins **Czech Journal of Food Sciences**. v. 26, p 15 -23, 2008.

YOSHINO, K. et al. 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.

ZEECE, M. HUPPERTZ , T., KELLY, A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin Innovative **Food Science and Emerging Technologies** v.9, p.62–69, 2008.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial Transglutaminase - a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44 p.277–282, 1995.

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V. C.; PEREIRA DIAS, N. F. G.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal Food and Technology**, v. 4, p. 1-8, 2001.



UNICAMP

CEUA/Unicamp

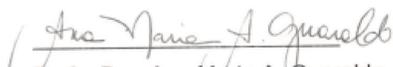
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

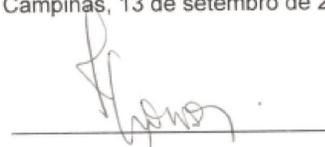
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Efeito da polimerização com a enzima Transglutaminase na redução do potencial alergênico do isolado protéico do soro do leite" (protocolo nº 2481-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Flavia Maria Netto / Celia de Jesus Franca, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de setembro de 2011.

Campinas, 13 de setembro de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva