



JANAÍNA MADRUGA MORAIS

**“EFEITO DA HOMOGENEIZAÇÃO À ALTA PRESSÃO E DA POLIMERIZAÇÃO COM A
ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA REDUÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DO
ISOLADO PROTEICO DO SORO DE LEITE BOVINO”**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JANAÍNA MADRUGA MORAIS

**“EFEITO DA HOMOGENEIZAÇÃO À ALTA PRESSÃO E DA POLIMERIZAÇÃO COM A
ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA REDUÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DO
ISOLADO PROTEICO DO SORO DE LEITE BOVINO”**

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Maria Netto

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas 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
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA JANAÍNA
MADRUGA MORAIS E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
FLAVIA MARIA NETTO.**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2013

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

M792e Morais, Janaína Madruga
Efeito da homogeneização à alta pressão e da
polimerização com a enzima transglutaminase na redução
do potencial antigênico do isolado proteico do soro de leite
/ Janaína Madruga Morais. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Flavia Maria Netto.
Coorientador: Ricardo de Lima Zollner.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas do soro de leite. 2. Homogeneização à
alta pressão. 3. Transglutaminase. 4. Digestão *in vitro*.
5. Antigenicidade. I. Netto, Flavia Maria. II. Zollner,
Ricardo de Lima. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of high pressure homogenization and polymerization
with transglutaminase enzyme on the reduction of antigenicity potential of
whey protein isolate

Palavras-chave em Inglês:

Whey protein

High pressure homogenization

Transglutaminase

In vitro digestion

Antigenicity

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

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Hélia Harumi Sato

Elizabete Lourenço da Costa

Data da defesa: 21-03-2013

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Profa. Dra. Flavia Maria Netto

Orientadora

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Membro Titular

Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp

Profa. Dra. Elizabete Lourenço da Costa

Membro Titular

Universidade Católica de Santos

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp

Profa. Dra. Mariana Battaglin Villas Boas Alvaro

Membro Suplente

Senac

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

Dedico

*Aos meus queridos pais, José e Claudia,
por serem verdadeiros anjos em minha vida.*

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos, proteger-me e permitir que esta etapa em minha vida tenha sido bem sucedida.

À profa. Dra. Flavia, pela orientação, confiança, atenção, disponibilidade, aprendizado, amadurecimento profissional, pela compreensão e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao prof. Dr. Ricardo, por aceitar a co-orientação, pela recepção e suporte no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp, pelo incentivo à pesquisa e reconhecimento ao meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora, profa. Dra. Helia Harumi Sato, profa. Dra. Elizabete Lourenço da Costa, profa. Dra. Mariana Battaglin Villas Boas e prof. Dr. Marcelo Cristianini pela disponibilidade e importantes sugestões para meu trabalho.

Aos meus pais, José e Claudia, pelo amor incondicional, pela educação que me proporcionaram, pelo apoio e incentivo constante à minha carreira, pela preocupação, ajuda, atenção, paciência e carinho dado a todo momento. À minha querida irmã Tatiane, pelo amor, preocupação e cuidado, por se desdobrar para facilitar minha estadia em Campinas, pela companhia e pelos momentos de descontração. Obrigada por acreditarem em meu sucesso! Vocês são meu alicerce e minha fonte de inspiração. Amo muito vocês!!!

Ao Rodrigo, meu namorado, amigo e companheiro, pelo amor, apoio, generosidade, paciência e compreensão, por facilitar minhas viagens para casa e para Campinas e por me fazer feliz! Obrigada por fazer parte da minha vida! Te amo!!!

A todos os meus familiares, que se preocuparam e me incentivaram, especialmente às minhas avós, pelo carinho e pela calma transmitida.

Às amigas do Laboratório de Bioquímica Nutricional, Eliana, Bete, Maria Elisa, Fernanda, Mariana, Célia, Eloísa, Tássia, pela ajuda técnico-científica, pelos momentos de descontração e por tornarem os dias no laboratório mais produtivos e divertidos. Agradeço à Mariana pelo auxílio nas análises de antigenicidade. Agradeço, ainda, especialmente à Eliana, Maria Elisa e Fernanda, pela constante colaboração no

desenvolvimento do meu trabalho, pela amizade, preocupação e apoio em todos os momentos. Vocês são amigas extraordinárias!

Às minhas amigas queridas, Juliana e Bruna, vencemos mais esta etapa importante em nossas vidas. Tê-las por perto nesses 2 anos, tornou meu trabalho mais prazeroso. Em especial à Juliana, pelo companheirismo, confiança, preocupação, apoio em todos os momentos e ajuda inacabável em informática. Nossa amizade se fortaleceu nesse período!

Às minhas amigas de longa data, pelo apoio e descontração, e que mesmo distante se preocuparam e acreditaram em meu sucesso.

Aos demais amigos do DEPAN, pela amizade, solidariedade e prontidão em ajudar.

Aos demais professores e funcionários do DEPAN, pela colaboração e amizade, especialmente ao Chico, pela ajuda no cromatografo.

À Cinthia, Nayara, Meg, Conceição e demais colegas do LIAE, pela recepção e ajuda durante as análises.

Ao prof. Dr. Marcelo Cristianini por disponibilizar o uso do homogeneizador à alta pressão no Laboratório de Processos Térmicos e Não-Térmicos do Departamento de Tecnologia de Alimentos. À Alline e demais colegas deste laboratório, que me auxiliaram por inúmeras vezes no processamento de amostras.

À prof. Dra. Hélia Harumi Sato por disponibilizar a utilização do Laboratório de Bioquímica de Alimentos no Departamento de Ciências de Alimentos e pelos seus alunos de pós-graduação que me auxiliaram na análise da atividade da transglutaminase.

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

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

RESUMO

O leite bovino contém várias proteínas capazes de induzir resposta alérgica, sendo que a β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactalbumina (α -La), proteínas mais abundantes do soro, estão entre as principais proteínas antigênicas. A homogeneização à alta pressão (HAP) é uma tecnologia emergente que pode alterar a estrutura das proteínas do soro de leite (IPS) e, portanto, seu caráter alergênico. Estudos anteriores apontam que a polimerização com a enzima transglutaminase (TG) reduziu o potencial antigênico da β -Lg. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da HAP associada à polimerização por TG na suscetibilidade à digestão gástrica e gastrointestinal e na resposta antigênica da β -Lg e α -La antes e após a digestão gástrica. Soluções de IPS (1% m/v), tratadas termicamente (72 °C/22 min) ou não, foram homogeneizadas a diferentes níveis de pressão (0, 100, 180 MPa) ou multiprocessadas por 3 ciclos consecutivos a 180 MPa. As amostras foram caracterizadas por turbidez, pelo teor de grupos sulfidríla reativos e livres e por eletroforese em sistema nativo e em SDS-PAGE em condições redutoras e não-redutoras. As amostras processadas foram polimerizadas com TG (25 U g⁻¹ de proteína) e caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE em sistema redutor e densitometria dos géis. Foi avaliada a suscetibilidade da β -Lg e da α -La à digestão gástrica e gastrointestinal após tratamento térmico, HAP e polimerização, associados ou não. As condições de digestão foram: 182 U de pepsina g⁻¹ de proteína e a relação 1:25 (enzima:proteína) para a pancreatina. A caracterização dos digeridos foi realizada por eletroforese SDS-PAGE/Tricina e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR). A antigenicidade das proteínas foi avaliada pelo método ELISA, utilizando soro anti- β -Lg ou anti- α -La de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas nativas. A homogeneização das soluções de IPS, previamente tratadas termicamente ou não, resultou na diminuição da turbidez e do teor de grupos sulfidríla reativos e livres com o aumento dos níveis de pressão. A polimerização com TG resultou na formação de polímeros com massa molecular (MM) acima de 97,4 kDa, principalmente nas amostras tratadas termicamente e homogeneizadas a 180 MPa por 1 e 3 ciclos, alcançando aproximadamente 20% de polímeros de alta MM. As amostras pré-tratadas e polimerizadas foram mais suscetíveis à digestão gástrica e gastrointestinal, resultando em menor residual de proteína intacta em relação às amostras homogeneizadas pré-tratadas termicamente ou não. Foi observado aumento ($P < 0,05$) da capacidade de ligação à IgE anti- α -La para a amostra de IPS tratado termicamente e homogeneizado a 180 MPa (IPS-TT-180, 27,88 μ g IgE mL⁻¹), em relação ao IPS nativo (IPS-N, 12,80 μ g IgE mL⁻¹), sugerindo que a associação do tratamento térmico e HAP aumentou a exposição de seus epítomos. Após a digestão gástrica, não foi observada redução da atividade antigênica da α -La em nenhuma das amostras analisadas. Já para a β -Lg verificou-se que após a digestão gástrica a amostra de IPS tratado termicamente, homogeneizado a 180 MPa e polimerizado (IPS-TT-180 TG) apresentou diminuição ($P < 0,05$) da resposta antigênica para IgE anti- β -Lg (13,59 μ g IgE mL⁻¹) em relação ao IPS-N (34,21 μ g IgE mL⁻¹). Em conclusão, os tratamentos utilizados alteraram a estrutura das principais proteínas do IPS, resultando na diminuição moderada da resposta antigênica da β -Lg e no aumento da antigenicidade da α -La.

Palavras-chave: proteínas do soro de leite; homogeneização à alta pressão; transglutaminase; digestão *in vitro*; antigenicidade.

ABSTRACT

Bovine milk contains several proteins, which can induce allergic response. The most abundant whey proteins, β -lactoglobulin (β -Lg) and α -lactalbumin (α -La) are among the major antigenic proteins of cow's milk. High pressure homogenization (HPH) is an emergent technology which can alter whey proteins (WPI) structures and possibly WPI antigenicity. Previous studies indicated that polymerization with transglutaminase enzyme (TG) reduced the antigenic potential of β -Lg. The objective of the present study was to evaluate the effect of HPH associated to polymerization by TG on the susceptibility to simulated gastric and gastrointestinal digestion and on antigenic response of β -Lg and α -La before and after gastric digestion. Solutions of WPI (1% w/v) previously heat treated (72 °C/22 min) or without heat treatment were homogenized at several pressure levels (0, 100 and 180 MPa) or at 180 MPa for three consecutive cycles. The samples were characterized by turbidity, content of exposed and free sulfhydryl groups and by electrophoresis on native system and SDS-PAGE under non-reducing and reducing conditions. The processed samples were polymerized with TG enzyme (25 U g⁻¹ of protein) and characterized by SDS-PAGE under reducing conditions followed by densitometry of gels. The susceptibility of β -Lg and α -La to gastric and gastrointestinal digestion was evaluated after heat treatment, HPH and polymerization, associated or not with each other. The digestion conditions were: 182 U pepsin g⁻¹ protein and pancreatin:protein ratio of 1:25. Characterization of the digests was carried out by SDS-PAGE/Tricine and reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Protein antigenicity was evaluated by ELISA assay, using serum from BALB/c mouse immunized with native β -Lg and α -La. The homogenization of the WPI solutions, previously heat treated or without heat treatment, resulted in reducing both turbidity and exposed and free sulfhydryl group content as the pressure levels increased. The polymerization with TG enzyme resulted in polymers with molecular mass (MM) above 97.4 kDa, mainly in the samples heat treated and homogenized at 180 MPa for 1 or 3 cycles, forming around 20% of high MM polymers. Either polymerized samples previously treated with heat and/or HPH were more susceptible to gastric and gastrointestinal digestion, resulting in less residual intact protein as compared to the homogenized samples previously heat treated or without heat treatment. It was observed higher ($P < 0.05$) binding capacity to anti- α -La IgE for the sample heat treated and homogenized at 180 MPa WPI (WPI-TT-180, 27.88 μ g IgE mL⁻¹) than for native WPI (WPI-N, 12.80 μ g IgE mL⁻¹) suggesting that the association of heat treatment and HPH increased the exposition of α -La epitopes. After gastric digestion it was not observed a reduction of α -La antigenic activity. In relation to β -Lg antigenicity, after gastric digestion, the WPI sample heat treated, homogenized at 180 MPa and polymerized (WPI-TT-180 TG) showed reduction ($P < 0.05$) of anti- β -Lg IgE response (13.59 μ g IgE mL⁻¹) as compared to WPI-N (34.21 μ g IgE mL⁻¹). In conclusion, the treatments studied altered the structure of major protein of WPI, resulting in moderate reduction of β -Lg antigenic response and increased α -La antigenicity.

Key words: whey protein; high pressure homogenization; transglutaminase; *in vitro* digestion; antigenicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

α-La	Alfa-lactalbumina
Alúmen	Hidróxido de alumínio 3%
β-Lg	Beta-lactoglobulina
BSA	Soroalbumina bovina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
Cys	Cisteína
DTT	Ditionitroto
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HAP	Homogeneização à alta pressão
Ig	Imunoglobulinas
IgE	Imunoglobulina do isotipo E
IPS	Isolado proteico do soro de leite
IPS-N	Isolado proteico do soro de leite nativo
IPS-0	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 0 MPa
IPS-100	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 100 MPa
IPS-180	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 180 MPa
IPS-180-3	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 180 MPa por 3 ciclos consecutivos
IPS-TT	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos
IPS-TT-0	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 0 MPa
IPS-TT-100	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 100 MPa
IPS-TT-180	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 180 MPa
IPS-TT-180-3	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 180 MPa por 3 ciclos consecutivos
IPS-N TG	Isolado proteico do soro de leite polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína

IPS-0 TG	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 0 MPa polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-100 TG	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 100 MPa polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-180 TG	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 180 MPa polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-180-3 TG	Isolado proteico do soro de leite homogeneizado a 180 MPa por 3 ciclos consecutivos polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-TT TG	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-TT-0 TG	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 0 MPa polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-TT-100 TG	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 100 MPa polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-TT-180 TG	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 180 MPa polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
IPS-TT-180-3 TG	Isolado proteico do soro de leite tratado termicamente a 72 °C por 22 minutos e homogeneizado a 180 MPa por 3 ciclos consecutivos polimerizado com 25 U TG g ⁻¹ de proteína
LF	Lactoferrina
MM	Massa Molecular
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SH	Sulfidrina
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Transglutaminase
TMB	Tetrametilbenzidina
UAP	Ultra alta pressão

UDP-galactose	Uridina difosfato galactose
[α-La]	Concentração relativa de alfa-lactalbumina
[β-Lg]	Concentração relativa de beta-lactoglobulina
[polímeros]	Concentração relativa de polímeros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reações catalisadas pela transglutaminase. (a) Reações de acil transferência, (b) formação de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas e peptídeos, (c) desaminação (adaptado de JAROS et al., 2006)..... 23
- Figura 2.** Fluxograma geral do experimento 28
- Figura 3.** Perfil eletroforético SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12%), em meio redutor, do isolado proteico do soro de leite. 38
- Figura 4.** Perfil eletroforético SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12%), em meio redutor, de transglutaminase comercial Activa WM. 39
- Figura 5.** Percentual de transmitância das soluções de isolado proteico do soro de leite (IPS) homogeneizadas à alta pressão com e sem tratamento térmico prévio. 40
- Figura 6.** Perfis eletroforéticos (gel de poliacrilamida – 12%) de isolado proteico do soro de leite (IPS) homogeneizado à alta pressão (A, B e C) e IPS tratado termicamente (72 °C/22 min) e homogeneizado à alta pressão (D, E e F)..... 45
- Figura 7.** Perfil eletroforético SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12%), em meio redutor, de isolado proteico do soro de leite (IPS) homogeneizado à alta pressão, com e sem tratamento térmico prévio, polimerizados pela TG. 48
- Figura 8.** Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor de digeridos gástricos (A,B,C,D) e gastrointestinais (E,F,G,H) de (A,E) IPS homogeneizado à alta pressão (HAP), (B,F) IPS tratado termicamente (TT) e HAP, (C,G) IPS HAP polimerizado com TG e (D,H) IPS TT HAP polimerizado com TG..... 52
- Figura 9.** Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 214 nm de IPS-N (A) e dos digeridos por pepsina de IPS-N (B), IPS-180 (C), IPS-180-3 (D), IPS-TT (E), IPS-TT-180 (F), IPS-TT-180-3 (G), IPS-N TG (H), IPS-180 TG (I), IPS-180-3 TG (J), IPS-TT TG (L), IPS-TT-180 TG (M), IPS-TT-180-3 TG (N). 59
- Figura 10.** Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 214 nm de digeridos gastrointestinais de IPS não tratado (A) e IPS processado por HAP, pré-tratado termicamente ou não, e polimerizado com TG, IPS-N TG (B), IPS-180 TG (C), IPS-180-3 TG (D), IPS-TT TG (E), IPS-TT-180 TG (F), IPS-TT-180-3 TG (G). 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais da homogeneização das amostras de isolado proteico do soro de leite (IPS) à alta pressão e nomenclatura das amostras.	30
Tabela 2. Grupos sulfidril reativos e livres ($\mu\text{mol SH g}^{-1}$ proteína) após homogeneização à alta pressão de solução de isolado proteico do soro de leite (IPS) e IPS pré-tratado termicamente (IPS-TT).	42
Tabela 3. Concentração relativa de β -lactoglobulina [β -Lg], α -lactalbumina [α -La] e polímeros [polímeros] formados nas amostras de isolado proteico do soro de leite (IPS) submetidas à polimerização com a enzima transglutaminase (TG).	49
Tabela 4. Análise da resposta de IgE ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de soro anti- β -Lg e anti- α -La frente às amostras selecionadas de isolado proteico do soro de leite (IPS), antes e após a digestão gástrica.	64

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1. Proteínas do leite.....	5
3.2. Alergenicidade das proteínas do soro de leite.....	8
3.3. Tratamentos utilizados para reduzir alergenidade das proteínas do soro de leite.....	14
3.4. Tratamentos de alta pressão das proteínas do soro de leite.....	18
3.5. Polimerização das proteínas do soro de leite pela transglutaminase.....	22
4. Material e Métodos.....	27
4.1. Material.....	27
4.2. Determinação de proteína total.....	29
4.3. Homogeneização à alta pressão.....	29
4.4. Obtenção e caracterização do IPS polimerizado.....	30
4.5. Turbidez.....	31
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	31
4.7. Grupos sulfidril reativos e livres.....	32
4.8. Digestão <i>in vitro</i>	33
4.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina (SDS-PAGE/Tricina).....	33
4.10. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).....	34
4.11. Ensaio imunológico - ELISA.....	35
4.12. Análise Estatística.....	37
5. Resultados e Discussão.....	38
5.1. Caracterização do isolado proteico do soro de leite e da transglutaminase ..	38
5.2. Tratamento térmico e homogeneização à alta pressão do isolado proteico do soro de leite.....	39
5.2.1. Turbidez.....	39
5.2.2. Grupos sulfidril reativos e livres.....	41
5.2.3. Perfil eletroforético das amostras de IPS.....	44
5.3. Polimerização do IPS pela enzima transglutaminase.....	47
5.4. Efeito dos tratamentos nas soluções de IPS na digestão gástrica e gastrointestinal simulada <i>in vitro</i>	51
5.5. Efeitos dos tratamentos na antigenicidade do IPS.....	63
6. Conclusões.....	68
7. Considerações Finais.....	69
8. Referências.....	70
Anexo.....	81

1. Introdução

Embora centenas de diferentes alimentos sejam incluídas na dieta humana, um número relativamente pequeno é responsável pela maioria das reações alérgicas alimentares. Os principais alimentos que estão associados com reação alérgica são: ovos, peixes, crustáceos, leite, amendoim, soja, nozes e trigo (FOEGEDING; DAVIS, 2011).

O leite de vaca é uma das principais causas de alergia alimentar em crianças (VAN ESCH et al., 2011; MONACI et al., 2006). A prevalência desta manifestação alérgica em crianças abaixo de 3 anos de idade encontra-se na faixa de 0,1 a 4,2% (SACKESSEN et al., 2011). Cerca de 10% dos casos de alergia ao leite permanecem até a idade adulta (HOST, 2002). A alergia ao leite é uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos específicos, sendo o mais comum mediado por imunoglobina do isotipo E (IgE) (FIOCCHI et al., 2010; EL-AGAMY, 2007). Nesta reação ocorre interação entre estes anticorpos e os epítomos correspondentes resultando em sintomas adversos, como alterações gastrointestinais, respiratórias, dermatite atópica e anafilaxia (FIOCCHI et al., 2010; NATALE et al., 2004). Epítomo é a parte da proteína que se liga ao anticorpo. Os epítomos são formados por uma sequência linear de aminoácidos ou por uma porção da estrutura tridimensional da proteína, classificados como linear ou conformacional, respectivamente (FOEGEDING; DAVIS, 2011).

O papel de diferentes proteínas do leite de vaca na patogênese da alergia ainda é controverso. Estudos apontam que as proteínas presentes em maior quantidade no leite são as principais responsáveis por desencadear reação alérgica, sendo elas: as caseínas e as proteínas do soro, β -lactoglobulina (β -Lg) e α -lactalbumina (α -La) (MONACI et al., 2006; BESLER; EIGENMANN; SCHWARTZ, 2000). Natale et al. (2004) encontraram IgE específicas para β -Lg em 45% dos pacientes alérgicos ao leite de vaca. A β -Lg possui epítomos conformacionais e lineares distribuídos ao longo de sua cadeia polipeptídica (SÉLO et al., 1999). Os epítomos conformacionais são os principais responsáveis pela

alergenicidade da α -La, embora esta proteína também apresente epítomos lineares (JARVINEN et al., 2001).

A resistência às enzimas digestivas é um dos parâmetros de avaliação da antigenicidade de proteínas (YOSHINO et al., 2004; ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996). As proteínas dos alimentos não digeridas ou fragmentos formados durante a digestão podem ter capacidade de ligação com IgE e induzir uma resposta alérgica (YOSHINO et al., 2004; MARTOS et al., 2010). A β -Lg é resistente à ação da pepsina, ao contrário da α -La, que é hidrolisada pela enzima sem tratamento prévio (KIM et al., 2007; NIK; WRIGHT; CORREDIG, 2010; TAKAGI et al., 2003).

Diferentes processos têm sido utilizados para modificar a estrutura de proteínas do leite, com o objetivo de diminuir sua antigenicidade, dentre eles, tratamento térmico (MIERZEJEWSKA; KUBICKA, 2006; BU et al., 2009), enzimático (LASKMAN et al., 2011; KIM et al., 2007; KANANEN et al., 2000), e de alta pressão (PEÑAS et al., 2006; BERAN et al., 2009). Outro tratamento que tem sido estudado para a redução da antigenicidade de proteínas é a utilização da enzima transglutaminase (TG). Esta enzima catalisa reação cruzada covalente inter e intramolecular em diferentes proteínas, principalmente entre resíduos de glutamina e lisina, dando origem a polímeros de massa molecular alta (LAUBER et al., 2001a; PARTSCHEFELD et al., 2007). As proteínas do soro de leite, devido a sua estrutura globular e compacta, são pouco acessíveis à ação da enzima TG, sendo necessário que sejam desnaturadas previamente (EISSA et al., 2006). Villas-Boas et al. (2010) observaram que a redução da antigenicidade da β -Lg foi mais eficaz após sua polimerização com TG na presença de agente redutor cisteína (Cys), do que quando desnaturada termicamente e polimerizada.

A homogeneização do leite à alta pressão leva à alteração da estrutura de proteínas do soro, sendo que foi observada cerca de 42% de desnaturação da β -Lg a 200 MPa (HAYES; FOX; KELLY, 2005; DATTA et al., 2005; DESRUMAUX; MARCAND, 2002). As alterações induzidas por este processo são decorrentes de forças de cisalhamento,

cavitação, turbulência e aumento de temperatura simultaneamente em um curto período de tempo (ZAMORA et al., 2007; DESRUMAUX; MARCAND, 2002).

Como o efeito do tratamento térmico isolado na antigenicidade das proteínas do soro é contraditório e a polimerização pela TG da β -Lg após condições desnaturantes pode reduzir a resposta antigênica desta proteína, como verificado em trabalhos anteriores (VILLAS-BOAS et al., 2010; VILLAS-BOAS et al., 2012), a utilização da HAP para a desnaturação das proteínas do soro de leite pode ser um meio interessante de alterar suas estruturas. Desta forma, pode-se aumentar a suscetibilidade das proteínas do soro à modificação com a TG, às enzimas digestivas e conseqüentemente a alteração de sua antigenicidade. Até o momento não foram encontrados estudos sobre o efeito dos tratamentos de homogeneização à alta pressão com tratamento prévio ou não associado à polimerização com TG na antigenicidade das proteínas do soro de leite.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento de homogeneização à alta pressão associado a polimerização por transglutaminase na antigenicidade do isolado proteico do soro de leite bovino.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar o isolado proteico do soro de leite tratado termicamente ou não, homogeneizado à alta pressão, polimerizado com a enzima transglutaminase e sem polimerizar;
- Estudar a digestão gástrica e gastrointestinal *in vitro* do isolado proteico do soro de leite tratado e não-tratado;
- Estudar o efeito dos tratamentos realizados no potencial antigênico do isolado proteico do soro de leite antes e após a digestão gástrica simulada *in vitro*.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Proteínas do leite

O leite bovino contém de 3 a 3,5% de proteínas, compostas de duas classes principais: caseínas (80%) e proteínas do soro (20%) (MONACI et al., 2006). Caseína pode ser definida, de maneira simplificada, como a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado a pH 4,6 a 20 °C (SGARBIERI, 1996). O líquido remanescente é chamado de soro de leite e tem como principais frações proteicas a β -lactoglobulina (β -Lg), a α -lactalbumina (α -La) e a soroalbumina bovina (BSA) (VAN ESCH et al., 2011). Além dessas frações, são encontradas lactoferrina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996).

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: coagulação enzimática, resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos; precipitação ácida no pH isoelétrico (pH 4,6 a 20 °C), resultando na caseína isoelétrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado proteico (SAGARBIERI, 2004; BORGES et al., 2001).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas do soro de leite apresentam todos os aminoácidos essenciais e suas qualidades funcionais são de interesse para a indústria de alimentos (SGARBIERI, 2004; SMITHERS, 2008).

A β -Lg é a proteína mais abundante no soro de leite bovino, correspondendo a cerca de 50% do total de proteínas desta fração (MONACI et al., 2006). É uma proteína globular, constituída por 162 resíduos de aminoácidos e que contém uma sulfidril livre e duas pontes dissulfeto intramolecular, ligando a Cys66 – Cys160 e Cys106 – Cys119, com ponto isoelétrico em pH 5,2 (SAWYER et al., 2002; BROWNLOW et al., 1997; FOX,

2003). Em pH fisiológico e temperatura ambiente, a β -Lg se apresenta como dímero, devido à interação eletrostática entre aspartato (Asp130) e ácido glutâmico (Glu134) de um determinado monômero e o resíduo lisina de outro monômero (SAWYER et al., 2002). Em pH abaixo de 3,5 ou acima de 7,5, esta proteína se dissocia em monômeros, cuja massa molecular (MM) é 18,3 kDa (FOX; McSWEENEY, 1998). Na faixa de pH entre 5,1 e 3,8 (abaixo do ponto isoelétrico) a β -Lg tende a formar octâmeros, o que é atribuído à ionização de grupos carboxílicos nos pontos de interação (SGARBIERI, 1996). A estrutura cristalina mostra que seu monômero consiste predominantemente de folhas- β (50%) e uma pequena porção de α -hélice (15%), estruturas ao acaso (15%) e estruturas em volta ou *turns* (20%) (BROWNLOW et al., 1997). Sua estrutura terciária consiste em oito fitas β antiparalelas formando uma espécie de cálice ou barril capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas em seu interior (BROWNLOW et al., 1997). Este tipo de estrutura caracteriza uma família de proteínas chamada de lipocalinas, que compreende as proteínas com função de transporte (SGARBIERI, 2005). São 12 as variantes genéticas da β -Lg que já foram identificadas no soro de leite bovino, sendo as duas principais A e B, as quais se diferenciam pelos aminoácidos das posições 64 e 118, Asp₆₄ e Val₁₁₈ para β -Lg A e Gly₆₄ e Ala₁₁₈ para β -Lg B (SGARBIERI, 2005).

A α -La representa cerca de 25% das proteínas do soro de leite (MONACI et al., 2006). Duas variantes genéticas (A e B) da α -La foram identificadas, mas somente a variante B tem sido observada em leites das raças bovinas ocidentais (SGARBIERI, 2005; FOX; McSWEENEY, 1998). É uma proteína monomérica globular, composta por 123 resíduos de aminoácidos, com MM de 14,2 kDa, possui quatro pontes dissulfeto por molécula e não apresenta grupo sulfidril livre (MONACI et al., 2006; FOX, 2003; SGARBIERI, 1996). A α -La possui um sítio de ligação ao cálcio de alta afinidade, o que contribui para a estabilidade da estrutura secundária desta proteína (MONACI et al., 2006). Sua estrutura secundária é composta de 60% de estruturas ao acaso, 26% de α -hélice e 14% de folhas- β (FOX, 2003). Esta proteína tende a formar associações em pH abaixo de seu ponto isoelétrico (pH 4,8) e apresenta-se como monômero no pH natural do

leite (pH 6,6) e acima deste (SGARBIERI, 2005; FOX, 2003). Possui um excelente perfil de aminoácidos indispensáveis, sendo rica em lisina, leucina, treonina e triptofano (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989). Apresenta 72% de identidade sequencial aminoacídica com a α -La humana (MONACI et al., 2006). A α -La tem função biológica na síntese da lactose, sendo um componente da enzima lactose sintetase, a qual catalisa a reação final da biossíntese da lactose. A presença da α -La na enzima a torna altamente específica, transferindo galactose de UDP-galactose apenas para glicose, formando lactose (FOX, 2003). Enquanto, na ausência da α -La a enzima age como galactosil transferase não-específica, transferindo galactose da UDP-galactose para diferentes aceptores (FOX, 2003).

A BSA corresponde a cerca de 5% do total de proteínas do soro de leite, constituída por 582 resíduos de aminoácidos, MM de 66,4 kDa (MONACI et al., 2006; SGARBIERI, 1996) e ponto isoelétrico de 4,72 (POLIS; SCHMUCKLER; CUSTER, 1950). Esta proteína apresenta um grupo sulfidril livre na posição 34 (N-terminal) (SGARBIERI, 1996) e tem sua estrutura organizada em 3 domínios homólogos, formada por 9 *loops* conectados por 17 pontes dissulfeto (HSIA et al., 1984). Muitas destas pontes dissulfetos estão protegidas no núcleo da proteína, o que dificulta seu acesso (RESTANI et al., 2004). A estrutura secundária da BSA é predominantemente (68%) formada por alfa-hélice (REED et al. 1975). Pesquisas estruturais permitiram determinar os domínios homólogos que caracterizam a estrutura da BSA, sendo eles entre os aminoácidos: 1-190, 191-382 e 383-581 (BROWN JR, 1977 apud RESTANI et al., 1998; TANABE et al., 2002). A BSA e a soroalbumina humana apresentam 76% de identidade sequencial de aminoácidos (HUANG; KIM; DASS, 2004), sendo que uma das principais diferenças é que a BSA possui dois resíduos de triptofano (posições 131 e 214), enquanto a soroalbumina humana possui apenas um na posição 214 (GELAMO et al., 2002).

A lactoferrina (LF) é uma metaloproteína, de MM 76,1 kDa, cuja cadeia polipeptídica é estruturada em dois lobos globulares, sendo que cada um deles possui

sítio de ligação de alta afinidade para o ferro (MONACI et al., 2006). Esta proteína, de acordo com Smithers et al. (1996), apresenta atividade antimicrobiana.

A fração de imunoglobulinas (Ig) corresponde a cerca de 6% das proteínas do soro de leite (MONACI et al., 2006). A molécula de Ig é composta de quatro subunidades de peptídeos, incluindo duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas ligadas por pontes dissulfeto que conferem à molécula um formato de Y (MONACI et al., 2006; FOX, 2003). As imunoglobulinas apresentam classes, e as presentes no leite são IgA, IgG e IgM, com função biológica vinculada a função imune de proteção contra agentes microbianos (FOX, 2003).

A fração de proteose-peptona representa 1,1% do total de proteínas do leite, é derivada principalmente da proteólise da caseína e é caracterizada por apresentar estabilidade térmica e importantes propriedades funcionais (MONACI et al., 2006; FOX, 2003).

3.2. Alergenicidade das proteínas do soro de leite

A hipersensibilidade ou alergia ao leite de vaca é um dos tipos mais comuns de alergia alimentar em crianças, com incidência de 2 a 3% em crianças com até 1 ano de idade (HOST, 2002).

Do ponto de vista imunológico, a alergia ao leite de vaca é uma reação adversa às proteínas do leite mediada por IgE e pode induzir reações cutâneas (dermatite atópica, urticária, angioedema), respiratória (rinite, asma, tosse), gastrointestinais (vômito, diarreia, cólica, refluxo gastroesofágico) e em casos extremos anafilaxia (MONACI et al., 2006).

A região da proteína responsável pela ligação às IgE é chamada epítopo. Existem dois tipos de epítopos, o linear (sequencial) e o conformacional. O primeiro é caracterizado por uma sequência contínua (linear) de resíduos de aminoácidos e o segundo por uma sequência não-linear, gerada pela proximidade dos aminoácidos que o

formam, devido à estrutura tridimensional da proteína (SATHE; SHARMA, 2009; FOEGEDING; DAVIS, 2011).

Uma única proteína pode desencadear alergia e um único alimento pode conter mais de uma proteína antigênica ou alergênica (SATHE; SHARMA, 2009). O leite de vaca contém várias proteínas que são consideradas antigênicas. Estudos realizados com populações de pacientes alérgicos têm indicado que as proteínas mais abundantes no leite de vaca são os alérgenos mais importantes, especialmente β -Lg, caseínas e α -La (MONACI et al., 2006). Entretanto, proteínas que estão presentes em pequenas quantidades no leite, como BSA, lactoferrina e imunoglobulinas também podem induzir alergia (MONACI et al., 2006, NATALE et al., 2004).

A β -Lg apresenta epítomos conformacionais e lineares, que se encontram amplamente distribuídos por toda sua estrutura, sendo que alguns estão localizados nas partes hidrofóbicas da molécula, inacessíveis para as IgE na conformação nativa da proteína, porém, acessíveis após a digestão no trato gastrointestinal (SÉLO et al., 1999). Wal (2001) verificou que os epítomos da β -Lg reconhecidos por mais de 90% dos pacientes alérgicos ao leite foram entre os aminoácidos (AA) AA41-60, AA102-124 e AA149-162, cada um contribuindo com aproximadamente 10 –15% da imunorreatividade da proteína intacta. A antigenicidade destes fragmentos também havia sido reportada por Sélo et al. (1999), que identificaram outros peptídeos que apresentaram 58-72% de reatividade com soro humano, sendo eles AA1-8, AA25-40 e AA92-100. Peptídeos com 12 a 14 resíduos de aminoácidos contribuem significativamente para a alergenicidade da β -Lg em alguns pacientes (SÉLO et al., 1999). Esta proteína pode desencadear reação alérgica mesmo quando presente em concentrações baixas (PUERTA; DIEZ-MASA; FRUTOS, 2006).

A α -La nativa apresenta capacidade de ligação à IgE em pacientes alérgicos ao leite, confirmando a presença de epítomos conformacionais (WAL, 2004). O mesmo autor observou que em vários pacientes, peptídeos pequenos exibiram a mesma ou maior

capacidade de ligação com IgE, sugerindo a existência de epítomos sequenciais (WAL, 2004). Em mapeamento da α -La, foram identificados quatro epítomos lineares, no entanto, nenhum desses epítomos foi reconhecido pelo soro de crianças com suspeita de alergia ao leite bovino (JARVINEN et al., 2001). Como a maioria dos pacientes alérgicos ao leite respondem à α -La nativa, infere-se que os epítomos conformacionais desta proteína são os principais responsáveis por sua alergenicidade (JARVINEN et al., 2001). Hochwallner et al. (2010) verificaram ainda, que a reatividade da α -La à IgE pode ser reduzida com a depleção do cálcio ligante a esta molécula, o que foi observado em soro de pacientes alérgicos.

Natale et al. (2004) avaliaram os principais alérgenos do leite e encontraram IgE específicas para β -Lg e BSA em 45% dos pacientes alérgicos ao leite. A alergenicidade da BSA é provocada tanto por epítomos sequenciais quanto conformacionais (RESTANI et al., 2004). Estes epítomos, por sua vez, localizam-se em seqüências de aminoácidos que diferem da soroalbumina humana (TANABE et al., 2002). Há relatos de que a presença das pontes dissulfeto na BSA seja um importante fator na manutenção dos determinantes antigênicos desta molécula (BERETTA et al., 2001; RESTANI et al., 1998). Habeeb e Borella (1966) afirmam que alterações conformacionais associadas à redução das pontes dissulfeto, anulam a reação de BSA com anticorpos anti-BSA. Todavia, resultados contraditórios indicam que a antigenicidade da BSA está apenas parcialmente associada à sua estrutura terciária, uma vez que não houve alteração de alergenicidade após tratamento térmico (100 °C/10 min) e desnaturação química (tratamento com SDS) (RESTANI et al., 1998). No mesmo estudo, os autores verificaram diminuição da alergenicidade desta proteína, mas não sua eliminação, por tratamento com agente redutor (β -mercaptoetanol). A desnaturação da BSA pode não anular seu caráter alergênico, uma vez que esta proteína possui no mínimo um epítomo sequencial, localizado entre os aminoácidos 524 a 542 (BERETTA et al., 2001).

Além da presença de epítomos, a resistência às enzimas digestivas é outra característica apresentada pelas proteínas, que as caracterizam como alergênicas (YOSHINO et al., 2004; ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996). As proteínas dos alimentos quando não digeridas pelas enzimas do trato gastrointestinal podem ser absorvidas pelo epitélio intestinal, podendo induzir a produção de IgE específicas e causar processo alérgico (YOSHINO et al., 2004). Mesmo na ausência da proteína intacta, fragmentos formados durante a digestão podem ter capacidade de ligação à IgE e induzir uma resposta alérgica (MARTOS et al., 2010). A antigenicidade ou alergenicidade de hidrolisados dependem da massa molecular dos peptídeos obtidos (VAN HOEYVELD et al. 1998). Van Beresteijn et al. (1994) verificaram que peptídeos com $MM < 3$ kDa não provocam imunogenicidade e alergenicidade. Van Hoeyveld et al. (1998) relataram que peptídeos com $MM < 1,4$ kDa não foram capazes de se complexarem com as IgE presente nos soros de pacientes sensibilizados por proteínas do leite bovino.

A resistência à pepsina é um dos parâmetros para avaliar a antigenicidade de proteínas alimentares (ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996). Astwood, Leach e Fuchs (1996) utilizaram a digestão com fluido similar ao gástrico para comparar a estabilidade à digestão de alimentos alergênicos e não-alergênicos e encontraram que proteínas consideradas não-antigênicas foram totalmente digeridas *in vitro*, enquanto que outras proteínas consideradas antigênicas, inclusive proteínas do soro de leite, apresentaram fragmentos estáveis à digestão, que podem ser absorvidos e causar reação alérgica. Outros estudos também apontam que a resistência à digestão está associada ao potencial alergênico de uma proteína (THOMAS et al., 2004; TAKAGI et al., 2003; BESLER; STEINHART; PASCHKE, 2001). Asselin, Hébert e Amiot (1989) ressaltam a importância da enzima pepsina e da secreção gástrica do sistema digestivo na desnaturação e/ou degradação das proteínas do soro de leite e na redução da alergenicidade provocada por estas proteínas.

Entretanto, Fu, Abbott e Hatzos (2002) observaram que proteínas reconhecidas como principais alérgenos de um alimento não, necessariamente, apresentam maior resistência à digestão por fluido similar ao gástrico ou por fluido similar ao intestinal quando comparadas aos alérgenos minoritários do mesmo alimento. A falta de correlação entre a digestibilidade *in vitro* e alérgenicidade relatada por alguns autores (MARTOS et al., 2010; MORENO, 2007; FU; ABBOTT; HATZOS, 2002) ocorre porque a digestibilidade de uma proteína, avaliada em teste *in vitro*, é altamente influenciada pelas condições utilizadas, como relação enzima:substrato, que pode ser maior do que a encontrada *in vivo*, além de haver a interação das proteínas alimentares com outros componentes da digestão *in vivo* (MARTOS et al., 2010). Apesar das controvérsias, a resistência à digestão é usada como um dos critérios para avaliar o potencial alérgênico de neoproteínas, como em alimentos geneticamente modificados (MARTOS et al., 2010). Além deste critério, são considerados os seguintes fatores: a fonte de proteínas, a similaridade da sequência de aminoácidos da proteína de interesse em relação à alérgenos conhecidos e, quando necessário, teste com soro humano *in vitro* ou teste clínico *in vivo* (THOMAS et al., 2004).

Astwood, Leach e Fuchs (1996) afirmam que a alérgenicidade potencial das proteínas do leite pode ocorrer em parte pela resistência à proteólise no estômago. A pepsina é uma endopeptidase que hidrolisa as ligações envolvendo aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina) (NACER et al., 2004). A sequência primária da β -Lg possui cerca de 50 ligações que são potenciais sítios de clivagem pela pepsina, entretanto, a maior parte destas ligações está localizada no núcleo hidrofóbico da molécula e não está acessível à pepsina (CHOBERT et al., 1995). A β -Lg quando submetida à ação da pepsina tem demonstrado ser resistente por até 60 minutos, sem formar peptídeos, confirmando sua resistência a esta enzima (TAKAGI et al., 2003; ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996). A resistência relativa da β -Lg à hidrólise ácida assim como às proteases permite que parte da proteína permaneça intacta após a digestão, seja

absorvida na mucosa intestinal e apresentada às células do sistema imunológico (WAL, 2001; JARVINEN et al., 2001).

As principais proteínas do soro de leite, β -Lg, α -La e BSA, foram quase totalmente degradadas pela pepsina quando pré-tratadas a 80 °C/60 min (KITABATAKE; KINEKAWA, 1998). O pré-aquecimento (100 °C/10 min) de solução de concentrado proteico do soro de leite e a utilização das enzimas pepsina e tripsina resultaram na digestão da β -Lg, α -La e BSA, o que resultou na redução do caráter alergênico do soro de leite submetido a estas condições (KIM et al., 2007).

Ao contrário da β -Lg, estudos sugerem que a α -La é suscetível à hidrólise por pepsina sob condições gástricas (KIM et al., 2007; NIK; WRIGHT; CORREDIG, 2010).

Astwood, Leach e Fuchs (1996) relataram que a BSA quando submetida à digestão gástrica *in vitro* forma fragmentos peptídicos que resistem por 15 min, enquanto proteínas não alergênicas se degradam dentro de 15 segundos. Resultado semelhante foi obtido por Takagi et al. (2003), que encontraram resistência de um fragmento formado na hidrólise da BSA por pepsina, o qual permaneceu intacto até o fim do experimento (60 min). Contudo, neste mesmo estudo, observou-se hidrólise total de todos os fragmentos formados a partir da BSA, quando esta foi pré-aquecida (100 °C/5 min) os fragmentos desapareceram em até 5 min. Outros estudos verificaram que embora a BSA seja relativamente lábil à digestão gástrica *in vitro*, ela é resistente por até 120 min à condição de digestão intestinal, sem digestão gástrica prévia (FU; ABBOTT; HATZOS 2002; TAKAGI et al., 2003).

Diversos métodos imunquímicos são utilizados para identificar alérgenos e suas propriedades imunológicas, dentre eles, os mais comuns são: o *radio-allergosorbent tests* (RAST), *enzyme allergosorbent tests* (EAST), *rocket immuno-electrophoresis* (RIE), *immunoblotting*, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e radioimunoensaio (RI) (MONACI et al., 2006; POMS; KLEIN; ANKLAM, 2004). A técnica de ELISA é usada rotineiramente em laboratórios e indústrias de alimentos para detectar e quantificar

alergenos em alimentos, devido a sua alta precisão, facilidade de manuseio e potencial para padronização (MONACI et al., 2006; POMS; KLEIN; ANKLAM, 2004). Este método permite a detecção da ligação antígeno-anticorpo por reação colorimétrica. A concentração do complexo antígeno-anticorpo pode ser estimada com base em uma curva padrão gerada com quantidades conhecidas de anticorpo purificado (POMS; KLEIN; ANKLAM, 2004).

3.3. Tratamentos utilizados para reduzir alergenicidade das proteínas do soro de leite

A indústria de alimentos, além de buscar a estabilidade prolongada dos alimentos e manutenção de seu valor nutritivo, tem desenvolvido tecnologias para reduzir o potencial antigênico de produtos derivados do leite (MONACI et al., 2006). Dentre as técnicas mais comuns utilizadas pela indústria de alimentos, estão a desnaturação térmica e a hidrólise parcial (MONACI et al., 2006; KLEBER et al., 2004).

O tratamento térmico, método mais comum de eliminação de patógenos em produtos lácteos, apresenta resultados controversos em relação à diminuição da resposta alergênica do leite. Alterações na alergenicidade das proteínas do leite dependem não apenas da temperatura e do tempo de aquecimento, mas também da possível interação com outras proteínas ou componentes da matriz do alimento (MONACI et al., 2006). A desnaturação térmica pode alterar os epítomos conformacionais devido à alteração da estrutura terciária da proteína, o que leva a diminuição do potencial alergênico (BESLER; EIGENMANN; SCHWARTZ, 2000).

Mierzejewska e Kubicka (2006) verificaram a diminuição da antigenicidade da β -Lg quando submetida à temperatura acima de 80 °C/30 min. Entretanto, resultados contraditórios foram relatados por Kleber et al. (2004), em que tratamentos térmicos entre 75 e 90 °C por 15 min resultaram em aumento da resposta antigênica da β -Lg, possivelmente devido à exposição de epítomos antes ocultos (KLEBER et al., 2004). Os

mesmos autores verificaram que houve redução da resposta antigênica da β -Lg após tratamento a 148 °C, devido à desnaturação da proteína e encobrimento dos epítomos sequenciais durante a formação de agregados. Assim, os anticorpos têm acesso somente aos epítomos localizados nas superfícies desta proteína agregada, o que pode levar à redução da antigenicidade (KLEBER et al., 2004).

Bu et al. (2009) relataram que a antigenicidade da β -Lg e da α -La em solução de IPS aumentou gradualmente com o aumento de temperatura de 50 a 90 °C, entretanto apresentou um declínio com temperatura de 90 a 120 °C, especialmente para a α -La. A β -Lg ainda apresentou resposta antigênica mais elevada quando aquecida a 120 °C em relação à amostra não tratada. O efeito do tratamento térmico na α -La consiste da desnaturação da proteína assim como de sua agregação, o que leva à diminuição da imunorreatividade como um resultado da diminuição da ligação anticorpo-antígeno (MONACI et al., 2006).

Além do tratamento térmico, uma estratégia comumente utilizada para reduzir o potencial alergênico de alimentos é a hidrólise enzimática. Os hidrolisados proteicos são utilizados pela indústria de alimentos em formulações hipoalergênicas ou ingredientes como complemento importante na alimentação de indivíduos que apresentam dificuldade na digestão de proteínas ou doenças associadas ao metabolismo de aminoácidos, como em casos de doenças crônicas do fígado (falência hepática) e fenilcetonúria (CLEMENTE, 2000). Os tratamentos proteolíticos afetam tanto a estrutura conformacional quanto a sequência linear de aminoácidos, o que pode destruir epítomos sequenciais que se ligam à IgE (BESLER; EIGENMANN; SCHWARTZ, 2000). Contudo, a redução na antigenicidade depende fortemente da especificidade da enzima e da estrutura molecular dos epítomos (VAN BERESTEIJN; MEIJER; SCHMIDT, 1995). As limitações da hidrólise enzimática ou química das proteínas são as alterações sensoriais, principalmente amargor, resultante das proteínas extensamente hidrolisadas (KLEBER et al., 2004). Kananen et al. (2000) mostraram que a hidrólise sequencial com pepsina por 180 min e

com tripsina por 90 min resultou na redução da antigenicidade da β -Lg. Kim et al. (2007) verificaram que a associação de tratamento térmico e hidrólise sequencial com enzimas pepsina e tripsina reduziram a antigenicidade da β -Lg e da α -La. A hidrólise com pepsina e posteriormente com quimotripsina foi apontada como a combinação enzimática mais efetiva para reduzir a alergenicidade da β -Lg e da α -La do que as enzimas tripsina ou pancreatina após a pepsina (ASSELIN; HÉBERT; AMIOT, 1989).

Lakshman et al. (2011) avaliaram o efeito da hidrólise com duas proteinases ácidas de fungos *Monascus* na antigenicidade de concentrado proteico do soro de leite e verificaram que estas enzimas hidrolisam α -La, mas não a β -Lg. Entretanto, os autores reportaram que a associação destas enzimas fúngicas com a tripsina hidrolisa o soro de leite mais eficientemente do que a utilização de uma única enzima ou da combinação pepsina-tripsina, sugerindo que essa associação possa ser um meio de produzir fórmulas hipoalergênicas.

Restani et al. (1995) verificaram, pelos métodos Imunoblote e ELISA, que fórmulas infantis comerciais contendo proteínas de leite bovino parcialmente ou extensivamente hidrolisadas, apresentaram atividade antigênica residual, pois foram reconhecidas pelas IgE presentes no soro de pacientes alérgicos às proteínas do leite bovino. Este reconhecimento foi devido à presença de proteínas intactas, desnaturadas ou não, e por peptídeos que continham epítomos lineares íntegros (RESTANI et al., 1995).

Estudos têm demonstrado que o tratamento de alta pressão isostática aumenta a hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite (BERAN et al., 2009; CHICÓN et al., 2009; PEÑAS et al., 2006). Esta combinação de tratamentos reduz a imunorreatividade das proteínas do soro de leite em maior proporção do que quando realizados isoladamente (PEÑAS et al., 2006). A alta pressão isostática provoca desnaturação das proteínas do soro de leite, podendo expor epítomos à ação de proteases, facilitando a hidrólise e reduzindo a antigenicidade da proteína (BERAN et al., 2009; PEÑAS et al., 2006). Foi observado diminuição da imunorreatividade dos hidrolisados das proteínas do

soro de leite obtidos por associação de enzimas tripsina e pepsina a pressões de 200 e 300 MPa, respectivamente (PEÑAS et al. 2006). Chicón et al. (2009) observaram diminuição da capacidade de ligação dos hidrolisados do soro de leite obtidos a 400 MPa associado à hidrólise por pepsina às IgE de soro de pacientes alérgicos ao leite bovino. Entretanto, estes mesmos autores afirmam que apesar de não haver proteína intacta residual, após o tratamento enzimático a 400 MPa, os hidrolisados mantiveram baixa, mas detectável capacidade de ligação à IgE. Esta observação sugere que os peptídeos formados contêm epítomos (CHICÓN et al., 2009).

A polimerização com TG também pode reduzir a antigenicidade das proteínas do soro de leite. Villas-Boas et al. (2010) verificaram que houve redução da antigenicidade da β -Lg polimerizada com TG na presença de agente redutor cisteína (Cys), sugerindo que sítios antigênicos podem ter se mantido ocultos no rearranjo molecular ocasionado pela polimerização. Olivier et al. (2012a) confirmaram a redução da resposta antigênica da β -Lg polimerizada com TG na presença de agente redutor Cys por meio de teste cutâneo em crianças alérgicas ao leite.

O tratamento de amostras de proteínas do soro de leite com irradiação micro-ondas a 300 e 400 Watt por 20 min ou a 600 e 700 Watt por 10 min reduziu a sua antigenicidade (KADDOURI et al., 2006). A hidrólise pelas enzimas pronase ou papaína durante o tratamento de irradiação micro-ondas reduziu a resposta antigênica de concentrado proteico do soro de leite (IZQUIERDO et al., 2008).

Reação de glicação, envolvida na formação de muitos produtos da reação de Maillard, tem sido proposta como um meio efetivo de alterar a antigenicidade destas proteínas. Li, Luo e Feng (2011) verificaram que a conjugação de IPS com maltose foi eficaz em reduzir a resposta antigênica da β -Lg e da α -La.

3.4. Tratamentos de alta pressão das proteínas do soro de leite

O tratamento de alta pressão tem sido descrito como uma alternativa à pasteurização térmica convencional por promover a inativação de micro-organismos, manter as propriedades nutricionais e a qualidade sensorial (ADAPA; SCHMIDT; TOLEDO, 1997). Dois diferentes métodos de processamento de alimentos à alta pressão têm sido investigados: o método hidrostático ou isostático (UAP – Ultra Alta Pressão) e o método de homogeneização ou alta pressão dinâmica (HAP – Homogeneização à Alta Pressão) (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003). Entretanto, estes métodos apresentam dinâmicas diferentes (GUERZONI et al., 1999).

O processamento de UAP consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um vaso pressurizado, utilizando um meio que transfere a pressão de maneira uniforme ao produto (para alimentos tem-se utilizado água potável como meio) (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003). O efeito do tratamento de alta pressão é governado pelo princípio de Le Chatelier: um sistema em equilíbrio, submetido a uma força, tende a se reajustar visando a minimizar os efeitos da força aplicada (HUPPERTZ; KELLY; FOX, 2002; MOZHAEV et al., 1996; BALNY; MOZHAEV; LANGE, 1997). O aumento na pressão favorece a redução do volume de um sistema e como a alta pressão induz a desnaturação da proteína, infere-se que o volume ocupado pela conformação da proteína nativa é maior do que da forma desnaturada (MOZHAEV et al., 1996).

A estrutura primária da proteína permanece intacta quando submetida à UAP, pois as ligações covalentes praticamente não são afetadas (MOZHAEV et al., 1996). Modificações na estrutura secundária ocorrem a níveis muito altos de pressão por rompimento das pontes de hidrogênio (HENDRICKZ et al., 1998). Alterações significativas na estrutura terciária, mantida principalmente por interações iônicas e hidrofóbicas, são observadas em pressões superiores a 200 MPa (HENDRICKZ et al., 1998). Proteínas oligoméricas com estrutura quaternária mantida por interações hidrofóbicas e eletrostáticas são dissociadas sob pressões moderadas (150 MPa), já que estas

interações são fracas (HENDRICKZ et al., 1998; MOZHAEV et al., 1996). Logo, a UAP afeta a estrutura da proteína em sua estrutura quaternária, terciária e secundária, ocasionando sua desnaturação (SILVA; WEBER, 1993).

Por sua vez, a HAP é um processo contínuo, no qual o produto é bombeado através de um intensificador de pressão, fazendo-o fluir através de uma válvula de homogeneização (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003). A pressão a que o líquido é submetido ao passar pela válvula em curto período de tempo gera intensa força de cisalhamento, cavitação, turbulência e aumento de temperatura simultaneamente (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; BOUAOUINA et al., 2006; PAQUIN, 1999). Após passar pela válvula de homogeneização, o líquido é sujeito à rápida despressurização, o que ocasiona o fenômeno de cavitação, caracterizado pela formação de bolhas de ar na solução ou no interior de cavidades presentes na solução, levando ao colapso destas (GUERZONI et al., 1999). Durante o tratamento de alta pressão ocorre o aumento da temperatura da solução processada, uma vez que a temperatura é diretamente proporcional à pressão de homogeneização (DESRUMAUX; MARCAND, 2002). Mesmo sendo por curto período de tempo, este aumento de temperatura contribui para as alterações estruturais observadas nas soluções homogeneizadas (PAQUIN, 1999). Contudo, a ação do aquecimento na HAP difere dos tratamentos térmicos convencionais utilizados na indústria alimentícia, pois nestes a desnaturação de macromoléculas é obtida pela combinação de elevação de temperatura por maiores períodos de tempo do que na HAP (PAQUIN, 1999). A ação das diferentes forças - cisalhamento, cavitação, turbulência - e o aumento da temperatura neste método são responsáveis pela inativação microbiana e enzimática (DATTA et al., 2005; GUERZONI et al., 1999) e pela modificação das propriedades funcionais de proteínas, como coagulação e emulsão (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; HAYES; KELLY, 2003). Poucos estudos focaram nas características físico-químicas do leite tratado por HAP (ADAPA; SCHMIDT; TOLEDO, 1997; SANDRA; DALGLEISH, 2005) e na avaliação da alteração de antigenicidade do leite submetido a este tratamento (ZHONG et al., 2011; ZHONG et al., 2012).

Como os tratamentos a alta pressão - UAP e HAP - atuam de maneira diferente, as alterações nas soluções podem não ser semelhantes. O método UAP tem sido mais explorado, com maior quantidade de dados disponível na literatura. Estudos indicam que este tipo de tratamento resulta em modificações estruturais das proteínas do leite (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2004; NEEDS et al., 2000). As proteínas do soro de leite apresentam comportamento diferenciado a pressões elevadas. A β -Lg se desnatura a pressões superiores a 100 MPa (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2004; GAUCHERON et al, 1997; LOPEZ-FANDIÑO; CARRASCOSA; OLANO, 1996); pressões altas (400-800 MPa) resultam em desnaturação considerável desta proteína, cerca de 80% do total de β -Lg no leite tratado (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2004).

A α -La tem maior resistência à UAP que a β -Lg, desnaturando-se a pressões maiores que 400 MPa (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2004; LOPEZ-FANDIÑO; CARRASCOSA; OLANO, 1996). Huppertz, Fox e Kelly (2004) verificaram aproximadamente 72% de desnaturação da α -La em amostra de leite submetido à pressão de 800 MPa por 30 min. A maior estabilidade da α -La tem sido relacionada à forma mais rígida de sua estrutura molecular, estabilizada por maior número de pontes dissulfeto intramoleculares, a α -La possui 4 pontes, enquanto a β -Lg, 2 (GAUCHERON et al., 1997).

A HAP também pode induzir alterações estruturais das proteínas do soro de leite. Hayes, Fox e Kelly (2005), após homogeneizar o leite em diferentes pressões, analisaram a desnaturação das proteínas do soro de leite pela proporção de proteínas solúveis em pH 4,6 obtida por CLAE-FR. Os autores verificaram que a β -Lg apresentou maior desnaturação com o aumento da pressão, sendo os percentuais de desnaturação de 10,2, 42,5 e 56,1% em 150, 200 e 250 MPa respectivamente. Já a α -La, neste mesmo estudo, apresentou menos de 10% de desnaturação em até 250 MPa. Resultado semelhante para a desnaturação da β -Lg no leite tratado por HAP foi obtido por Datta et al. (2005). Estes autores verificaram que a desnaturação da β -Lg é maior por HAP do que por tratamento

térmico convencional, possivelmente pode haver sinergismo entre a temperatura e as forças de cisalhamento aumentando a desnaturação desta proteína. Outros autores corroboram que não apenas o aquecimento, mas também as forças de homogeneização induzem a desnaturação das proteínas do soro de leite (DESRUMAUX; MARCAND, 2002; ZAMORA et al., 2007). Zamora et al. (2007) observaram maior desnaturação da β -Lg do que da α -La em leite homogeneizado a 300 MPa, sendo os níveis de desnaturação obtidos de 35% para β -Lg e 12% para a α -La, pela proporção destas proteínas na fração solúvel em pH 4,6, avaliada por CLAE-FR. Desrumaux e Marcand (2002) também verificaram desnaturação das proteínas do soro de leite após homogeneização a 300 MPa por calorimetria diferencial de varredura. Os autores verificaram por eletroforese que não houve mudanças na massa molecular das proteínas, logo a homogeneização não provocou hidrólise, apenas alteração na estrutura das proteínas.

Estudo realizado com o leite homogeneizado apontou que houve redução do teor de nitrogênio do soro de leite, com residual de β -Lg e α -La no soro menores do que no leite não tratado, devido a dois fatores: (a) as proteínas do soro de leite desnaturadas pela HAP se associaram à superfície das micelas de caseína e (b) ocorreu incorporação das proteínas do soro desnaturada e fragmentos de micelas de caseína nas membranas dos glóbulos de gordura (ZAMORA et al., 2007). O nível de desnaturação ou agregação obtido depende da intensidade das forças mecânicas e/ou temperatura (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008).

Entretanto, outros estudos apontam que a HAP em pressões de 186 a 300 MPa não resultou em desnaturação das proteínas do soro de leite, verificada por diferentes metodologias, dentre elas calorimetria diferencial de varredura, eletroforese em sistema redutor e não-redutor (SANDRA; DALGLEISH, 2005; BOUAOUINA et al., 2006; HAYES; KELLY, 2003). Bouaouina et al. (2006), ao avaliar as propriedades físico-químicas do isolado proteico do soro de leite submetido a homogeneização com pressão de até 300 MPa, não observaram alterações estruturais nas proteínas do soro, β -Lg, α -La e BSA. Os

autores verificaram apenas que houve dissociação de agregados proteicos que estavam presentes na solução.

A influência da HAP na redução da antigenicidade das proteínas do soro de leite é pouco conhecida. Zhong et al. (2011) avaliaram a resposta antigênica da β -Lg pré-tratada termicamente (60-90 °C/30 min) e submetida à HAP. Os autores relataram que esta combinação de tratamentos aumentou a resposta antigênica da β -Lg, possivelmente pela indução na mudança conformacional da proteína, resultando em maior acessibilidade dos anticorpos aos epítomos. Os autores sugerem que é necessário avaliar diferentes combinações de tratamentos a HAP para avaliar a alteração de alergenicidade de proteínas.

3.5. Polimerização das proteínas do soro de leite pela transglutaminase

A TG (EC 2.3.2.13) é uma enzima encontrada em tecidos e fluidos animais (MOTOKI; SEGURO, 1998), peixes, plantas e micro-organismos, sendo purificada a partir de fonte microbiana para uso em indústrias alimentícias (ANDO et al., 1989). Esta enzima apresenta estrutura monomérica composta por 331 aminoácidos (KANAJI et al., 1993), com MM de 38 kDa (MOTOKI; SEGURO, 1998). Possui um resíduo de cisteína com um grupo tiol livre, essencial para sua atividade enzimática (KANAJI et al., 1993). Seu ponto isoelétrico é de 8,9, sua faixa de pH ótimo é de 5 a 8 e temperatura ótima de atividade enzimática de 50 °C (MOTOKI; SEGURO, 1998). Temperaturas acima de 70 °C ocasionam perda rápida de atividade desta enzima (MOTOKI; SEGURO, 1998).

A TG catalisa três diferentes reações: incorporação de grupo amina, reação cruzada e desaminação em proteínas e peptídeos conforme Figura 1 (página 23) (MOTOKI; SEGURO, 1998). Ela catalisa reação de acil transferência entre o grupo γ -carboxilamida do resíduo de glutamina de uma proteína (doador de acil) para uma amina primária (receptor de acil), preferencialmente do grupo ϵ -amina de resíduos de lisina (PARTSCHEFELD et al., 2007; JAROS et al., 2006). Quando o grupo ϵ -amina de lisina de

uma proteína age como acil receptor, ligações cruzadas covalentes intra e/ou intermoleculares são formadas (ligação isopeptídica ϵ -(γ -glutamil) lisina) resultando na polimerização de proteínas (JAROS et al., 2006). Na ausência de aminos primárias, a água pode agir como um receptor de acil, resultando na desaminação dos resíduos de glutamina, formando ácido glutâmico e amônia (JAROS et al., 2006).

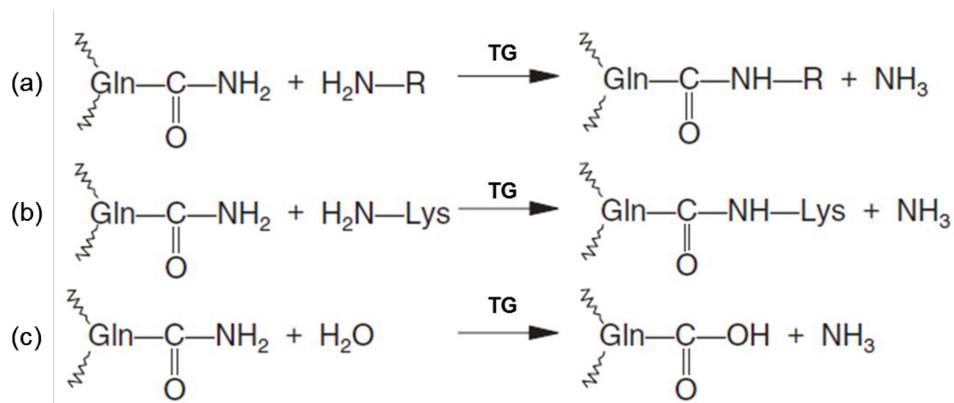


Figura 1. Reações catalisadas pela transglutaminase. (a) Reações de acil transferência, (b) formação de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas e peptídeos, (c) desaminação (adaptado de JAROS et al., 2006).

A capacidade da TG de introduzir ligação cruzada intra ou intermolecular nas proteínas tem sido aplicada como um meio de melhorar as propriedades funcionais e o valor nutricional de proteínas, pela ligação covalente de aminoácidos essenciais limitantes (CHRISTENSEN et al., 1996; IKURA et al., 1981). A introdução de metionina em caseína e proteína da soja e de lisina no glúten de trigo pela TG já foi relatada (IKURA et al., 1981).

A polimerização pode provocar alterações significativas no tamanho, conformação e estabilidade de uma proteína, podendo alterar sua funcionalidade (ANURADHA; PRAKASH, 2009). Propriedades funcionais como solubilidade, capacidade emulsificante, formação de espuma, viscosidade, elasticidade e formação de géis de proteínas podem ser melhoradas pela introdução de ligações cruzadas pela TG (LI-CHAN, 2004). A alteração da funcionalidade pela TG já foi verificada para várias proteínas, como caseínas

e proteínas do soro de leite (JAROS et al., 2006), soja, gergelim (ANURADHA; PRAKASH, 2009) e produtos cárneos (TRESPALACIOS; PLA, 2007).

Um pré-requisito para a polimerização pela TG é a exposição de resíduos de lisina e glutamina da proteína. Algumas proteínas como caseína e gelatina são facilmente polimerizadas pela TG, uma vez que seus resíduos de lisina e glutamina estão expostos. Em contraste, outras proteínas possuem uma estrutura rígida e é indicada a aplicação de métodos que desestabilizem sua estrutura, tornando os aminoácidos mais acessíveis à enzima (DE JONG; KOPPELMAN, 2002). As proteínas do soro de leite, devido à sua estrutura compacta, dificultam a ação da TG, sendo indicado que estas sejam previamente desnaturadas para expor os resíduos de glutamina e lisina e possibilitar a reação entre eles (EISSA et al., 2006).

A β -Lg possui 9 resíduos de glutamina e 15 de lisina em sua estrutura (EISSA et al., 2006) e a α -La possui 6 resíduos de glutamina e 12 de lisina (BREW, 2003). A desnaturação parcial ou completa da β -Lg facilita a ação da TG. A desnaturação pode ser induzida por tratamento térmico com temperaturas superiores a 70 °C ou pela adição de agentes redutores como ditioneína (DTT) ou β -mercaptoetanol (EISSA et al., 2006). Por sua vez, foi relatado que a α -La é suscetível à ação da TG sem tratamento desnaturante prévio (SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001; FAERGEMAND; OTTE; QVIST, 1997).

Sharma, Lorenzen e Qvist (2001) analisaram a influência do pré-tratamento térmico na polimerização pela TG das proteínas do leite e verificaram que a β -Lg sem tratamento não foi suscetível à ação da TG. Após tratamento térmico (85 °C/15 min), esta proteína foi polimerizada, enquanto a α -La foi polimerizada com ou sem tratamento térmico prévio. Já Rodriguez-Nogales (2006) verificou que as melhores condições para formação de ligações cruzadas covalentes pela TG para α -La e β -Lg foram 90 °C/60 min e 83,4 °C/55,7 min, respectivamente.

Faergemand, Otte e Qvist (1997) relataram que pela ação da TG não houve redução do teor de β -Lg monomérica e dimérica sem a presença de agente redutor,

enquanto para a α -La foi observado redução em seu teor e aumento da formação de produtos de MM alta. No entanto, o mesmo estudo apontou que na presença de agente redutor DTT houve extensa polimerização da β -Lg e aumento da polimerização da α -La.

Anuradha e Prakash (2009) verificaram a ação da TG na polimerização da β -Lg e da globulina da soja. Foi observado que parte da β -Lg não sofreu ação da enzima, enquanto a globulina de soja foi totalmente polimerizada. Os autores verificaram ainda que a polimerização resultou em aumento de estabilidade térmica, devido à formação de estrutura mais compacta das proteínas.

Villas-Boas et al. (2010) relataram que houve aumento da polimerização com TG da β -Lg quando esta foi pré-tratada termicamente (80 °C/60 min) ou com agente redutor Cys. Entretanto, a redução da antigenicidade da β -Lg foi mais eficaz após a polimerização desta proteína pela TG com agente redutor Cys, do que quando desnaturada termicamente (VILLAS-BOAS et al., 2010). A modificação da β -Lg isolada na presença de Cys promove mudanças na antigenicidade da proteína, possivelmente encobrendo os determinantes antigênicos da molécula, os quais não foram reconhecidos como sítios antigênicos (VILLAS-BOAS et al., 2010). Para Olivier et al. (2012b), a polimerização da β -Lg isolada na presença de Cys altera a distribuição espacial dos epítomos, resultando na diminuição da reatividade cutânea em pacientes alérgicos. Os autores sugeriram que a polimerização enzimática é uma ferramenta que pode diminuir a alergenicidade *in vivo* da β -Lg (OLIVIER et al., 2012b).

A associação do tratamento de UAP à ação da TG tem sido utilizada para a polimerização de proteínas. Esta enzima apresenta alta estabilidade a temperatura ambiente, sendo necessário pressão de 600 MPa por 100 min para redução de 50% de sua atividade, porém a 60 °C com a mesma pressão, foram necessários menos de 10 min para obter o mesmo percentual de redução (LAUBER et al., 2001b). Lauber et al. (2001a) relataram que pressões superiores a 400 MPa são eficientes para a ocorrência da polimerização da β -Lg na presença de TG e que este efeito é mais pronunciado se a

enzima estiver presente no momento do tratamento de alta pressão e não após este. Contudo, a pressão de 600 MPa a polimerização da β -Lg foi menos pronunciada, possivelmente devido a uma inativação desta enzima a esta pressão (LAUBER et al., 2001b). Não foram encontrados estudos que avaliassem o efeito da associação de HAP e polimerização por TG na suscetibilidade às enzimas gastrointestinais e na antigenicidade das proteínas do soro de leite bovino.

4. Material e Métodos

4.1. Material

Foi utilizado isolado proteico do soro de leite bovino (IPS) PROVON® (Glanbia Nutritional, Kilkenny, Irlanda), β -Lg (variantes A e B, 93% de proteína) e α -La (90% de proteína) foram doadas pela DAVISCO Food International Inc. (Le Sueur, MN, EUA). As enzimas utilizadas foram: enzima transglutaminase (Activa WM), fornecida pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), produzida por micro-organismos (Ca^{2+} independente), pepsina de mucosa de estômago suíno (2500 – 3500 U mg^{-1} de proteína, cód. P7012) e enzima pancreatina de pâncreas suíno (cód. P1625) adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os reagentes utilizados foram: acrilamida, tris, glicina, (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA); bis-acrilamida (Amresco, Solon, Ohio, EUA); β -mercaptoetanol (Merck, Hohenbrunn, Alemanha); tricina, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); tetrametilbenzidina (TMB) (BD – Biosciences San Diego, CA, EUA), Tween 20, uréia, ácido trifluoroacético (Merck, Darmstald, Alemanha); acetonitrila (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA). Os anticorpos utilizados foram: Purified Mouse IgE antibody, Purified Anti-mouse IgE monoclonal antibody (BD Biosciences San Diego, CA, EUA), Anti-Rat IgG whole molecule peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes utilizados eram de grau de analítico ou cromatográfico.

A Figura 2 (página 28) ilustra o fluxograma geral do experimento. Como controles, foram utilizados IPS e IPS tratado termicamente, não processados por alta pressão.

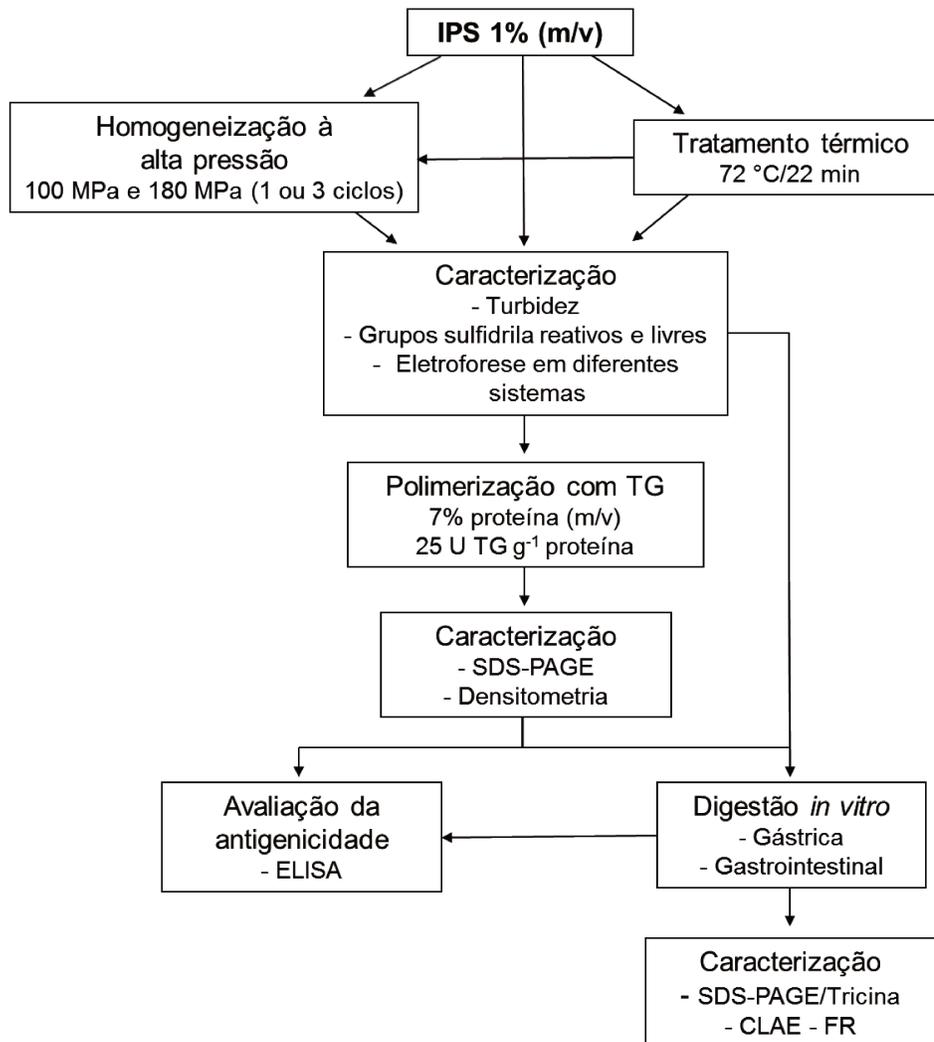


Figura 2. Fluxograma geral do experimento

O material homogeneizado foi caracterizado por eletroforese (item 4.5) em sistema nativo e em SDS-PAGE em sistema redutor e não-redutor, por turbidez (item 4.4) e pelo teor de grupos sulfidril reativos e livres (item 4.6), e, então, liofilizado para as análises posteriores.

Após a polimerização por TG, as amostras foram caracterizadas por SDS-PAGE (item 4.5) em sistema redutor e densitometria. Posteriormente as amostras foram avaliadas quanto à digestão *in vitro* (item 4.7) e caracterizadas por SDS-PAGE/Tricina

(item 4.8) e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) (item 4.9). As amostras que apresentaram alteração após os tratamentos realizados – tratamento térmico, homogeneização à alta pressão e polimerização com TG – foram avaliadas quanto à antigenicidade por ensaio imunológico ELISA (item 4.10).

4.2. Determinação de proteína total

O teor de nitrogênio total do IPS foi determinado pelo método semi-micro de Kjeldahl e o teor de proteína total calculado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 6,38 (AOAC, 2006). O valor obtido foi utilizado como referência para o preparo das soluções.

4.3. Homogeneização à alta pressão

Soluções de IPS (1% m/v), tratadas termicamente ou não, foram homogeneizadas com diferentes níveis de pressão (0, 100, 180 MPa) e multiprocessadas por 3 ciclos consecutivos a 180 MPa em homogeneizador Panda Plus 2000 (GEA Niro Soavi S.p.A., Parma, Itália) no Laboratório de Processos Térmicos e Não Térmicos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, SP). Os níveis de pressão utilizados foram baseados nos níveis estudados por Zhong et al. (2011). As condições do pré-tratamento térmico utilizadas foram: temperatura de 72 °C por 22 min em banho-maria, com resfriamento em banho de gelo até atingir temperatura ambiente (25 °C). Segundo trabalho de França (2012), estas condições de pré-tratamento térmico foram as mais adequadas para propiciarem a polimerização do IPS pela TG. Na Tabela 1 (página 30) visualiza-se as condições experimentais utilizadas antes e durante processamento à alta pressão das soluções de IPS bem como a nomenclatura utilizada para as amostras.

Tabela 1. Condições experimentais da homogeneização das amostras de isolado proteico do soro de leite (IPS) à alta pressão e nomenclatura das amostras.

IPS (%)	Pré-tratamento	HAP (nível de pressão)	Nomenclatura das amostras
1,0	--	-	IPS-N
		0 MPa	IPS-0
		100 MPa	IPS-100
		180 MPa	IPS-180
		180 MPa – 3 ciclos	IPS-180-3
	Tratamento térmico 72 °C/22 min	-	IPS-TT
		0 MPa	IPS-TT-0
		100 MPa	IPS-TT-100
		180 MPa	IPS-TT-180
		180 MPa – 3 ciclos	IPS-TT-180-3

Nota: TT=tratada termicamente

4.4. Obtenção e caracterização do IPS polimerizado

As amostras de IPS pré-tratado termicamente ou não e processado por HAP foram liofilizadas. Posteriormente soluções com 7% de proteína (m/v), preparadas a partir dessas amostras, foram polimerizadas com TG na concentração de 25 U g⁻¹ de proteína (VILLAS-BOAS et al., 2010).

A reação com a TG foi realizada a 50 °C em pH 6,5 por 180 min sob agitação a 300 rpm com temperatura controlada (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e interrompida por aquecimento a 80 °C por 5 min. A polimerização das amostras foi avaliada por SDS-PAGE em sistema redutor (item 4.5) e densitometria dos géis de eletroforese pelo software livre *ImageJ* (v1.45s).

Para as amostras polimerizadas foi acrescentada a sigla TG em sua nomenclatura.

A atividade da TG era de 60 U g^{-1} e foi determinada pela técnica colorimétrica de formação de ácido hidroxâmico utilizando-se o substrato N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (CBZ-glutaminil-glicina), conforme descrito por Folk e Cole (1966). A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido hidroxâmico (FOLK; COLE, 1966).

4.5. Turbidez

A turbidez das amostras com 1% de proteína (m/v) foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Agilent 8453, Xangai, China) a 600 nm após o processamento por HAP. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) em triplicata de cada amostra.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises de SDS-PAGE foram realizadas como descrito por Laemmli (1970) utilizando equipamento Mini Protein II (BioRad, Hercules, CA, EUA) e espaçadores de 0,75 mm. Os géis de separação e empilhamento utilizados continham 12% e 4% de acrilamida, respectivamente. Em sistema redutor, as amostras foram diluídas em tampão redutor ($0,0625 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-HCl, 2,0% SDS, 20% glicerol, 5,0% β -mercaptoetanol e azul de bromofenol, pH 6,8) na concentração de 0,4% proteína e aquecida a $96 \text{ }^{\circ}\text{C}/5 \text{ min}$. Para a eletroforese em sistema não-redutor, foi excluído o β -mercaptoetanol do tampão da amostra. Para o sistema nativo foram excluídos o agente redutor e desnaturante, β -mercaptoetanol e SDS, respectivamente. Foram aplicadas alíquotas de $10 \mu\text{L}$ de amostra. Após a corrida, os géis foram corados com Comassie Blue R-250 na concentração de 0,1% em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5) e descorados por meio de várias lavagens em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5). Utilizou-se de kits de marcadores padrão de MM de 14,4 a 97,0 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) para

estimar a MM das frações proteicas obtidas nos sistemas redutor e não-redutor e para sistema nativo utilizou-se de β -Lg e α -La isoladas.

Para avaliar o efeito do tratamento térmico e da homogeneização à alta pressão na reação de polimerização, utilizou-se a concentração relativa dos polímeros formados ([polímeros]) e dos residuais das proteínas β -Lg ([β -Lg]) e α -La ([α -La]). As concentrações de β -Lg e α -La diminuem com a participação destas proteínas na polimerização e consequente formação de polímeros. A concentração relativa de cada uma das proteínas foi obtida pela densitometria dos géis de eletroforese, que foram analisados utilizando o software livre *Image J* (v1.45s). Os resultados foram expressos como % da área de cada pico relativo em relação à somatória da área de todos os picos das proteínas detectados em cada amostra.

4.7. Grupos sulfidrila reativos e livres

Os grupos sulfidrila livres foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Beveridge, Toma e Nakai (1974), com adaptações sugeridas por Beveridge, Jones e Tung (1984). Alíquotas de 0,5 mL de solução proteica (1% m/v) foram dissolvidas em 2,5 mL de tampão 0,086 mol L⁻¹ Tris-HCl, contendo 0,09 mol L⁻¹ glicina, 0,004 mol L⁻¹ EDTA e 8 mol L⁻¹ uréia, pH 8,0. Após 60 min foram adicionados 20 μ L do reagente de Ellman (4 mg mL⁻¹ de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico em tampão Tris-HCl-Glicina-EDTA, pH 8,0). Decorridos 15 min, os tubos foram centrifugados a 27000x *g*, a 15 °C por 20 min (Centrífuga RC5C Sorval Instruments Dupont, Wilmington, EUA) e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 412 nm (Agilent 8453). As amostras foram analisadas em triplicata. Para a determinação de grupo sulfidrila reativo foi excluída a uréia do tampão. Para o cálculo utilizou-se a seguinte equação:

$$\mu\text{mol SH g}^{-1} \text{ proteína} = (73,53 \cdot A_{412} \cdot D) / C$$

onde: SH= concentração de sulfidrilas na amostra em $\mu\text{mol g}^{-1}$ proteína; A_{412} = absorvância medida a 412 nm; C= concentração da amostra em mg de proteína mL^{-1} ; D= fator de diluição; 73,53 = é derivado de $10^6/(1,36 \times 10^4)$; $1,36 \times 10^4$ é a absortividade molar do reagente de Ellman e 10^6 é devido a conversão de mol L^{-1} para $\mu\text{mol mL}^{-1}$ e de miligrama para grama de proteína (BEVERIDGE; TOMA; NAKAI, 1974).

4.8. Digestão *in vitro*

A digestão foi realizada segundo Martos et al. (2010) com algumas adaptações. As amostras com concentração inicial de 5,9 mg de proteína mL^{-1} de fluido gástrico (35 mmol L^{-1} NaCl) foram digeridas com pepsina (182 U mg^{-1} proteína), em pH 2, para simular as condições de digestão gástrica de adulto (DUPONT et al., 2010). A reação foi realizada em agitador (Thermomixer comfort) sob temperatura controlada de 37 °C e agitação de 300 rpm. Decorridos 60 min, foi recolhida uma alíquota (700 μL) de cada amostra, neutralizadas pela adição de 1 mol L^{-1} NaHCO_3 a pH de 7,0 – 7,5 e seu volume final ajustado com água destilada para 1 mL. O volume restante das amostras digeridas pela pepsina teve seu pH ajustado em 6,5 – 6,8 com 1 mol L^{-1} NaHCO_3 . Foi adicionado 245 μL de tampão 0,25 mol L^{-1} Bis-Tris, 25 μL de 1 mol L^{-1} CaCl_2 e 30 μL de sais biliares (9,0 mg mL^{-1}), mantendo temperatura controlada e agitação por 15 min. Após este tempo foi adicionado pancreatina na relação de 1:25 (enzima : substrato), deixando reagir por 60 min. A reação foi interrompida por aquecimento a 90 °C por 5 min.

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

O perfil eletroforético das amostras digeridas *in vitro* foi determinado em sistema SDS-PAGE/Tricina (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987). Foi utilizada uma cuba vertical (Mini Protein II System, BioRad) e espaçadores de 1,5 mm com um sistema descontínuo

composto de gel de separação, gel espaçador e gel de empilhamento com 16,5, 10 e 4% de acrilamida, respectivamente. Os digeridos foram diluídos em tampão redutor (0,0625 mol L⁻¹ Tris-HCl, 2% SDS, 20% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, Coomassie Blue G-250, pH 6,8), aquecidos a 96 °C/5 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 µL da solução de cada digerido, contendo 0,2% de proteína. Após a corrida, os géis foram mantidos por 24 h em solução fixadora metanol/ácido acético/água (5:1:4) e corados por 48 h em solução de 0,025% Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich) em 10% ácido acético. Posteriormente os géis foram descorados em solução de 10% ácido acético. A MM dos peptídeos foi estimada utilizando padrão de 6,5 a 26 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

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

A análise cromatográfica foi realizada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com injetor automático e detector de absorvância de arranjo de diodos (Agilent, 1200 Series, Waldbronn, Alemanha). Foi utilizada coluna C18 Microsorb-MVTM (250 mm x 4,6 mm DI, 5 µm - Raenin Instrument Inc Company - Woburn, MA, EUA). As condições de corrida foram baseadas em Chicón et al. (2006), com algumas modificações. A composição dos solventes foi: solvente A: 0,04% ácido trifluoracético (TFA) em água Milli-Q, solvente B: 0,03% TFA em acetonitrila de grau cromatográfico, e foram filtrados através de membrana 0,45 µm (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha). A coluna foi mantida em temperatura ambiente, com fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 50 µL e detector fixado em 214 nm. As amostras, com concentração de 0,3% de proteína, foram filtradas em membranas de acetato de celulose 0,45 µm (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha). A coluna foi equilibrada com 100% do solvente A e as amostras foram eluídas em gradiente até 70% do solvente B em 40 min, atingindo 90% do solvente B em 50 min e recondicionada às condições iniciais durante 15 min.

Para obtenção e análise dos dados foi utilizado o software ChemStation para cromatografia líquida sistemas 3D (Agilent Technologies). Os cromatogramas dos

digeridos foram divididos em 3 zonas, de acordo com a porcentagem de acetonitrila na fase móvel: (I) alta hidrofiliçidade, até 17 min, com solução B na concentração entre 0 e 30%; (II) média hidrofiliçidade, entre 17 e 23 min, com solução B entre 30% e 40% e (III) baixa hidrofiliçidade, a partir de 23 min, com concentração de solução B acima de 40%.

4.11. Ensaio imunoquímico - ELISA

A antigenicidade das amostras de IPS pré-tratado termicamente, processado por HAP, polimerizado ou não com a TG, assim como os produtos da simulação da digestão *in vitro* foi avaliada por teste ELISA quanto à reatividade para IgE específica (IgE anti- β -Lg e IgE anti- α -La). Como controle, foi utilizado o IPS não tratado.

A IgE específica foi obtida de soro de camundongo e o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp, com número 2481-1 (A) (Anexo). Neste estudo foram utilizados 24 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c obtidos do CEMIB da UNICAMP, com 2 semanas de vida e mantidos em gaiolas coletivas com 6 animais cada, sob condições livre de patógenos específicos (SPF) no biotério experimental do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas – FCM/UNICAMP, com controle da umidade e temperatura, recebendo água e ração autoclavadas *ad libitum*.

Para obtenção dos anticorpos específicos (IgE anti- β -Lg e IgE anti- α -La), realizou-se a sensibilização inicial (primeiro dia) em todos os animais segundo o procedimento descrito por Villas-Boas et al. (2010). Os animais foram divididos em 4 grupos e, com seis semanas de vida, receberam, por via intraperitoneal e subcutânea, um total de 50 μ g de amostra suspensa em solução contendo adjuvante 3% Al(OH)₃ (alúmen), com volume total de 200 μ L por animal. O grupo 1 recebeu β -Lg, o grupo 2 α -La, o grupo 3 (controle) solução 3% Al(OH)₃ e grupo 4 (controle) solução salina (NaCl 0,9%) estéril. No 14^o e no 21^o dia após a sensibilização inicial, os animais receberam, por via intraperitoneal, dose reforço (20 μ g e 50 μ g de amostra, respectivamente) suspensa em 200 μ L de solução

salina estéril no 14^o dia e em 3% Al(OH)₃ na segunda dose reforço. Após 30 dias da sensibilização inicial, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 200 µL de 2,5% tiopental sódico em solução salina estéril para realização da punção cardíaca e coleta de sangue. Depois de retirado, o sangue foi centrifugado a 900x g/5 min a 20 °C para obtenção do soro. Do grupo de soros anti-β-Lg e anti-α-La obtidos deste estudo foram selecionados 4 soros de cada grupo que apresentaram maior reatividade contra as respectivas proteínas nativas para utilização no teste imunológico das amostras.

A análise dos níveis séricos de imunoglobulina foi realizada segundo Villas-Boas et al. (2010) com algumas modificações. Para análise de IgE específica, placas de polietileno contendo 96 poços foram adsorvidas com 100 µL de solução proteica (10 µg de proteína por poço) em tampão 0,05 mol L⁻¹ carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 16 h a 4 °C em câmara úmida.

As placas foram lavadas por 3 ciclos com solução 0,05% Tween 20 em solução 0,01 mol L⁻¹ salina fosfatada tamponada pH 7,4 (PBS) usando lavadora de placas (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Para bloqueio dos sítios inespecíficos, utilizou-se solução de Tween 20 (2,5%) em PBS por 2 h em temperatura ambiente. Após 3 lavagens, foram adicionados 100 µL de soro anti-β-Lg ou anti-α-La, previamente diluídos, na proporção de 1:100 em solução de 0,05% Tween 20 em PBS. Os poços destinados à realização da curva padrão foram adsorvidos com IgE (*Purified Mouse IgE*) com concentração inicial de 2000 ng mL⁻¹, seguida por diluições seriadas (1:1) em tampão 0,05 mol L⁻¹ carbonato-bicarbonato (pH 9,6) até a concentração de 7,8 ng mL⁻¹.

Após incubação de 16 h em câmara úmida, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL de anticorpo (*Purified Anti-mouse IgE*) diluído 1:500 em solução de Tween 20 (0,05%) em PBS e mantidas em câmara úmida por 2 h em temperatura ambiente. Após as lavagens, adicionou-se 100 µL de anticorpo conjugado com peroxidase (*Anti Rat IgG whole molecule*) na diluição 1:50000 em solução de 0,05% Tween 20 em PBS. Após incubação de 1 h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas novamente,

seguinte-se a adição de tetrametilbenzidina (TMB), e a reação foi bloqueada após 10 min com 1N H₂SO₄. Os valores de absorvância foram medidos a 450 nm, em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, Toronto, Canadá).

4.12. Análise Estatística

Para as análises de caracterização do IPS expressas em valores numéricos, os resultados foram expostos em média ± desvio padrão, submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey utilizando o *software STATISTICA* versão 7.0 (Stat Soft, Tulsa, EUA). Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Para análise estatística do teste ELISA, utilizou-se o programa computacional InSTAT (versão 3.05, 2000). Os valores encontrados foram expressos em média com ± 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 isolado proteico do soro de leite e da transglutaminase

O IPS apresentou $87,6 \pm 0,4\%$ de proteína. O perfil eletroforético do IPS obtido em sistema SDS-PAGE em meio redutor está apresentado na Figura 3. Identificou-se as bandas de β -Lg, α -La e BSA, de acordo com suas MM, 18,3 kDa, 14,2 kDa e 66 kDa, respectivamente. Também com base em suas MM, foram identificadas as bandas de cadeia pesada de imunoglobulina (Ig) e lactoferrina (LF), com 55 kDa e 86 kDa respectivamente (BASCH et al., 1985; KINGHORN et al., 1995).

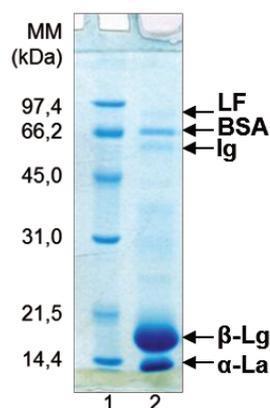


Figura 3. Perfil eletroforético SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12%), em meio redutor, do isolado proteico do soro de leite. Coluna 1: padrão de MM (14,4-97,4 kDa), coluna 2: isolado proteico do soro de leite.

O perfil eletroforético da preparação comercial de TG Activa WM (Figura 4, página 39) apresentou duas bandas nas regiões de aproximadamente 40 e 10 kDa. O perfil encontrado difere do reportado por Kanaji et al. (1993), o qual apresentou uma única banda para TG com MM de 38 kDa por SDS-PAGE e cromatografia de permeação em gel.

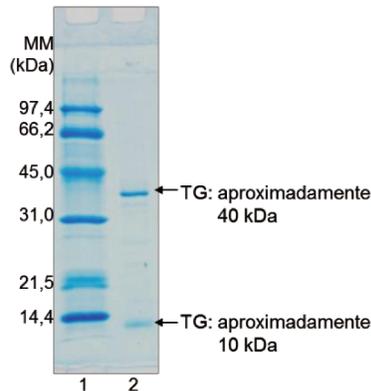


Figura 4. Perfil eletroforético SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12%), em meio redutor, de transglutaminase comercial Activa WM. Coluna 1: padrão de MM (14,4-97,4 kDa), coluna 2: transglutaminase comercial Activa WM (TG).

5.2. Tratamento térmico e homogeneização à alta pressão do isolado proteico do soro de leite

As soluções de IPS (1% m/v) homogeneizadas a 0, 100, 180 MPa ou multiprocessadas em 180 MPa por 3 ciclos consecutivos, pré-tratadas termicamente (72 °C/22 min) ou não, foram caracterizadas quanto à turbidez, teor de grupos sulfidrila reativos e livres e perfil eletroforético nos sistemas nativo, não-redutor e redutor.

5.2.1. Turbidez

A turbidez das amostras, avaliada como % de transmitância, foi realizada para estimar o efeito da alta pressão no grau de agregação das proteínas. A agregação de moléculas de proteína conduz à formação de partículas que dispersam a luz e fazem a solução parecer turva (HERMANSSON, 1979). Logo, quanto mais turva a solução, mais dispersa é a luz e menor é a transmitância apresentada. Entretanto, a transmitância fornece uma indicação qualitativa da extensão da agregação proteica, pois a concentração de agregados não pode ser determinada precisamente porque a turbidez

depende tanto do tamanho e efeito do espalhamento dos agregados como da sua concentração (McCLEMENTS; KEOGH, 1995).

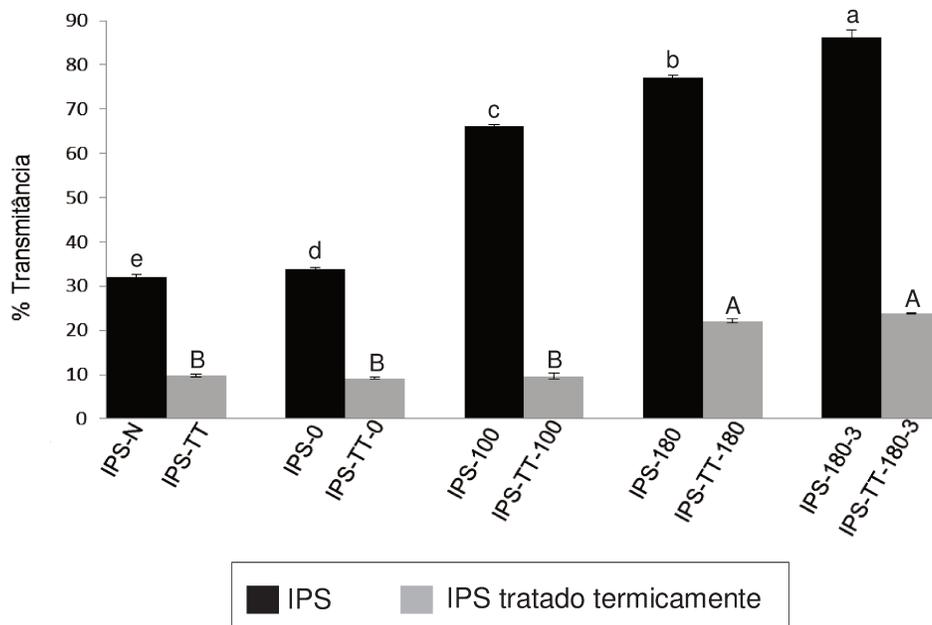


Figura 5. Percentual de transmitância das soluções de isolado proteico do soro de leite (IPS) homogeneizadas à alta pressão com e sem tratamento térmico prévio. IPS não tratado (IPS-N), IPS homogeneizado a 0, 100, 180 e 180 MPa por 3 ciclos (IPS-0, IPS-100, IPS-180, IPS-180-3, respectivamente), IPS tratado termicamente (72 °C/22 min) e IPS tratado termicamente homogeneizado a 0, 100, 180 e 180 MPa por 3 ciclos (IPS-TT-0, IPS-TT-100, IPS-TT-180, IPS-TT-180-3, respectivamente). Letras minúsculas diferentes e maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Os valores são médias de três determinações.

Para as amostras apenas homogeneizadas houve redução significativa ($P < 0,05$) da turbidez em todos os níveis de pressão analisados, sendo a amostra IPS-180-3 a que apresentou o maior valor de transmitância, 86,3%, quase três vezes superior ao IPS não tratado, 32,1% (Figura 5). O tratamento térmico resultou no aumento da turbidez, verificado pela transmitância de 9,8% da amostra IPS-TT, correspondente a 30% do valor da amostra não tratada (IPS-N). Todavia, após a homogeneização das amostras tratadas termicamente, houve diminuição significativa ($P < 0,05$) da turbidez para as amostras IPS-TT-180 e IPS-TT-180-3, que apresentaram valor de transmitância mais de duas vezes superior (22,1% e 23,8% respectivamente) ao verificado para a amostra não-

homogeneizada, IPS-TT (9,8% de transmitância) (Figura 5, página 40). O tratamento térmico causa a desnaturação das proteínas, incluindo perda de estrutura terciária e secundária, com exposição de grupos hidrofóbicos, podendo resultar em agregação (GOETZ; KOEHLER, 2005). No presente estudo, a redução da turbidez após o tratamento nos níveis mais altos de pressão pode ser resultante da diminuição do número ou do tamanho dos agregados proteicos nas soluções.

Em níveis de pressão semelhantes ao utilizado no presente estudo, Grácia-Juliá et al. (2008) também verificaram diminuição do tamanho das partículas de solução de IPS (6% m/m) homogeneizadas à pressão de 100-200 MPa devido ao efeito dispersivo da HAP nos agregados proteicos. Utilizando homogeneização a 100-300 MPa, Bouaouina et al. (2006) também relataram dissociação de agregados proteicos em solução de IPS (3% m/m). Zhong et al. (2012) observaram diminuição do tamanho das partículas em solução de β -Lg homogeneizada por 3 ciclos consecutivos em 80 MPa e aumento do tamanho quando a solução de β -Lg foi homogeneizada em pressões mais elevadas, de 160 MPa. Os autores afirmam que a HAP até 80 MPa tenha induzido a desagregação de proteínas e em níveis superiores ocorreu a reagregação das proteínas.

5.2.2. Grupos sulfidrilas reativos e livres

A Tabela 2 (página 42) mostra os teores de grupos sulfidrilas (SH) reativos e livres de IPS homogeneizado à alta pressão pré-tratado termicamente ou não. Grupos sulfidrilas reativos correspondem aos resíduos SH presente na superfície da proteína e os grupos sulfidrilas livres são todos os grupos SH da proteína, seja presente na superfície ou no interior da molécula (VAN DER PLANCKEN; VAN LOEY; HENDRICKX, 2005).

O teor de grupos SH reativos diminuiu com o aumento do nível de pressão utilizado (Tabela 2, página 42). Entre as amostras apenas homogeneizadas, foi observada diminuição significativa ($P < 0,05$) de cerca de 11% do teor de grupos SH reativos para a

amostra IPS-180-3 em relação ao IPS-N. Entre as amostras tratadas termicamente e homogeneizadas, IPS-TT-180-3 e IPS-TT-180 apresentaram diminuição ($P < 0,05$) de aproximadamente 16% e 13% de grupos SH reativos respectivamente, em relação à amostra não-homogeneizada (IPS-TT). A diminuição de grupos SH reativos pode ter ocorrido por formação de pontes dissulfeto intermoleculares ou por alteração conformacional da proteína que resultou no encobrimento desses grupos.

Tabela 2. Grupos sulfidril reativos e livres ($\mu\text{mol SH g}^{-1}$ proteína) após homogeneização à alta pressão de solução de isolado proteico do soro de leite (IPS) e IPS pré-tratado termicamente (IPS-TT).

Nível de pressão (MPa)	IPS		IPS-TT	
	SH reativos $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ proteína	SH livres $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ proteína	SH reativos $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ proteína	SH livres $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ proteína
--	24,95± 0,33 ^{ab}	33,01±0,19 ^a	26,08± 0,77 ^a	29,73±0,83 ^{a#}
0	25,61± 0,70 ^a	32,45±0,31 ^a	23,68± 0,37 ^{b*}	28,95±0,60 ^{a#}
100	24,81±0,25 ^{ab}	30,85±0,39 ^b	25,03±0,90 ^a	29,03±0,69 ^{a#}
180	24,70±0,42 ^b	30,48±0,30 ^b	22,83±0,83 ^{bc*}	25,97±1,09 ^{b#}
180-3	22,25±0,54 ^c	26,47±0,28 ^c	21,92±0,67 ^c	25,68±0,51 ^{b#}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$). * indica diferença significativa no teor de SH reativa ($P < 0,05$) para amostras tratadas com o mesmo nível de pressão. # indica diferença significativa no teor de SH livre ($P < 0,05$) para amostras tratadas com o mesmo nível de pressão. Os valores são médias de três determinações.

Os grupamentos SH livres também tiveram seu teor diminuído com o aumento do nível de pressão (Tabela 2, página 42). As amostras IPS-100, IPS-180 e IPS-180-3 apresentaram diminuição ($P < 0,05$) de 7, 8 e 20%, respectivamente, dos teores de grupos SH livres em relação ao IPS-N. A amostra IPS-180-3 também apresentou diminuição

significativa ($P < 0,05$) de mais de 10% de grupos SH livres em relação à IPS-100 e IPS-180 (Tabela 2, página 42). Para as soluções tratadas termicamente e homogeneizadas, as amostras IPS-TT-180 e IPS-TT-180-3 apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) de 13% e 14% de grupos SH livres respectivamente em relação à amostra não-homogeneizada (IPS-TT). A diminuição dos grupos SH livres das soluções de IPS com e sem tratamento térmico prévio com o aumento da pressão de homogeneização pode ser devido à interação entre as moléculas proteicas que favoreceram a formação de pontes dissulfeto. Embora tenha havido diminuição significativa de grupos SH reativos e livres nas amostras de IPS homogeneizado à alta pressão com tratamento térmico prévio ou não, as alterações foram pequenas, portanto, pontes dissulfeto formadas foram em pequeno número. A formação de pontes dissulfeto não resultou em agregados de número e tamanho suficientes para dissipar a luz e aumentar a turbidez das amostras (Figura 5, página 40).

A diminuição do teor de sulfidril livre nas amostras de IPS tratadas termicamente e homogeneizadas em relação às amostras apenas homogeneizadas (Tabela 2, página 42) é decorrente da desnaturação das proteínas do soro de leite que, dependendo da temperatura e tempo de tratamento, podem se agregar via ponte dissulfeto (PHOTCHANACHAI; KITABAKE, 2001). A β -Lg sofre desnaturação parcial com modificações estruturais irreversíveis acima de 60-70 °C (DE WIT, 2009), enquanto a α -La inicia sua desnaturação em torno de 59 °C (GOETZ; KOEHLER, 2005), desnaturando-se reversivelmente até 64 °C, se isolada, e irreversivelmente se aquecida em mistura com β -Lg (SGARBIERI et al., 2005). Photchanachai e Kitabake (2001) verificaram por SDS-PAGE a formação de agregados de β -Lg estabilizados por pontes dissulfeto intermoleculares após tratamento térmico acima de 80 °C. Resultado semelhante foi relatado por Palazolo et al. (2000) que verificaram que tratamento térmico da β -Lg a 85 °C/60 min resulta na formação de agregados por meio de pontes dissulfeto intermoleculares, enquanto temperatura de 65 °C inicia a desnaturação, mas ainda mantém residual de proteína em sua forma nativa.

5.2.3. Perfil eletroforético das amostras de IPS

As amostras foram analisadas por eletroforese em três diferentes sistemas para avaliar se houve alteração estrutural das proteínas devido aos tratamentos realizados. Em sistema nativo, a separação é baseada na carga, tamanho e formato das diferentes proteínas e/ou peptídeos presentes na amostra (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; KINGHORN et al., 1995). Logo, se houver formação de agregados ou alteração estrutural que modifique o formato ou carga das proteínas, pode haver diferença no deslocamento dessa proteína no gel. Em sistema não-redutor utiliza-se SDS como agente desnaturante, mas não se faz uso de agente redutor, portanto, neste sistema, agregados formados por pontes dissulfeto mantêm-se intactos (GALANI; APENTEN, 1999). Em sistema redutor, além de SDS, um agente redutor é empregado para quebrar as pontes dissulfeto (HAMES, 1998).

Os perfis eletroforéticos das amostras de IPS pré-tratadas termicamente ou não, homogeneizadas à alta pressão nos diferentes sistemas utilizados encontram-se na Figura 6 (página 45).

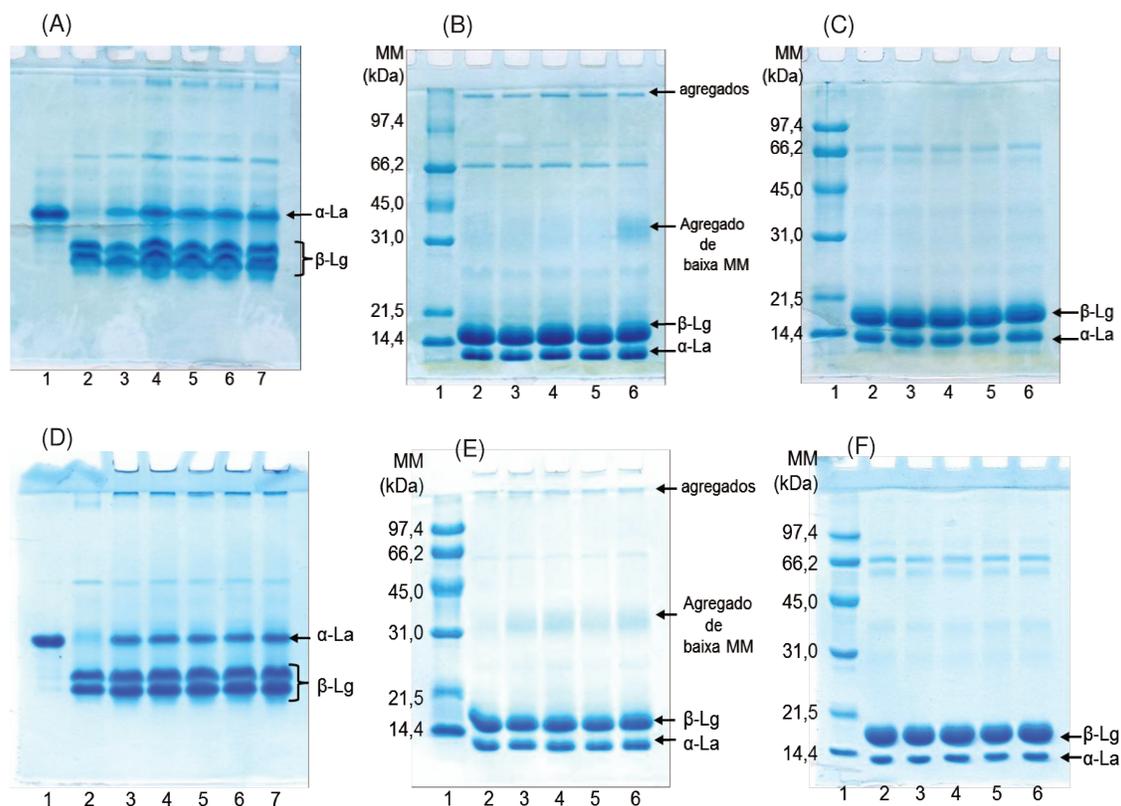


Figura 6. Perfis eletroforéticos (gel de poliacrilamida – 12%) de isolado proteico do soro de leite (IPS) homogeneizado à alta pressão (A, B e C) e IPS tratado termicamente (72 °C/22 min) e homogeneizado à alta pressão (D, E e F). (A) e (D) Sistema nativo. Coluna 1A e 1D: α -La, coluna 2A e 2D: β -Lg, coluna 3A: IPS-N, coluna 4A: IPS-0, coluna 5A: IPS-100, coluna 6A: IPS-180 e coluna 7A: IPS-180-3; coluna 3D: IPS-TT, coluna 4D: IPS-TT-0, coluna 5D: IPS-TT-100, coluna 6D: IPS-TT-180 e coluna 7D: IPS-TT-180-3. (B) e (E) Sistema não-redutor; (C) e (F) Sistema redutor. Coluna 1B e 1C: padrão de MM (14,4-97,4 kDa), coluna 2B e 2C: IPS-N, coluna 3B e 3C: IPS-0, coluna 4B e 4C: IPS-100, coluna 5B e 5C: IPS-180, coluna 6B e 6C: IPS-180-3, coluna 1E e 1F: padrão de MM (14,4-97,4 kDa), coluna 2E e 2F: IPS-TT, coluna 3E e 3F: IPS-TT-0, coluna 4E e 4F: IPS-TT-100, coluna 5E e 5F: IPS-TT-180, coluna 6E e 6F: IPS-TT-180-3.

Em sistema nativo, observa-se a separação das principais proteínas presentes no IPS não tratado, β -Lg (variantes A e B) e α -La (Figura 6A) e a inversão das bandas destas proteínas em relação ao sistema redutor e não-redutor (Figuras 6B e 6C). Esta inversão ocorre, pois neste sistema a separação é baseada na carga e no tamanho das diferentes moléculas proteicas, assim as duas variantes da β -Lg (A e B) separam-se e a α -La mantém-se acima da β -Lg apesar de ter menor MM (KINGHORN et al., 1995). Os perfis das amostras homogeneizadas previamente tratadas termicamente ou não (Figuras 6D e

6A) mostraram-se semelhantes em relação às amostras não-homogeneizadas (IPS-TT e IPS-N, coluna 3 das Figuras 6D e 6A, respectivamente), independente do nível de pressão (0 a 180 MPa) utilizado. Também não foram observadas diferenças entre as amostras tratadas termicamente antes da HAP das não tratadas (Figuras 6A e 6D, página 45). Este resultado sugere que a HAP não provocou alterações nas proteínas quanto à carga superficial e/ou alteração de tamanho nos níveis de pressão analisados.

Em sistema não-redutor, as amostras apenas homogeneizadas (Figura 6B, página 45) apresentaram perfil similar ao da amostra não tratada (IPS-N). A exceção foi a amostra IPS-180-3, que apresentou uma banda larga e difusa de coloração mais intensa na faixa entre 31 e 45 kDa, que pode ter sido resultado de agregação de duas moléculas de β -Lg e/ou β -Lg e α -La. Esta amostra apresentou também diminuição significativa do teor de sulfidrila livre em relação às demais (Tabela 2, página 42), o que pode sugerir a formação agregados por pontes dissulfeto. Nos perfis das amostras tratadas termicamente e homogeneizadas (Figura 6E, página 45) também observou-se uma banda entre 31 e 45 kDa, mais intensa que no perfil da amostra não-homogeneizada (IPS-TT). Esta banda pode ter resultado da interação entre moléculas de β -Lg ou de β -Lg e α -La por ponte dissulfeto, uma vez que em sistema redutor as amostras não apresentaram esta banda com coloração acentuada (Figuras 6C e 6F, página 45).

Em sistema não-redutor, observou-se ainda a presença de banda de MM acima de 97,4 kDa nos perfis de todas as amostras homogeneizadas (Figuras 6B e 6E, página 45) e também nos das amostras não-homogeneizadas (IPS-N e IPS-TT, coluna 2 das Figuras 6B e 6E, respectivamente, página 45). Estas bandas possivelmente correspondem a agregados formados por pontes dissulfeto intermoleculares, já que em sistema redutor estas bandas não apareceram (Figuras 6C e 6F, página 45).

Em sistema redutor tanto as amostras homogeneizadas (Figura 6C, página 45), quanto as tratadas termicamente e homogeneizadas (Figura 6F, página 45) apresentaram perfil semelhante ao das amostras não-homogeneizadas (IPS-N e IPS-TT, coluna 2 das

Figuras 6C e 6F respectivamente, página 45), sugerindo que alterações como proteólise ou formação de ligações isopeptídicas não ocorreram.

Em níveis de pressão próximos ao utilizado no atual estudo, Grácia-Juliá et al. (2008) também não observaram alterações do perfil eletroforético em sistema nativo de dispersões de IPS homogeneizadas até 200 MPa. Em sistema nativo, os autores observaram a presença de banda de alta MM em IPS, que se acentuou com aumento da pressão, acima de 250 MPa, possivelmente devido à agregados formados principalmente por interações hidrofóbicas, pois não estavam presentes em sistema SDS-PAGE não-redutor (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008). Em sistema não-redutor, Bouaouina et al. (2006) também observaram em soluções de IPS homogeneizados até 300 MPa, banda de alta MM, as quais não apareceram em sistema redutor, indicando a formação de agregados por ponte dissulfeto. Em concordância ao presente estudo, Desrumaux e Marcand (2002) também não verificaram alteração do perfil eletroforético em sistema redutor das proteínas do leite processadas em pressão de 300 MPa.

5.3. Polimerização do IPS pela enzima transglutaminase

Os perfis eletroforéticos do IPS-N e das amostras homogeneizadas com ou sem pré-tratamento térmico e posteriormente polimerizadas pela TG (25 U g⁻¹ de proteína) são mostrados na Figura 7 (página 48).

Os perfis das amostras submetidas à reação com a TG apresentaram bandas no início do gel de separação, que indicam a formação de polímeros de alta MM. As amostras IPS-TT-180 TG e IPS-TT-180-3 TG apresentaram bandas que não conseguiram penetrar no gel de empilhamento indicando a presença de polímeros de MM maior, diferenciando-as das demais.

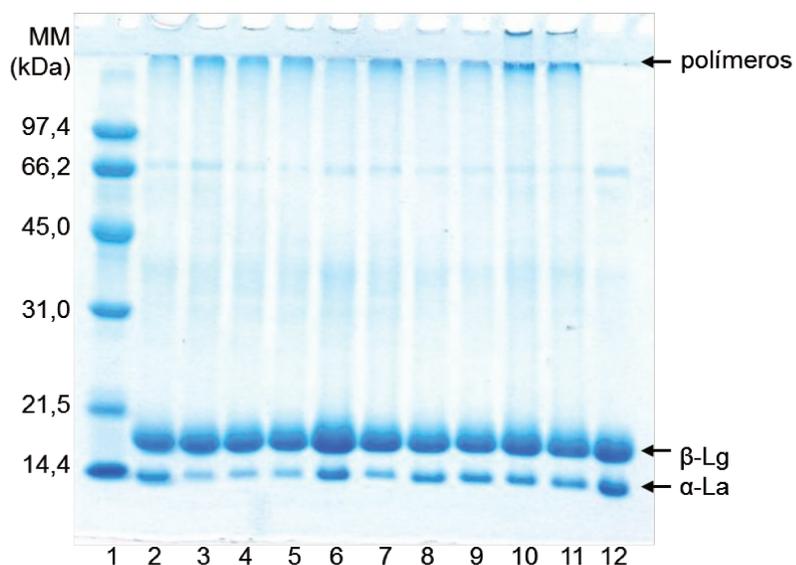


Figura 7. Perfil eletroforético SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12%), em meio redutor, de isolado proteico do soro de leite (IPS) homogeneizado à alta pressão, com e sem tratamento térmico prévio, polimerizados pela TG. Colunas: (1) padrão de MM (14,4 – 97,4 kDa); (2) IPS-N TG; (3) IPS-0 TG; (4) IPS-100 TG; (5) IPS-180 TG; (6) IPS-180-3 TG; (7) IPS-TT TG (8) IPS-TT-0 TG; (9) IPS-TT-100 TG; (10) IPS-TT-180 TG; (11) IPS-TT-180-3 TG; (12) IPS-N.

Pela análise densitométrica, verificou-se que a concentração relativa de polímeros de alta MM variou em função do pré-tratamento realizado (Tabela 3, página 49). A HAP antes da polimerização resultou na formação de aproximadamente 16% de produtos com $MM > 97,4$ kDa, exceto para a amostra IPS-180-3 TG, que apresentou percentual de formação de polímeros menor (~7%), semelhante ao da amostra apenas polimerizada, IPS-N TG.

Quando a HAP foi realizada após o tratamento térmico, houve aumento da polimerização principalmente das amostras tratadas a 180 MPa. As amostras IPS-TT-180 TG e IPS-TT-180-3 TG apresentaram maior concentração de polímeros ([polímeros]) em relação às demais amostras ($P < 0,05$) (Tabela 3, página 49). A polimerização pode ter sido favorecida pela ruptura dos agregados proteicos após HAP neste nível de pressão, verificado pela diminuição da turbidez (Figura 5, página 40). Essas amostras apresentaram $[\alpha\text{-La}]$ menor que a amostra apenas polimerizada (IPS-N TG) e estão dentre as que apresentaram menor $[\beta\text{-Lg}]$ ($P < 0,05$). Esses resultados juntamente com o

aumento na [polímeros] sugerem que a associação do tratamento térmico à HAP tenha tornado o substrato mais suscetível à ação da TG (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração relativa de β -lactoglobulina [β -Lg], α -lactalbumina [α -La] e polímeros [polímeros] formados nas amostras de isolado proteico do soro de leite (IPS) submetidas à polimerização com a enzima transglutaminase (TG).

Amostras	[polímeros] (%)	[β -Lg] (%)	[α -La] (%)
IPS-N	1,9 \pm 0,1 ^g	62,6 \pm 1,0 ^b	32,2 \pm 1,0 ^a
IPS-N TG	8,7 \pm 0,2 ^f	62,4 \pm 0,2 ^b	27,1 \pm 0,5 ^b
IPS-0 TG	17,0 \pm 0,4 ^{bcd}	69,4 \pm 1,0 ^a	10,6 \pm 0,5 ^e
IPS-100 TG	16,9 \pm 0,8 ^{bcd}	71,0 \pm 1,3 ^a	10,6 \pm 0,1 ^e
IPS-180 TG	16,0 \pm 1,0 ^{ce}	71,3 \pm 0,7 ^a	11,5 \pm 0,1 ^e
IPS-180-3 TG	7,0 \pm 0,3 ^f	68,8 \pm 0,9 ^a	22,5 \pm 1,1 ^c
IPS-TT TG	17,3 \pm 1,4 ^{bc}	69,7 \pm 0,9 ^a	11,8 \pm 0,4 ^e
IPS-TT-0 TG	13,8 \pm 0,7 ^{de}	62,4 \pm 1,4 ^b	22,5 \pm 0,7 ^c
IPS-TT-100 TG	12,6 \pm 0,5 ^e	62,8 \pm 1,3 ^b	23,0 \pm 0,8 ^c
IPS-TT-180 TG	22,5 \pm 0,8 ^a	59,1 \pm 1,7 ^b	17,1 \pm 0,7 ^d
IPS-TT-180-3 TG	19,7 \pm 1,6 ^{ab}	59,6 \pm 1,7 ^b	19,4 \pm 0,1 ^d

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Os valores correspondem a médias \pm desvio padrão de 3 repetições.

Nas amostras polimerizadas, a concentração relativa de β -Lg ([β -Lg]) variou de 59,1 a 71,3%, enquanto a concentração de α -La ([α -La]) variou de 10,6 a 27,1%. A menor [β -Lg] ($P < 0,05$) foi observada nas amostras IPS-N TG, IPS-TT-0 TG, IPS-TT-100 TG, IPS-TT-180 TG e IPS-TT-180-3 TG. Entretanto, quando as amostras de IPS foram apenas homogeneizadas (IPS-0 TG, IPS-100 TG, IPS-180 TG e IPS-180-3 TG) ou apenas tratada termicamente (IPS-TT TG) houve aumento da [β -Lg] em relação à amostra não-tratada, apenas polimerizada (IPS-N TG), sugerindo que a utilização destes tratamentos isolados foi desfavorável à participação da β -Lg na formação de polímeros. Contudo, a homogeneização e o tratamento térmico aplicados isoladamente resultaram na diminuição

da [α -La]. As amostras IPS-0 TG, IPS-100 TG, IPS-180 TG e IPS-TT TG apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) da [α -La] (Tabela 3, página 49).

Logo, os tratamentos utilizados previamente à polimerização - homogeneização à alta pressão isolada ou após tratamento térmico - contribuiram para o aumento significativo ($P < 0,05$) da polimerização do IPS, em relação ao IPS não tratado previamente (Tabela 3, página 49).

Assim como a HAP pode ter provocado alterações estruturais na α -La que intensificaram sua polimerização pela TG, estudos apontam que a presença de SDS aumentou sua polimerização, embora a α -La seja polimerizada pela TG sem tratamento prévio (SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001). Já a β -Lg necessita de tratamento térmico prévio ou da presença de agente redutor para ser polimerizada pela TG (SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001).

Assim como no presente estudo, Rodriguez-Nogales (2006) também observou que o tratamento térmico resultou no aumento da polimerização pela TG das proteínas do soro de leite. No entanto, os autores relataram que temperaturas mais altas do que a utilizada no atual estudo, 90 °C/60 min e 83,4 °C/55,7 min, para a α -La e β -Lg, respectivamente, foram as melhores condições de pré-tratamento para formação de ligações cruzadas covalentes e formação de polímeros (RODRIGUEZ-NOGALES 2006).

Resultado semelhante ao presente trabalho também foi observado por Villas-Boas et al. (2010), que relataram que a β -Lg isolada tratada termicamente (80 °C/60 min) foi polimerizada pela TG formando polímeros de alta MM. Entretanto, os autores observaram que na presença do agente redutor Cys, a banda de β -Lg apresentou-se menos intensa do que nas amostras tratadas termicamente, indicando uma polimerização mais eficiente, pois alterou a estrutura da proteína, facilitando a ação da TG.

5.4. Efeito dos tratamentos nas soluções de IPS na digestão gástrica e gastrointestinal simulada *in vitro*

As proteínas, de acordo com sua estrutura, são degradadas diferentemente pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de di ou tripeptídeo (TOMÉ; DEBABBI, 1998; PICARIELLO et al., 2010). Entretanto, polipeptídeos ou mesmo proteínas resistentes à digestão podem ser absorvidos em pequena quantidade (GARDNER et al., 1988). Estes fragmentos grandes, assim como proteínas intactas quando absorvidos tem o potencial de provocar sensibilização ou desencadear uma resposta alérgica em indivíduos suscetíveis (DUPONT et al., 2010; MARTOS et al., 2010; YOSHINO et al., 2004).

Como a resistência às enzimas digestivas é um dos parâmetros para avaliar o potencial alergênico de proteínas (YOSHINO et al., 2004; ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996), foi realizada a digestão das amostras tratadas por HAP com tratamento térmico prévio ou não e das amostras tratadas e polimerizadas, assim como do IPS não tratado, IPS-N, como controle.

Os perfis eletroforéticos dos digeridos gástrico e gastrointestinal das amostras de IPS tratadas termicamente ou não e processadas por HAP, assim como das amostras polimerizadas por TG encontram-se na Figura 8 (página 52).

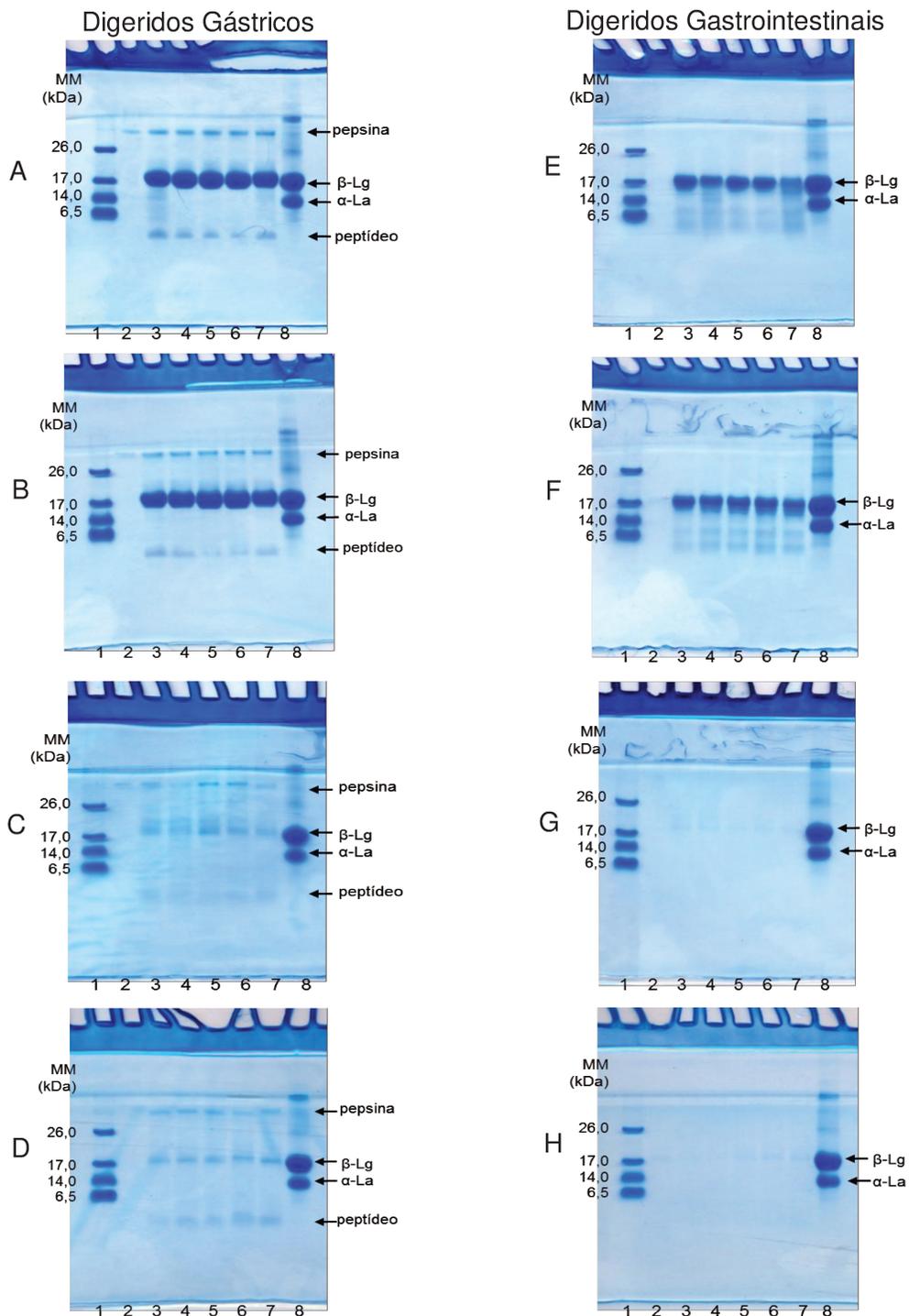


Figura 8. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor de digeridos gástricos (A,B,C,D) e gastrointestinais (E,F,G,H) de (A,E) IPS homogeneizado à alta pressão (HAP), (B,F) IPS tratado termicamente (TT) e HAP, (C,G) IPS HAP polimerizado com TG e (D,H) IPS TT HAP polimerizado com TG. As colunas referem-se aos diferentes níveis de pressão utilizados: (1) padrão de MM (6,5-26 kDa); (2A,B,C,D) Pepsina; (2E,F,G,H) Pancreatina; (3) IPS; (4) IPS 0 MPa; (5) IPS 100 MPa; (6) IPS 180 MPa; (7) IPS 180 MPa por 3 ciclos; (8) IPS antes da digestão.

Os perfis dos digeridos gástricos das amostras tratadas por HAP foram semelhantes entre si, independente do nível de pressão utilizado, e diferiram do digerido da amostra não tratada (IPS-N), pois nesta observa-se a formação de peptídeos com MM entre 17 e 6,5 kDa, ausentes nas amostras homogeneizadas (Figura 8A, página 52). Possivelmente, a HAP influenciou a suscetibilidade do IPS à pepsina, alterando os produtos formados. Os perfis dos digeridos gástricos das amostras homogeneizadas após tratamento térmico (Figura 8B, página 52) não diferiram em função da pressão utilizada. Após a digestão gástrica das amostras homogeneizadas com e sem tratamento térmico prévio, a banda correspondente à α -La não foi detectada em nenhuma das amostras, indicando que esta proteína foi totalmente hidrolisada pela pepsina (Figuras 8A e 8B, página 52). Nestas mesmas amostras, a banda de β -Lg permaneceu visível, indicando resistência parcial à ação da pepsina (Figuras 8A e 8B, página 52). O tratamento térmico prévio à HAP parece não ter efeito sobre o padrão de digestão com a pepsina (Figura 8B, página 52), pois os perfis dos seus digeridos mostraram-se semelhantes aos das amostras apenas homogeneizadas (Figura 8A, página 52). Entretanto, ao contrário do observado no atual estudo, Nik, Wright e Corredig (2010) relataram que houve diminuição da banda de β -Lg em amostras de IPS tratadas termicamente (85 °C/15 min) antes da HAP a 69 MPa, após simulação da digestão gástrica. Para os autores este resultado é decorrente das alterações estruturais ocorridas durante o aquecimento, aumentando a suscetibilidade da β -Lg à pepsina. A hidrólise parcial da β -Lg pela pepsina foi observada mesmo após pré-tratamento térmico a temperaturas mais altas (100 °C/5 min) e decorridos 60 min de reação ainda havia proteína intacta (TAKAGI et al., 2003).

Os digeridos gástricos das amostras polimerizadas pela TG após homogeneização sem ou com tratamento térmico prévio (Figuras 8C e 8D, página 52) não apresentaram diferenças em função do nível de pressão da homogeneização. Os digeridos das amostras homogeneizadas e polimerizadas (Figura 8C, página 52) apresentaram bandas de MM > 18,3 kDa mais resolvidas e intensas que as observadas nos perfis dos digeridos das amostras que também sofreram tratamento térmico (Figura 8D, página 52). Estes

resultados podem ser em função dos diferentes produtos de polimerização obtidos a partir dos diferentes tratamentos, como observado nas amostras homogeneizadas que apresentaram maior concentração relativa de β -Lg em relação às tratadas termicamente antes da homogeneização (Tabela 3, página 49). Assim como observado nos perfis dos digeridos gástricos das amostras não polimerizadas (Figuras 8A e 8B, página 52), a banda da α -La desapareceu, indicando hidrólise pela pepsina, independente dos tratamentos realizados (Figuras 8C e 8D, página 52).

Nos digeridos das amostras polimerizadas (Figuras 8C e 8D, página 52) a banda da β -Lg ficou menos intensa, sugerindo maior suscetibilidade à hidrólise pela pepsina que as amostras que sofreram os mesmos tratamentos, mas não foram polimerizadas (Figuras 8A e 8B, página 52). Este resultado sugere que a polimerização pode ter facilitado a hidrólise da β -Lg pela pepsina (Figuras 8C e 8D, página 52). Contudo, não houve diferença entre as amostras pré-tratadas e polimerizadas da amostra apenas polimerizada (IPS-N-TG, Figura 8C, coluna 3, página 52). Aparentemente, a polimerização foi o tratamento que mais influenciou no perfil da digestão gástrica das amostras. Como observado no presente estudo, o aumento da hidrólise por pepsina da β -Lg tratada termicamente (80 °C/60 min) e polimerizada pela TG foi relatado por Villas-Boas et al. (2012).

A α -La é hidrolisada pela pepsina em pH 2 sem receber tratamento prévio de acordo com Kim et al. (2007), Nik, Wright e Corredig (2010) e Kitabatake e Kinekawa (1998). A resistência da β -Lg à ação da pepsina tem sido relatada com frequência na literatura (MANDALARI, et al., 2009; TAKAGI et al., 2003; ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996; KITABATAKE; KINEKAWA, 1998). A resistência apresentada pela β -Lg à ação da pepsina deve-se à sua conformação estável em pH 2, que pode ser resultante do aumento das pontes de hidrogênio internas entre 2 grupos carboxilas ou entre 1 grupo amida e 1 carboxila (KELLA; KINSELLA, 1988).

A formação de peptídeos de $MM < 6,5$ kDa foi observada nos digeridos gástricos de todas as amostras, tratadas e polimerizadas ou não polimerizadas (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D, página 52). Estes peptídeos podem ser produtos de hidrólise de qualquer uma das proteínas do IPS, mas em menor proporção da β -Lg, já que esta é mais dificilmente hidrolisada pela pepsina. Nik, Wright e Corredig (2010) observaram a formação de uma banda de aproximadamente 15 kDa pela hidrólise da β -Lg nativa com pepsina e o aparecimento de duas bandas próximas a MM de 15 kDa, pela hidrólise do IPS previamente tratado a $85\text{ }^{\circ}\text{C}/15$ min. A formação de peptídeos também foi observada por Peñas et al. (2006). Com a aplicação de pressão isostática de 200 MPa por 15 min durante a hidrólise de IPS com pepsina, Peñas et al. (2006) observaram a ausência de β -Lg e α -La e 2 bandas de peptídeos de 6,4 e 4,1 kDa.

Após digestão gastrointestinal, os perfis eletroforéticos (Figuras 8E e 8F, página 52) das amostras de IPS homogeneizadas com ou sem tratamento térmico prévio também foram similares às amostras não-homogeneizadas (IPS-N e IPS-TT, coluna 3 das Figuras 8E e 8F, respectivamente, página 52). A banda correspondente à β -Lg, embora menos intensa que no digerido gástrico, ainda era perceptível em todas as amostras, indicando que a hidrólise não foi total para esta proteína nas condições utilizadas (Figuras 8E e 8F, página 52). Contudo, houve uma discreta atenuação da intensidade da banda de β -Lg e aumento da intensidade das bandas de peptídeos formados no digerido da amostra IPS-180-3 (Figura 8E, coluna 7, página 52) em relação às demais. Possivelmente a homogeneização a 180 MPa por 3 ciclos consecutivos expôs sítios específicos para as proteases da pancreatina, aumentando a hidrólise. Villas-Boas et al. (2012) também observaram resistência da β -Lg nativa e da β -Lg tratada termicamente ($80\text{ }^{\circ}\text{C}/60$ min) às enzimas gastrointestinais. Kim et al. (2007) observaram que após tratamento térmico ($100\text{ }^{\circ}\text{C}/10$ min) do concentrado proteico de soro de leite, a α -La nativa ou tratada termicamente foi totalmente hidrolisada pela pepsina e tripsina após 30 min, enquanto a banda de β -Lg ainda era visível no perfil eletroforético ao final da reação com pepsina e mesmo após 60 min de reação com tripsina, a β -Lg não havia sido totalmente hidrolisada.

Ao contrário do observado no presente estudo, Kitabatake e Kinekawa (1998) reportaram que tanto a β -Lg nativa quanto a β -Lg tratada termicamente (80 °C/60 min) foram hidrolisadas por pancreatina comercial, sendo que o tratamento térmico acelerou a hidrólise desta proteína. A diferença encontrada possivelmente decorre das diferentes condições utilizadas para simulação da digestão *in vitro*.

Observa-se nos perfis dos digeridos gastrointestinais das amostras não-polimerizadas a formação de bandas de peptídeos de MM < 14 kDa e MM < 6,5 kDa independente do tratamento prévio à digestão (Figuras 8E e 8F, página 52). Nos perfis eletroforéticos dos digeridos gastrointestinais de todas as amostras polimerizadas (Figuras 8G e 8H, página 52), a banda correspondente à β -Lg desapareceu quase completamente e não se observa bandas definidas de peptídeos como nas amostras não-polimerizadas (Figuras 8E e 8F, página 52). Este resultado indica que a hidrólise da β -Lg e das demais proteínas do IPS foi quase completa, mais extensa do que observado para as amostras não-polimerizadas (Figuras 8E e 8F, página 52), formando peptídeos de baixa MM, que não foram identificados na eletroforese (Figuras 8G e 8H, página 52). A polimerização parece contribuir para exposição dos sítios de clivagem das proteínas às enzimas, principalmente da β -Lg, uma vez que nos digeridos gastrointestinais praticamente não se observa a presença de proteína intacta como nos digeridos das amostras não-polimerizadas (Figuras 8E e 8F, página 52). Villas-Boas et al. (2012) também relataram que os produtos da digestão gastrointestinal de β -Lg isolada tratada termicamente (80 °C/60 min) e polimerizada não apresentaram banda de β -Lg. No entanto, os autores relataram a presença de bandas difusas com MM < 14 kDa e também MM > 26 kDa, indicando que os polímeros formados por esta proteína não foram eficientemente hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais.

Diferindo do observado para as proteínas do soro de leite no presente trabalho, a polimerização por TG pode dificultar a digestão de outras proteínas. A ovoalbumina apresentou aumento da resistência à ação da pepsina, tripsina e quimotripsina após ser

polimerizada por TG, que foi visualizada principalmente pela persistência de banda no gel de eletroforese dos digeridos gastrointestinais (GIOSAFATTO et al., 2012).

Como as amostras de IPS polimerizadas e digeridas (Figuras 8C, 8D, 8G e 8H, página 52) não apresentaram diferenças perceptíveis em seus perfis eletroforéticos, as amostras que apresentaram maior polimerização pela TG ($P < 0,05$) – IPS-TT-180 TG e IPS-TT-180-3 TG foram selecionadas para obtenção do perfil cromatográfico de seus digeridos. Considerou-se que estas amostras sofreram maior alteração após os tratamentos utilizados e poderiam apresentar diferença no perfil dos peptídeos dos digeridos, já que a alteração da estrutura da proteína pode aumentar ou diminuir a exposição dos sítios específicos à ação das enzimas digestivas.

Na Figura 9 (página 59) estão apresentados os perfis cromatográficos (CLAE-FR) dos digeridos gástricos das amostras de IPS que apresentaram maior polimerização pela TG ($P < 0,05$), sendo elas: IPS-TT-180 TG e IPS-TT-180-3 TG e das amostras tratadas no mesmo nível de pressão sem o tratamento térmico prévio IPS-180 TG, IPS-180-3 TG, para análise do efeito dos diferentes pré-tratamentos utilizados na suscetibilidade à digestão gástrica. Além dessas amostras, os mesmos tratamentos, mas sem a etapa de polimerização, foram estudados. O perfil de eluição foi dividido em três zonas de acordo com a porcentagem de acetonitrila na fase móvel. O IPS antes da digestão apresentou picos correspondentes a α -La e β -Lg nos tempos de retenção de 37 e 40 min, respectivamente, ou seja, na região mais hidrofóbica (região III).

Nos cromatogramas dos digeridos gástricos das amostras homogeneizadas com ou sem tratamento térmico prévio, observa-se o pico da β -Lg bem definido (Figuras 9B-G, página 59), porém não o pico referente à α -La, confirmando o resultado encontrado no perfil eletroforético (Figuras 8A e 8B página 52), de que esta proteína foi hidrolisada pela pepsina. As amostras homogeneizadas, IPS-180 e IPS-180-3 (Figuras 9C e 9D, página 59), assim como a amostra apenas tratada termicamente, IPS-TT (Figura 9E, página 59) e as tratadas termicamente antes da HAP, IPS-TT-180 e IPS-TT180-3 (Figuras 9F e 9G,

página 59) apresentaram pico de β -Lg intacta menor em relação à amostra não tratada (IPS-N, Figura 9B, página 59). Este resultado sugere que a HAP a 180 MPa por 1 ou 3 ciclos, assim como o tratamento térmico podem aumentar a hidrólise da β -Lg pela pepsina, possivelmente por alterarem a estrutura e exporem sítios específicos de clivagem. Entretanto, o tratamento térmico realizado antes da HAP não aumentou a hidrólise, já que o pico de β -Lg nestas amostras (Figuras 9F e 9G, página 59) manteve-se com área semelhante ao encontrado nos perfis das amostras apenas homogeneizadas (Figuras 9C e 9D, página 59).

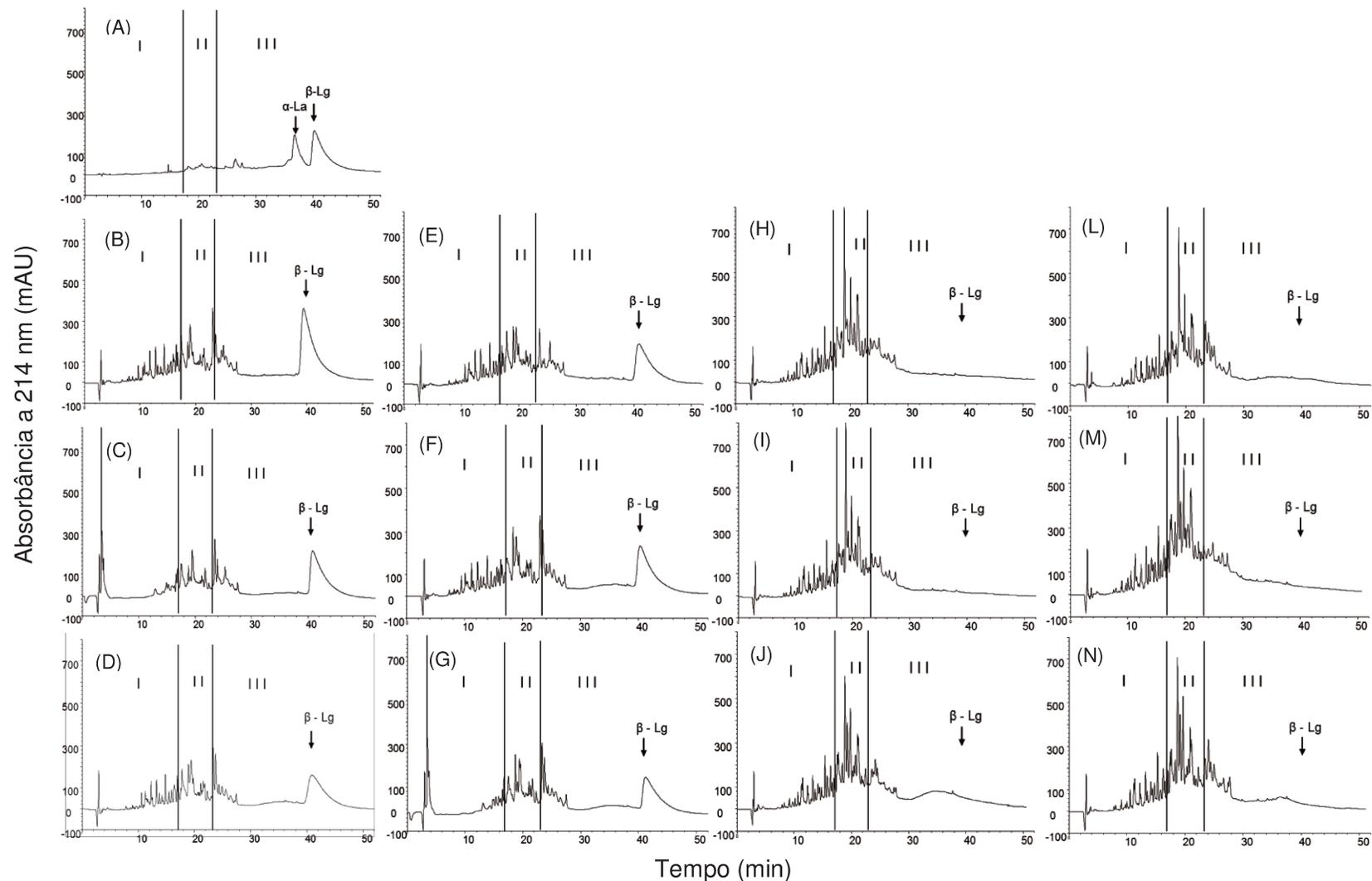


Figura 9. Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 214 nm de IPS-N (A) e dos digeridos por pepsina de IPS-N (B), IPS-180 (C), IPS-180-3 (D), IPS-TT (E), IPS-TT-180 (F), IPS-TT-180-3 (G), IPS-N TG (H), IPS-180 TG (I), IPS-180-3 TG (J), IPS-TT TG (L), IPS-TT-180 TG (M), IPS-TT-180-3 TG (N). Região I: Alta hidrofiliicidade, Região II: Média hidrofiliicidade, Região III: Baixa hidrofiliicidade.

Pela análise dos perfis cromatográficos das amostras tratadas com TG, verificou-se que houve aumento da altura dos picos na região de média hidrofiliidade após a simulação da digestão gástrica (Figuras 9H-N, página 59), em relação às amostras não-polimerizadas (Figuras 9B-G, página 59), sugerindo o aumento da hidrólise das proteínas pela pepsina. Entretanto, não houve diferença no perfil das amostras com diferentes pré-tratamentos, sendo que os principais picos da região de média hidrofiliidade, eluídos em 18, 19 e 21 min, estão presentes em todas as amostras (Figuras 9H-N, página 59). A polimerização parece aumentar a ação da pepsina no IPS, aumentando a formação de peptídeos e diminuindo o residual de proteína intacta independente dos tratamentos prévios realizados. Em nenhum dos perfis dos digeridos gástricos das amostras polimerizadas foi observado pico referente à β -Lg (Figuras 9H-N, página 59), ao contrário do que foi observado nos perfis eletroforéticos (Figuras 8C e 8D, página 52), nos quais é visível a banda de β -Lg. Possivelmente, na preparação para a análise cromatográfica, parte das amostras pode ter ficado nas membranas, dentre elas a β -Lg residual, não sendo, então, detectada. Ressalta-se que embora os resultados de CLAE-FR e eletroforese tenham divergências em relação à presença de β -Lg residual nos digeridos gástricos de amostras polimerizadas, estas técnicas são complementares para caracterização destes digeridos. Por outro lado, em concordância com os perfis eletroforéticos (Figuras 8A e 8B, página 52), nas amostras tratadas que não foram polimerizadas observa-se o pico de β -Lg residual. Logo, a reação de polimerização parece alterar a solubilidade da β -Lg nas condições de preparo da amostra para cromatografia.

Na Figura 10 (página 62) estão apresentados os perfis cromatográficos (CLAE-FR) dos digeridos gastrointestinais das amostras polimerizadas que foram selecionadas para o perfil de digerido gástrico. Os perfis dos digeridos gastrointestinais de IPS polimerizados (Figuras 10B-G, página 62) são similares ao do IPS-N (Figura 10A, página 62). Os picos concentram-se nas áreas de alta e média hidrofiliidade (regiões I e II), indicando o aumento da hidrólise das proteínas em relação aos digeridos gástricos (Figuras 9H-N,

página 59). Estes resultados estão em concordância com o observado por Villas-Boas et al. (2012) para o digerido gastrointestinal de β -Lg pré-tratada termicamente ou com agente redutor e polimerizada por TG comparados aos seus digeridos gástricos.

Embora a polimerização aumente a hidrólise das proteínas do IPS pelas enzimas gastrointestinais, conforme observado no perfil eletroforético (Figuras 8G e 8H, página 52), não foram observadas diferenças entre os perfis cromatográficos dos digeridos gastrointestinais das amostras polimerizadas (Figuras 10B-G, página 62) em relação a não tratada (IPS-N) (Figura 10A, página 62).

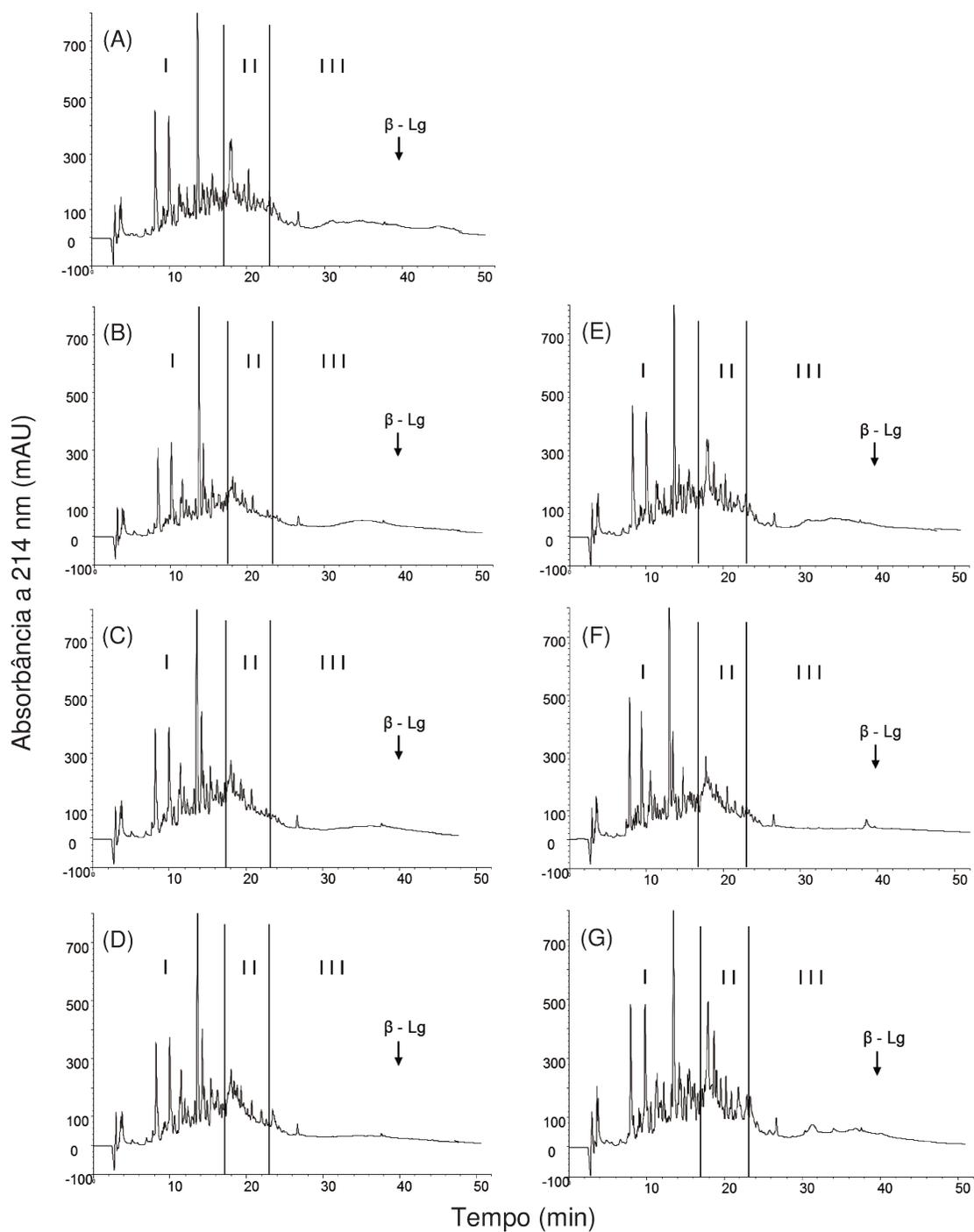


Figura 10. Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 214 nm de digeridos gastrointestinais de IPS não tratado (A) e IPS processado por HAP, pré-tratado termicamente ou não, e polimerizado com TG, IPS-N TG (B), IPS-180 TG (C), IPS-180-3 TG (D), IPS-TT TG (E), IPS-TT-180 TG (F), IPS-TT-180-3 TG (G). Região I: Alta hidrofiliicidade, Região II: Média hidrofiliicidade, Região III: Baixa hidrofiliicidade.

5.5. Efeitos dos tratamentos na antigenicidade do IPS

A antigenicidade das amostras foi avaliada por ELISA quanto à resposta de IgE específica, utilizando soros de animais sensibilizados com β -Lg ou α -La e com os soros controles de animais sensibilizados com solução salina ou alúmen. Como não houve diferença significativa ($P < 0,05$) de polimerização entre as amostras IPS-TT-180 TG e IPS-TT-180-3 TG, para esta etapa do trabalho selecionou-se a amostra IPS-TT-180 TG, devido ao custo-benefício da homogeneização à alta pressão por somente um ciclo.

Para comparação entre os efeitos dos diferentes tratamentos utilizados na resposta antigênica antes e após a digestão gástrica, avaliou-se também as amostras: IPS-TT TG, IPS-TT-180, IPS-TT e IPS-N. Além dessas amostras, a amostra IPS-TT-180 foi submetida às condições de polimerização (50 °C/180 min), porém sem a adição da enzima TG, para verificar se esta condição não teria influência na antigenicidade da amostra. A sigla dada a esta amostra foi IPS-TT-180 STG.

As respostas de IgE específica de soro de animais sensibilizados com β -Lg ou α -La frente às amostras antes e após digestão gástrica estão apresentadas na Tabela 4 (página 64). Não foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) para a amostra IPS-N antes e após digestão por pepsina quando analisada frente ao soro anti- β -Lg.

Verificou-se que independente do tratamento utilizado nas amostras - tratamento térmico, HAP associados ou não e polimerização por TG - não houve redução da resposta antigênica da β -Lg em relação ao IPS nativo (Tabela 4, página 64).

Tabela 4. Análise da resposta de IgE ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de soro anti- β -Lg e anti- α -La frente às amostras selecionadas de isolado proteico do soro de leite (IPS), antes e após a digestão gástrica.

Amostras	Anti- β -Lg IgE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Anti- α -La IgE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Antes da digestão	Digerido Gástrico	Antes da digestão	Digerido Gástrico
IPS-TT-180 TG	31,70 \pm 5,51 ^{abcA}	13,59 \pm 2,61 ^{cb}	11,93 \pm 1,05 ^{cA}	8,54 \pm 2,65 ^{cb}
IPS-TT TG	40,49 \pm 9,01 ^{abA}	14,93 \pm 2,13 ^{bcB}	18,15 \pm 4,14 ^{abcA}	10,08 \pm 2,72 ^{bcB}
IPS-TT-180	48,16 \pm 5,43 ^{abA}	46,47 \pm 6,24 ^{abA}	27,88 \pm 4,12 ^{abA}	30,54 \pm 4,20 ^{abA}
IPS-TT-180 STG	21,93 \pm 3,01 ^{cA}	14,99 \pm 2,42 ^{bcB}	13,34 \pm 1,07 ^{bcA}	7,85 \pm 1,18 ^{cb}
IPS-TT	29,77 \pm 2,25 ^{bcA}	30,86 \pm 2,48 ^{abcA}	18,86 \pm 2,93 ^{abB}	20,19 \pm 3,30 ^{abA}
IPS-N	34,96 \pm 7,74 ^{abcA}	34,21 \pm 4,72 ^{abA}	12,80 \pm 2,21 ^{bcB}	15,60 \pm 2,54 ^{abcA}

Para os grupos controle salina ou alúmen, todas as amostras analisadas apresentaram capacidade de ligação à IgE abaixo do valor mínimo detectado pela curva padrão.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos anti- β -Lg ou entre os grupos anti- α -La.

Embora as amostras IPS-TT e IPS-TT-180 não tenham se diferenciado significativamente ($P < 0,05$) da amostra não tratada, IPS-N, o tratamento térmico e a subsequente homogeneização a 180 MPa (IPS-TT-180) resultou no aumento ($P < 0,05$) de 62% na antigenicidade da β -Lg em relação à amostra não homogeneizada, IPS-TT. Zhong et al. (2011), utilizando pré-tratamento térmico (70 °C/30 min), semelhante ao utilizado no presente estudo, e homogeneização por 3 ciclos a 160 MPa observaram que a antigenicidade da β -Lg manteve-se próxima aos valores da amostra não-tratada.

Após a digestão gástrica, a amostra IPS-TT-180 TG apresentou diminuição significativa ($P < 0,05$) da antigenicidade da β -Lg, com resposta correspondente a cerca de 40% do valor apresentado pelo digerido da amostra não tratada, IPS-N (Tabela 4, página 64). A combinação de tratamento térmico, HAP e polimerização pode ter influenciado na redução da capacidade de ligação à IgE, uma vez que, após a digestão gástrica, esta foi a única amostra com resposta antigênica reduzida em relação ao IPS não tratado. Além disso, a amostra pré-tratada nas mesmas condições, mas não polimerizada, IPS-TT-180,

manteve sua capacidade de ligação à IgE anti- β -Lg semelhante ao IPS não tratado mesmo após a digestão gástrica (Tabela 4, página 64). Logo, a polimerização associada aos demais tratamentos utilizados contribuíram para a redução da resposta antigênica da β -Lg. Contudo, deve-se considerar que diferentes quantidades de β -Lg não-polimerizada mantêm-se após os tratamentos e, mesmo em pequenas quantidades, a proteína pode ser parcialmente responsável pela formação de complexo antígeno-anticorpo (VILLAS-BOAS et al., 2010).

A redução da resposta antigênica observada após a digestão gástrica é importante, já que a resistência ou limitação da digestão de um alérgeno pode provocar a sensibilização ou sintomas alérgicos (SCHNELL; HERMAN, 2009). A diminuição da antigenicidade após a digestão gástrica é um indicativo de que os tratamentos realizados em associação contribuíram para exposição de epítomos que foram hidrolisados pela pepsina.

Para a α -La, os tratamentos utilizados resultaram em poucas alterações de sua antigenicidade, mesmo após a digestão gástrica (Tabela 4, página 64). Foi observado aumento ($P < 0,05$) de aproximadamente 120% da capacidade de ligação à IgE anti- α -La para a amostra IPS-TT-180 em relação ao IPS-N, indicando que a associação de tratamento térmico e HAP provocaram alterações estruturais na α -La que podem ter aumentado a exposição de epítomos. Bu et al. (2009) relataram aumento da antigenicidade da α -La em solução de IPS após o tratamento térmico de 50 a 90 °C por 20 min.

Após a digestão gástrica não foi observada redução ($P < 0,05$) da capacidade de ligação à IgE anti- α -La em nenhuma das amostras analisadas (Tabela 4, página 64). Ainda que a α -La tenha sido hidrolisada pela pepsina, conforme observado nos perfis eletroforético (Figura 8, página 52) e cromatográfico (Figuras 9B, 9E-G, 9L-N, página 59), os peptídeos liberados durante a digestão podem manter epítomos, que apresentam capacidade de se ligar à IgE, induzindo resposta alérgica (MARTOS et al., 2010).

Embora as amostras pré-tratadas e polimerizadas IPS-TT TG e IPS-TT-180 TG tenham se mostrado suscetíveis à polimerização pela TG, com diminuição significativa ($P < 0,05$) da concentração relativa de α -La (Tabela 3, página 49), a alteração estrutural decorrente dos tratamentos não propiciou a hidrólise de epítomos da α -La pela pepsina, mantendo a antigenicidade destas amostras semelhante à do IPS-N (Tabela 4, página 64).

Para avaliação da antigenicidade dos digeridos gastrointestinais, foi selecionada a amostra IPS-TT-180 TG e a tratada nas mesmas condições, mas não polimerizada, IPS-TT-180, para comparação. As respostas de IgE anti- β -Lg foram $14,03 \pm 1,88$ e $30,25 \pm 2,99$ $\mu\text{g IgE mL}^{-1}$ e de IgE anti- α -La, $8,45 \pm 1,11$ e $21,36 \pm 2,62$ para os digeridos gastrointestinais das amostras IPS-TT-180 TG e IPS-TT-180, respectivamente. Não houve alteração da capacidade de ligação à IgE anti- β -Lg e anti- α -La ($P < 0,05$) entre o digerido gastrointestinal da amostra IPS-TT-180 TG e seu digerido gástrico. Estes resultados indicam que as enzimas pancreáticas não foram capazes de quebrar epítomos, o que diminuiria a resposta antigênica. Entretanto, a resposta antigênica tanto para β -Lg quanto para α -La dessa amostra foi menor ($P < 0,05$) do que da amostra não-polimerizada IPS-TT-180. A polimerização pode ter levado à exposição dos epítomos às enzimas digestivas. Villas-Boas et. al (2012) relataram que os digeridos gastrointestinais de β -Lg isolada tratada termicamente (80 °C/60 min) ou com agente redutor Cys e polimerizada por TG não mostraram reatividade contra IgE anti- β -Lg. Os autores sugeriram que os tratamentos associados à polimerização resultaram na maior suscetibilidade da proteína às enzimas digestivas, diminuindo o potencial antigênico da β -Lg (VILLAS-BOAS et al., 2012). A diferença da resposta antigênica da β -Lg dos digeridos gastrointestinais encontrada entre este e o atual estudo pode advir da utilização de matérias-primas e condições de tratamento térmico diferentes.

Assim como a associação dos tratamentos utilizados - tratamento térmico, HAP e polimerização – resultou em alteração estrutural das proteínas do soro, com diminuição

do teor de grupos SH reativos e livres (Tabela 2, página 42) e aumento da polimerização pela TG (Tabela 3, página 49), esta associação também reduziu a resposta antigênica da β -Lg após a digestão gástrica. Possivelmente as alterações estruturais provocadas por estes tratamentos nesta proteína tornaram-na mais suscetível à hidrólise pela pepsina, podendo, portanto, ter ocorrido a hidrólise de epítomos, diminuindo a capacidade de ligação às IgE específicas. Já a α -La não apresentou diminuição da antigenicidade apesar de ter sido totalmente hidrolisada pelas enzimas gastrointestinais (Figuras 8A-H, página 52). Além disso, esta proteína mostrou-se suscetível à polimerização independente do tratamento utilizado, com redução de sua concentração relativa nas amostras polimerizadas (Tabela 3, página 49). Comparativamente, a α -La apresentou maior alteração após os tratamentos do que a β -Lg, mas estas alterações não resultaram na diminuição de sua antigenicidade.

6. Conclusões

A homogeneização em níveis de pressão de até 180 MPa, com tratamento térmico prévio ou não, alterou a estrutura das proteínas do soro de leite, conforme verificado pela diminuição da turbidez e grupos sulfidril reativos e livres.

A polimerização do IPS pela TG após os pré-tratamentos utilizados - tratamento térmico, homogeneização à alta pressão, associados ou não - resultou na formação de polímeros de alta massa molecular ($MM > 97,4$ kDa). Maior concentração de polímeros foi observada após tratamento térmico e homogeneização a 180 MPa.

A polimerização aumentou a suscetibilidade das proteínas do IPS à hidrólise pelas enzimas digestivas observada após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal em relação às amostras tratadas e não-polimerizadas.

A associação dos tratamentos - térmico, homogeneização a 180 MPa e polimerização - pode ter alterado a estrutura da β -Lg, aumentando a suscetibilidade das regiões de epítomos à pepsina, o que levou ao menor reconhecimento das IgE específicas após a digestão gástrica.

A associação de tratamento térmico e homogeneização a 180 MPa aumentou a capacidade de ligação da α -La à IgE específica. A combinação dos tratamentos pode ter aumentado a exposição dos epítomos da α -La, que foram reconhecidos pelas IgE anti- α -La.

7. Considerações Finais

As condições utilizadas no presente trabalho não resultaram em redução adequada da antigenicidade das proteínas do soro de leite para serem consideradas uma possibilidade de aplicação em produtos hipoalergênicos.

Entretanto, outras técnicas associadas à homogeneização devem ser investigadas como hidrólise enzimática. Esta combinação de tratamentos pode ser um meio de alcançar a redução do potencial antigênico das proteínas do soro de leite.

8. Referências

- ADAPA, S.; SCHMIDT, K.A.; TOLEDO, R. Functional properties of skim milk processed with continuous high pressure throttling. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p.1941–1948, 1997.
- ANDO, H. et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.
- ANURADHA, S.N.; PRAKASH, V. Altering functional attributes of proteins through cross linking by transglutaminase – A case study with whey and seed proteins. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1259–1265, 2009.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg: AOAC, 2006.
- ASSELIN, J.; HÉBERT, J.; AMIOT, J. Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 1037-1039, 1989.
- ASTWOOD, J.D.; LEACH, J.N.; FUCHS, R.L. Stability of food allergens to digestion in vitro. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 1269-1273, 1996.
- BALNY, C.; MOZHAEV, V.V.; LANGE, R. Hydrostatic pressure and proteins: basic concepts and new data. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 116, n. 4, p. 299–304, 1997.
- BASCH, J.J. et al. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis and comparison with Harland-Ashworth procedure. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p.23-31, 1985.
- BERAN, M. et al. Influence of high-hydrostatic pressure on tryptic and chymotryptic hydrolysis of milk proteins. **High Pressure Research**, v. 29, n. 1, p. 23-27, 2009.
- BERETTA, B. et al. Antigenic determinants of bovine serum albumin. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 126, n. 3, p. 188-195, 2001.
- BESLER, M.; STEINHART, H.; PASCHKE, A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. **Journal of Chromatography B.**, v. 756, n. 1, p. 207-228, 2001.
- BESLER, M.; EIGENMANN, P.; SCHWARTZ, R.H. Allergens of animal origin: stability and allergenicity of processed foods. **Internet Symposium on Food Allergens**, v. 2, n. 4, p.171-184, 2000.
- BEVERIDGE, T.; JONES, L.; TUNG, M.A. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean and albumen protein gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 307-313, 1984.

- BEVERIDGE, T.; TOMA, S.J.; NAKAI, S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 1, p. 49-51, 1974.
- 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.
- BOUAOUINA, H. et al. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 4, p. 275-284, 2006.
- BREW, K. α -Lactalbumin. In: FOX, P.F.; McSWEENEY. **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Springer, 3 ed. v. 1, p. 387-419, 2003.
- BROWNLOW, S. et al. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v. 5, n. 4, p. 481-495, 1997.
- BU, G. et al. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. **Food and Agricultural Immunology**, v. 20, n. 3, p. 195-206, 2009.
- CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 351-357, 2003.
- CHICÓN, R. et al. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 593-599, 2009.
- CHICÓN, R. et al. Changes in chymotrypsin hydrolysis of β -Lactoglobulin A induced by high hydrostatic pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2333-2341, 2006.
- CHOBERT, J.M. et al. Impact of esterification on the folding and the susceptibility to peptic proteolysis of β -lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1248, n. 2, p. 170-176, 1995.
- CHRISTENSEN, B.M. Localization of potential transglutaminase crosslinking sites in bovine caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1943-1947, 1996.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.
- DATTA, N. et al. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 4, p. 393-399, 2005.
- DE JONG, G.A.H.; KOPPELMAN, S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2798-2806, 2002.

- DE WIT, J.N. Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 1, p. 27-34, 2009.
- DESRUMAUX, A.; MARCAND, J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 263-269, 2002.
- DUPONT, D. et al. Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 6, p. 767–780, 2010.
- EISSA, A.S. et al. Enzymatic cross-linking of β - lactoglobulin: Conformational properties using FTIR Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 1707-1713, 2006.
- EL-AGAMY, E.I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 64-72, 2007.
- 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.
- FIOCCHI, A. et al. World allergy organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, n. 21, p. 1-125, 2010.
- FOEGEDING, E.A.; DAVIS, J.P. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1853-1864, 2011.
- FOLK, J.E.; COLE, P.W. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: Identification of a functional cysteine essential for activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 23, p. 5518-5525, 1966.
- FOX, P.F.; Mc SWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**, London, 1998.
- FOX, P.F. Milk proteins: general and historical aspects. In: FOX, P.F.; McSWEENEY. **Advanced dairy chemistry**. New York: Springer, 3 ed., v.1, p. 01-48, 2003.
- FRANÇA, C.J. **Efeito da polimerização com a enzima transglutaminase na redução do potencial alergênico do isolado proteico de soro do leite**. 2012, 73 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- FU, T.J.; ABBOTT, U.R.; HATZOS, C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluids – a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 7154-7160, 2002.
- GALANI, D.; APENTEN, R.K.O. Heat-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 34, n. 5, p. 467–476, 1999.

- GARDNER, M.L.G. Gastrointestinal absorption of intact proteins. **Annual Review of Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 329-350, 1988.
- GAUCHERON, F. et al. Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 439-441, 1997.
- GELAMO, E.L. et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1594, n. 1, p. 84-99, 2002.
- GIOSAFATTO, C.V.L. et al. Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 261-267, 2012.
- GOETZ, J.; KOEHLER, P. Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR. **LWT – Food Science Technology**, v. 38, n. 5, p. 501-512, 2005.
- GRÁCIA-JULIÁ, A. et al. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: A comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 6, p. 1014–1032, 2008.
- GUERZONI, M.E. et al. Effect of high pressure homogenization on microbial and physico-chemical characteristics of goat cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 851-862, 1999.
- HABEEB, A.F.S.A.; BORELLA, L. Effect of conformations of bovine serum albumin on reaction with its antibody. **Journal of Immunology**, v. 97, n. 6, p. 951-958, 1966.
- HAMES, B.D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 352p., 1998.
- HAYES, M.G.; KELLY, A.L. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 3, p. 297–305, 2003.
- HAYES, M.G.; FOX, P.F.; KELLY, A.L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.
- HENDRICKZ, M. et al. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 197-203, 1998.
- HERMANSSON, A.M. Agregation and denaturation involved in gel formation. In: POUREL, A. **Functionality and protein structure**, Washington: American Chemical Society, p. 82-103, 1979.
- HOCHWALLNER, H. et al. Visualization of clustered IgE epitopes on α -lactalbumin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 6, p. 1279-1285, 2010.

- HOST, A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. **Annals of allergy, asthma & immunology**, v. 89, n. 6, p. 33-37, 2002.
- HSIA, J. C. et al. Bovine serum albumin: characterization of a fatty acid binding site on the n-terminal peptic fragment using a new spin-label. **Biochemistry**, v. 23, n. 25, p. 5930-5932, 1984.
- HUANG, B.X.; KIM, H.Y.; DASS, C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 1237–1247, 2004.
- HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Effects of high pressure on constituents and properties of milk. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 7, p. 561-572, 2002.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P.F.; KELLY, A.L. High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 1, p. 97–106, 2004.
- IKURA, K. et al. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2587–2592, 1981.
- IZQUIERDO, F.J. et al. Effects of combined microwave and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 9, p. 918–922, 2008.
- JAROS, D. et al. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, n. 2, p. 113-155, 2006.
- JARVINEN, K. et al. IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 126, n. 2, p. 111-118, 2001.
- KADDOURI, H. et al. Microwave treatment modify antigenicity properties of bovine milk proteins. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 13, p. 1267-1270, 2006.
- KANAJI, T. et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. **The Journal of Biological Chemistry** v. 268, n. 16, p. 11565–11572, 1993.
- KANANEN, A. et al. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 10, p. 691-697, 2000.
- KELLA, N.K.D.; KINSELLA, J.E. Enhanced thermodynamic stability of β -lactoglobulin at low pH: A possible mechanism. **Biochemical Journal**, v. 255, n. 1, p. 113-118, 1988.
- KIM, S.B. et al. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4043-4050, 2007.

- KINGHORN, N.M. et al. Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 700, n. 1, p. 111-123, 1995.
- KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. In: KINSELLA, J.E. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego: Academic Press Inc., v. 33, p. 343-437, 1989.
- KITABATAKE, N.; KINEKAWA, Y. Digestibility of bovine milk whey protein and β -lactoglobulin in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4917-4923, 1998.
- KLEBER, N. et al. The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 2, p. 105-110, 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LASKHMAN, P.L.N. et al. Reducing the antigenicity of milk whey protein using acid proteinases from *Monascus pilosus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 806-810, 2011.
- LAUBER, S. et al. Oligomerization of β -lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 3, p. 246-247, 2001a.
- LAUBER, S. et al. Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 4, p. 273-276, 2001b.
- LI-CHAN, E.C.Y. Properties of proteins in food systems: An introduction. In: YADA, R.Y. **Proteins in Food Processing**, Boca Raton: CRC Press, 2004.
- LI, Z.; LUO, Y.; FENG, L. Effects of Maillard reaction conditions on the antigenicity of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein conjugated with maltose. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 1, p. 387-394, 2011.
- LOPEZ-FANDIÑO, R.; CARRASCOSA, A.V.; OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 929-936, 1996.
- 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, n. 3, p. 372-381, 2009.
- MARTOS, G. et al. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5640-5648, 2010.

- McCLEMENTS, D.J.; KEOGH, M.K. Physical properties of cold-setting gels formed from heat-denatured whey protein isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, n. 1, p. 7-14, 1995.
- MIERZEJEWSKA, D.; KUBICKA, E. Effect of temperature on immunoreactive properties of the cow milk whey protein β -lactoglobulin. **Milchwissenschaft**, v. 61, n. 1, p. 69-72, 2006.
- MONACI, L. et al. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 2, p. 149–179, 2006.
- MORENO, F.J. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 1, p. 50-60, 2007.
- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 5, p. 204-210, 1998.
- MOZHAEV, V.V. et al. High pressure effects on protein structure and function. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 24, n. 1, p. 81-91, 1996.
- NACER, S.A. et al. Interactions between β -Lactoglobulin and pectins during in vitro gastric hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 355-360, 2004.
- NATALE, M. et al. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, n. 5, p. 363-369, 2004.
- NEEDS, E.C. et al. High pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 1, p. 31-42, 2000.
- 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**, v. 344, n. 1, p. 372–381, 2010.
- OLIVIER, C.E. et al. Allergenicity of Bos d 5 in children with cow's milk allergy is reduced by transglutaminase polymerization. **Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology**, v. 25, n. 1, p. 30-33, 2012a.
- OLIVIER, C.E. et al. In search of a tolerance-induction strategy for cow's milk allergies: significant reduction of beta-lactoglobulin allergenicity via transglutaminase/cysteine polymerization. **CLINICS**, v. 67, n. 10, p. 1171-1179, 2012b.
- PALAZOLO, G. et al. Heat treatment of β -lactoglobulin: structural changes studies by partitioning and fluorescence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 3817-3822, 2000.
- PAQUIN, P. Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins and polysaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3, p. 329-335, 1999.

PARTSCHEFELD, C. et al. Modification of β -lactoglobulin by microbial transglutaminase under high hydrostatic pressure: Localization of reactive glutamine residues. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 4, p. 462–468, 2007.

PEÑAS, E. et al. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 8, p. 831–839, 2006.

PHOTCHANACHAI, S.; KITABATAKE, N. Heating of β -lactoglobulin A solution in a closed system at high temperatures. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 647-652, 2001.

PICARIELLO, G. et al. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 3, p. 295–308, 2010.

POLIS, B.D.; SCHMUCKLER, H.; CUSTER, J. Isolation of a crystalline albumin from milk. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 349-354, 1950.

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

PUERTA, A.; DIEZ-MASA, J.C.; FRUTOS, M. Immunochromatographic determination of β -lactoglobulin and its antigenic peptides in hypoallergenic formulas. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 406-414, 2006.

REED, R.G. et al. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding. **Biochemistry**, v. 14, n. 21, p. 4578-4583, 1975.

RESTANI, P. et al. Effects of structure modifications on IgE binding properties of serum albumins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 117, n. 2, p. 113-119, 1998.

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

RESTANI, P. et al. Evaluation by SDS-PAGE and Immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 25, n. 7, p. 641-658, 1995.

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

SACKESEN, C. et al. Cow's milk allergy as a global challenge. **Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology**, v. 11, n. 3, p. 243–248, 2011.

SANDRA, S.; DALGLEISH, D.G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 11, p. 1095–1104, 2005.

- SATHE, S.K.; SHARMA, G.M. Effects of food processing on food allergens. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 53, n. 8, p. 970 – 978, 2009.
- 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.
- SCHÄGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins on the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.
- SCHNELL, S.; HERMAN, R.A. Should digestion assays be used to estimate persistence of potential allergens in tests for safety of novel food proteins? **Clinical and Molecular Allergy**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2009.
- SÉLO, I. et al. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 29, n. 12, p. 1696-1704, 1999.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do soro de leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v 8, n. 1, p. 43-56, 2005.
- SHARMA, R.; LORENZEN, P.C.; QVIST, K.B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -lutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 10, p. 785–793, 2001.
- SILVA, J.; WEBER, G. Pressure stability of proteins. **Annual Review Physical Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 89-113, 1993.
- SMITHERS, G.W. et al. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.
- SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins – from ‘gutter-to-gold. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.
- TAKAGI, K. et al. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 969–973, 2003.
- TANABE, S. et al. Some human B and T cell epitopes of bovine serum albumin, the major beef allergen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, n. 5, p. 1348–1353, 2002.

- 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, n. 2, p. 87-98, 2004.
- TOMÉ, D.; DEBABBI, H. Physiological effects of milk protein components. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5, p. 383-392, 1998.
- TRESPALACIOS, P.; PLA, R. Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 264–272, 2007.
- VAN BERESTEIJN, E.C.H. et al. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. **Journal of Food Protection**. v. 57, n. 7, p. 619- 625, 1994.
- VAN BERESTEIJN, E.C.H.; MEIJER, R.J.G.M.; SCHMIDT, D.G. Residual antigenicity of hypoallergenic infant formulas and the occurrence of milk-specific IgE antibodies in patients with clinical allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, n. 3, p. 365-374, 1995.
- VAN DER PLANCKEN, I.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M.E. Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 1, p. 11-20, 2005.
- 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, n. 3, p. 264-269, 2011.
- VAN HOEYVELD, E.M. et al. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 28, n. 9, p. 1131- 1137, 1998.
- VILLAS-BOAS, M.B. et al. The effect of transglutaminase-induced polymerization in the presence of cysteine on β -lactoglobulin antigenicity. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 6, p. 386–392, 2010.
- VILLAS-BOAS, M.B. et al. 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. Structure and function of milk allergens. **Allergy**, v. 56, n. 67, p. 35-38, 2001.
- WAL, J.M. Bovine milk allergenicity. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 93, n. 5, p. 2-11, 2004.
- 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.

ZAMORA, A. et al. Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 13–23, 2007.

ZHONG, J. et al. Effect of dynamic high-pressure microfluidization at different temperatures on the antigenic response of bovine β -lactoglobulin. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 1, p. 95–102, 2011.

ZHONG, J.Z. et al. Aggregation and conformational changes of bovine β -lactoglobulin subjected to dynamic high-pressure microfluidization in relation to antigenicity. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4237-4245, 2012.

Anexo



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

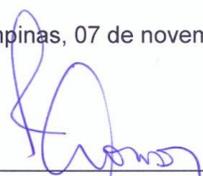
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeito da homogeneização à alta pressão e da polimerização com a enzima transglutaminase na redução do potencial alergênico do isolado protéico do soro do leite bovino" (protocolo nº 2481-1 (A)), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Flavia Maria Netto / Janaína Madruga Morais, 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 07 de novembro de 2011.

Campinas, 07 de novembro de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva