



TÁSSIA BATISTA PESSATO

**HIDROLISADOS DE ISOLADO PROTEICO DO SORO DE LEITE
OBTIDOS COM ALCALASE LIVRE E IMOBILIZADA:
CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE PROTEÍNAS
ALERGÊNICAS**

**Campinas
2014**



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

TÁSSIA BATISTA PESSATO

**HIDROLISADOS DE ISOLADO PROTEICO DO SORO DE LEITE
OBTIDOS COM ALCALASE LIVRE E IMOBILIZADA:
CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE PROTEÍNAS
ALERGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição, na área de concentração Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

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

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA TÁSSIA
BATISTA PESSATO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
FLAVIA MARIA NETTO**

**Campinas
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

P438c Pessato, Tássia Batista, 1989-
Hidrolisados de isolado proteico do soro de leite obtidos com Alcalase livre e imobilizada: caracterização e detecção de proteínas alergênicas / Tássia Batista Pessato. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Alergia. 2. Hidrólise enzimática. 3. Enzimas imobilizadas. 4. Agregação. 5. Alérgenos alimentares. I. Netto, Flavia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Hydrolyzed whey protein isolate by free and immobilized Alcalase: characterization and allergic proteins detection

Palavras-chave em inglês:

Allergy

Enzymatic hydrolysis

Immobilized enzymes

Aggregation

Food allergen

Área de concentração: Nutrição Experimental e de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Mariana Battaglin Villas Boas Álvaro

Olga Luisa Tavano

Data de defesa: 21-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Profa. Dra. Flavia Maria Netto
Orientadora

Profa. Dra. Mariana Battaglin Villas Boas Álvaro
Membro Titular
Senac

Profa. Dra. Olga Luisa Tavano
Membro Titular
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro Suplente
Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Membro Suplente
Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp

RESUMO

O leite bovino é um dos alimentos mais alergênicos na primeira infância, sendo as caseínas e as duas principais proteínas do soro - α -lactoalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg) - os principais alérgenos. A hidrólise enzimática reduz a antigenicidade de proteínas e pode ser realizada com enzima livre ou imobilizada. A enzima imobilizada não requer inativação ao final da hidrólise, sendo retirada por filtração enquanto que a enzima livre precisa ser inativada, geralmente por aquecimento, para interromper a reação. Diferenças na atividade catalítica e de inativação podem acarretar em características diferentes dos hidrolisados formados. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da hidrólise do isolado proteico de soro de leite bovino (IPS) com Alcalase livre (AL) e imobilizada em glicil-agarose (Alm) nas características dos hidrolisados e na detecção de α -La e β -Lg por teste ELISA. As melhores condições de hidrólise do IPS com AL ou Alm foram estabelecidas por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2². As variáveis independentes foram pH (7,0 a 9,0) e temperatura (45 a 65°C), a variável dependente foi grau de hidrólise (GH), determinado pelo método de pH-stat. Os hidrolisados foram caracterizados quanto ao perfil de hidrofiliidade por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) e, as análises posteriores, foram realizadas em hidrolisados tanto com AL (HAL) quanto com Alm (HALm) obtidos em três condições de hidrólise. O perfil de massa molecular (MM) foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM) e eletroforese (SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina). A agregação dos hidrolisados foi estimada por turbidez e hidrofobicidade superficial (S_0) e a detecção dos alérgenos foi realizada pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) utilizando kits comerciais. Sob as mesmas condições de hidrólise, os valores de GH obtidos nos ensaios do DCCR com a Alm (9,5 a 22,2 %) foram, menores do que os obtidos com a AL (18 a 24 %), possivelmente em função de impedimentos estéricos resultantes da imobilização. As melhores condições de hidrólise do IPS com Alm, dentro das faixas de pH e temperatura estudadas, foram obtidas em temperaturas acima de 60°C. O DCCR com AL não resultou em modelo devido à pequena variação dos resultados entre os ensaios. Os perfis cromatográficos (CLAE-FR) dos HALm apresentaram mais picos na região de baixa hidrofiliidade do que os HAL. Os HALm apresentaram peptídeos de MM maiores que os HAL, o que está relacionado aos menores GH produzidos com a Alm. Os HAL apresentaram menores valores de S_0 que os HALm, sugerindo a ocultação de sítios hidrofóbicos no interior dos agregados. As análises de turbidez em diferentes solventes mostraram que interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto são as principais forças envolvidas na formação dos agregados. A hidrólise com AL e Alm diminuiu significativamente a detecção das proteínas alergênicas. A detecção dessas proteínas foi maior nos HALm devido, possivelmente, aos menores GH desses hidrolisados. Porém, os resultados sugerem que as características dos hidrolisados resultantes das condições de hidrólise e a formação de agregados estabilizados por diferentes interações também tiveram efeito na detecção dos alérgenos.

Palavras-chave: alergia alimentar, hidrólise enzimática, imobilização de enzimas, agregação, detecção de alérgenos, ELISA.

ABSTRACT

Cow's milk is one of the most allergenic foods in infancy, with the two major caseins and whey proteins - α -lactalbumin (α -La) and β -lactoglobulin (β -Lg) - the main allergens. Enzymatic hydrolysis considerably reduces the antigenicity of proteins, and can be performed with free or immobilized enzyme. The immobilized enzyme does not require inactivation at the end of hydrolysis and can be removed by filtration, while the free enzyme must be inactivated, usually by heating, to stop the reaction. Differences in catalytic activity and inactivation may result in hydrolysates with distinct characteristics. The objective of this study was to evaluate the effects of hydrolysis of whey protein isolate (WPI) with free Alcalase (AL) and Alcalase immobilized on glyoxyl agarose (Alm) on the characteristics of hydrolysates and detection of α -La e β -Lg by ELISA test. The best conditions for the hydrolysis of WPI using AL or Alm were established by 2² central composite rotational design (CCRD). The independent variables were pH (7.0 and 9.0) and temperature (45 to 65 °C), whereas the dependent variable was the degree of hydrolysis (DH) determined by the pH-stat method. All hydrolysates were characterized for the hydrophilicity profile by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and the subsequent analyses were performed in both hydrolysates by AL (HAL) and Alm (HALm) from three conditions of hydrolysis. The molecular weight profile (MW) was assessed by size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) and electrophoresis (SDS-PAGE and SDS-PAGE/Tricine). The aggregation of hydrolysates was estimated by turbidity and surface hydrophobicity (S_0) and the allergens α -La and β -Lg in the hydrolysates were detected by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method using commercial kits. Under the same hydrolysis conditions, the DH values obtained with the Alm as defined by CCRD (9,5 to 22,2 %) were lower than the values found for AL (18 to 24 %), possibly due to the steric hindrance resulting from immobilization. The best conditions for hydrolysis of WPI by Alm within the pH and temperature ranges of this study were found at temperatures above 60 °C. The CCRD with the AL did not provide a model due to the little variation between trials. The chromatographic profiles (RP-HPLC) of HALm exhibited more peaks in the hydrophilic low-complexity region than HAL. HALm showed peptides with higher MW than HAL, which is related to the lower DH produced with Alm. The HAL had lower S_0 values than HALm, suggesting the hiding of hydrophobic sites in the interior part of the aggregates. The turbidity analyses showed that hydrophobic interactions, hydrogen bonds, and disulfide bonds were the main forces involved in the formation of aggregates. The hydrolysis with AL and Alm significantly decreased the detection of the allergenic proteins, which was higher in HALm probably due to the lower DH of these hydrolysates. However, the results suggested that the characteristics of the hydrolysates resulting from the conditions of hydrolysis, and the formation of aggregates stabilized by different interactions also had an effect on the detection of allergens.

Keywords: food allergy, enzymatic hydrolysis, enzyme immobilization, aggregation, allergen detection, ELISA.

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Objetivos	4
2.1	Geral	4
2.2	Específicos.....	4
3	Revisão Bibliográfica	5
3.1	Isolado proteico do soro do leite (IPS)	5
3.2	Alergia às proteínas do leite de vaca e principais antígenos.....	8
3.3	Principais técnicas de detecção de alérgenos	11
3.4	Modificação da alergenicidade do leite por diferentes processos	14
4	Material e Métodos.....	21
4.1	Material	21
4.2	Teor de proteína.....	23
4.3	Atividade enzimática	23
4.4	Imobilização da Alcalase.....	23
4.5	Determinação de estabilidade enzimática.....	25
4.6	Testes de reuso da Alcalase imobilizada	26
4.7	Obtenção dos hidrolisados do isolado proteico do soro (IPS).....	26
4.8	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)	28
4.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
4.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS/Tricina (SDS-PAGE/Tricina).....	29
4.11	Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM).....	30
4.12	Caracterização físico-química	30
4.12.1	Potencial zeta	30
4.12.2	Hidrofobicidade superficial.....	30
4.12.3	Turbidez.....	31
4.13	Detecção de proteínas alergênicas por ELISA.....	32
4.14	Análise estatística	32
5	Resultados e Discussão.....	34
5.1	Caracterização do IPS	34
5.2	Imobilização da Alcalase.....	35
5.3	Obtenção dos hidrolisados do isolado proteico do soro (IPS).....	37
5.4	Caracterização dos hidrolisados	45
5.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)....	46

5.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina).....	50
5.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM).....	52
5.4.4 Caracterização físico-química.....	54
5.5 Detecção de proteínas alergênicas por ELISA.....	58
6 Conclusões	62
7 Considerações Finais.....	63
8 Referências Bibliográficas.....	64

“Sempre que houver alternativas tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências.”

Osho

Dedico

À minha mãe e minha irmã, Silvania e Tatiane,
que são meus alicerces desde sempre.
Obrigada por fazerem parte de quem eu sou!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Algo ou Alguém maior que trilhou meu caminho meticulosamente até aqui.

À profa. Dra. Flavia, por ter me aceito como orientada e ter sido tão presente e tão paciente em todos os momentos que precisei. Por ser um símbolo de profissionalismo e dedicação no qual eu me espelho.

À profa. Dra. Olga, não somente por ter me ensinado a amar o que faço, mas também a ser uma pessoa melhor, mais humana, e sempre começar o dia com um sorriso e um bom humor contagiantes.

Ao Prof. Dr. Ricardo, por me receber tão bem no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp. Agradeço também por todas as vezes que ele parou o que estava fazendo para me ajudar com minhas dúvidas.

À Mariana, que não hesitou em me ajudar em nenhuma das vezes que a procurei, nem mesmo quando o Léo estava prestes a chegar.

À profa. Dra. Maria Isabel pela generosidade em me atender todas as vezes que precisei, mesmo com a agenda tão cheia.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Hélia Harumi Sato, Dr. Ricardo de Lima Zoller, Dra. Mariana Battaglin Villas Boas Álvaro e Dra. Olga Luisa Tavano, pela disponibilidade e tamanha contribuição para o trabalho desde o início.

À minha mãe e minha irmã, pois elas são as pessoas pelas quais eu tento me tornar cada dia melhor no que sou e no que faço. São as pessoas que acreditam em mim mesmo quando eu mesma descredito. Que enfrentam o mundo se for preciso, só para me ver feliz.

Ao meu pai e ao meu avô que, por mais que não entendam nada sobre o que eu faço, sei que torcem muito por mim.

Aos meus amigos, Lucas, Vilma, Ayza, Lauro Lúcio, Maria Júlia, Geisiele e Daniela, por me escutarem, me aconselharem e me acalantarem todas as vezes que eu precisei.

À Érica por ter sido minha conselheira particular durante esses dois anos. Por ter enfrentado seus próprios medos só para não me deixar sozinha. Por ter me provado que eu era capaz todas as vezes que eu pensei que não fosse. Sem ela, com certeza, eu não teria conseguido.

À Aline e à Taís que são a família sorridente que eu encontro em casa depois de um dia cansativo de trabalho. Que sentam comigo durante o jantar para ouvir como foi o meu dia, que cuidam de mim quando fico doente, que sabem quando estou triste, alegre ou irritada só pelo meu semblante. Agradeço em especial à Aline, com quem eu construí uma amizade solidamente baseada em momentos tristes, alegres, desagradáveis, divertidos e memoráveis. Ela não é apenas uma companheira de apartamento, ela é um personagem indispensável na história que construí em Campinas.

Às minhas amigas queridas, Alessandra, Meíssa, Laura e Mariana que se tornaram minha família aqui. Que me fizeram sentir em casa mesmo tão distante dela.

Às amigas do laboratório de Bioquímica Nutricional, Elisa, Eliana, Bete, Fernanda, Natália, Eloísa, Janaína e à Juliana pelas tantas vezes que me ajudaram, seja em questões técnico-científicas, em dividir experiências ou em simplesmente ouvir um desabafo. E pelos momentos de descontração e de risadas que tanto me ajudaram a tornar os dias de trabalho ainda mais prazerosos. Agradeço em especial à Elisa por ter, em um dia difícil, agido de uma forma que foi mais importante para mim do que ela possa ter percebido. E à Eliana, a quem chamamos carinhosamente de Li, por nos tratar como filhas e a quem eu verdadeiramente considero uma mãe.

À Tania F., por ter me ajudado a identificar e superar os meus medos, mesmo os mais persistentes.

A todos os integrantes do DEPAN, por tornarem minha rotina tão deliciosa. É sempre muito bom estar aqui! Obrigada especialmente ao Chico e à Lara pela ajuda com os equipamentos.

Àqueles que não citei diretamente, mas que estão intimamente ligados à essa conquista desde de quando eu nem imaginava que era esse o meu sonho. Que me ajudaram de forma que nem consigo descrever aqui. Obrigada por acreditarem em mim e em minha família! Espero continuar fazendo jus a tamanho carinho e confiança.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo para desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio à pesquisa vinculado ao processo nº 2013/08552-2 para desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fluxograma geral do experimento..... 22
- Figura 2:** Ativação do suporte com grupos glioxil e química do processo de imobilização..... 25
- 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..... 34
- Figura 4:** (A) Estabilidade térmica da Alcalase livre e imobilizada avaliada pela incubação em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 e 65°C. (B) Testes de reuso da Alcalase imobilizada em glioxil-agarose 36
- Figura 5:** Curvas de hidrólise obtidas com Alcalase livre (A) e imobilizada (B) nas condições de pH e temperatura descritas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR): (1) 7,3 e 48°C; (2) 8,7 e 48°C; (3) 7,3 e 62°C; (4) 8,7 e 62°C; (5) 7,0 e 55°C; (6) 9,0 e 55°C; (7) 8,0 e 45°C; (8) 8,0 e 65°C; (9, 10 e 11) 8,0 e 55°C. Ensaio: 1 (—◆—) ; 2 (—■—); 3 (—▲—); 4 (—×—); 5 (—*—); 6 (—●—); 7 (—+—); 8 (—); 9 (—); 10 (—◆—); 11 (—■—). 38
- Figura 6:** Impedimentos estéricos sofridos pelo substrato durante hidrólise catalisada por enzima imobilizada..... 40
- Figura 7:** Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta GH do isolado proteico de soro de leite obtida com Alcalase imobilizada em função da temperatura e do pH. 44
- Figura 8:** Cromatogramas de CLAE-FR com detecção UV a 214 nm de hidrolisados obtidos com Alcalase livre nas condições de pH e temperatura descritas no DCCR: (1) 7,3 e 48°C; (2) 8,7 e 48°C; (3) 7,3 e 62°C; (4) 8,7 e 62°C; (5) 7,0 e 55°C; (6) 9,0 e 55°C; (7) 8,0 e 45°C; (8) 8,0 e 65°C; (9, 10 e 11) 8,0 e 55°C. 47
- Figura 9:** Cromatogramas de CLAE-FR com detecção UV a 214 nm de hidrolisados obtidos no DCCR com Alcalase imobilizada nas condições de pH e temperatura : (1) 7,3 e 48°C; (2) 8,7 e 48°C; (3) 7,3 e 62°C; (4) 8,7 e 62°C; (5) 7,0 e 55°C; (6) 9,0 e 55°C; (7) 8,0 e 45°C; (8) 8,0 e 65°C; (9, 10 e 11) 8,0 e 55°C. ... 49
- Figura 10:** Perfis eletroforéticos de IPS íntegro e hidrolisados com Alcalase livre e imobilizada obtidos nos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. (A) SDS-PAGE (gel de

poliacrilamida – 12 %): (1) Padrão de massa molecular (14,4 a 97,4 kDa); (2) IPS não hidrolisado; (3) HAL2; (4) HAL5; (5) HAL8; (6) HAlm2; (7) HAlm5; (8) HAlm8. (B) SDS-PAGE/Tricina em meio redutor: (1) Padrão de massa molecular (3,5 a 26 kDa); (2) IPS não hidrolisado; (3) HAL2; (4) HAL5; (5) HAL8; (6) HAlm2; (7) HAlm5; (8) HAlm8. 51

Figura 11: Cromatogramas de CLAE-EM dos hidrolisados com (A) Alcalase livre e (B) imobilizada obtidos nas condições dos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. (A1) HAL2. (A2) HAL5. (A3) HAL8. (B1) HAlm2. (B2) HAlm5. (B3) HAlm8. Condições de análise: coluna Protein-Pak TM 60Å (7,8 mm x 300 mm), fluxo de 0,5 mL/min, fase móvel: tampão fosfato de sódio 50 mmol, pH 6,8. 53

Figura 12: Turbidez (Abs 500 nm) de soluções 1 % (m/v) dos hidrolisados de isolado proteico do soro de leite com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HAlm), obtidos nas condições de hidrólise dos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. Em função do pH: (A) pH 4,0 e (B) pH 7,0, e diferentes concentrações de sal (NaCl). (■) 0 M NaCl; (▬) 0,5 M NaCl; (▨) 1M NaCl.....56

Figura 13: Turbidez (Abs 500 nm) de soluções 1 % (m/v) dos hidrolisados de isolado proteico do soro de leite com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HAlm), obtidos nas condições de hidrólise dos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. Em função do pH: (A) pH 4,0 e (B) pH 7,0, e da presença de agentes desnaturantes/redutores. (■) Controle: tampão; (▬) Ureia; (▨) SDS; (▩) SDS + β-ME.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de pH e temperatura utilizados no DCCR para hidrólise de IPS com Alcalase livre e imobilizada.....	27
Tabela 2: Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para estudo dos efeitos da hidrólise com Alcalase livre e imobilizada na resposta grau de hidrólise (GH %) do isolado proteico do soro de leite.....	39
Tabela 3: Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com Alcalase livre.....	41
Tabela 4: Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com Alcalase imobilizada.	41
Tabela 5: Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com Alcalase imobilizada após reparametrização.....	41
Tabela 6: ANOVA para grau de hidrólise do IPS com Alcalase livre.	42
Tabela 7: ANOVA para grau de hidrólise do IPS com Alcalase imobilizada.	43
Tabela 8: Hidrofobicidade superficial (S_0) e ponto isoelétrico (pI) dos hidrolisados com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HALm) obtidos nos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR.....	54
Tabela 9: Detecção de proteínas alergênicas α -La e β -Lg ($\mu\text{g}/\text{mg}$) em isolado proteico do soro de leite bovino íntegro (IPS) e hidrolisados com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HALm) nos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

α-La	α -lactoalbumina
ANS	1-anilino-naphthalene8-sulfonate
Alm	Alcalase imobilizada
AL	Alcalase livre
ANOVA	Análise de variância
β-Lg	β -lactoglobulina
β-ME	β -mercaptoetanol
BSA	Soro albumina bovina
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão Molecular
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
DCCR	Delineamento composto central rotacional
EAST	<i>Enzyme allergosorbenttest</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GH	Grau de hidrólise
GMP	Glicomacropéptido
HAL1	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 1 do DCCR
HAL2	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 2 do DCCR
HAL3	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 3 do DCCR
HAL4	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 4 do DCCR
HAL5	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 5 do DCCR
HAL6	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 6 do DCCR
HAL7	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 7 do DCCR
HAL8	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 8 do DCCR
HAL9	Hidrolisado obtido com Alcalase livre na condição 9 do DCCR
HAIm1	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 1 do DCCR
HAIm2	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 2 do DCCR
HAIm3	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 3 do DCCR
HAIm4	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 4 do DCCR
HAIm5	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 5 do DCCR
HAIm6	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 6 do DCCR

HAlm7	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 7 do DCCR
HAlm8	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 8 do DCCR
HAlm9	Hidrolisado obtido com Alcalase imobilizada na condição 9 do DCCR
Ig	Imunoglobulinas
IgE	Imunoglobulina do isotipo E
IgG	Imunoglobulina do isotipo G
IPS	Isolado proteico do soro de leite
LF	Lactoferrina
MM	Massa molecular
pl	Ponto isoelétrico
RAST	<i>Radioallergosorbent test</i>
RFI	Intensidade de fluorescência relativa
RIE	<i>Rocket immunoelectrophoresis</i>
S₀	Hidrofobicidade superficial
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS-PAGE/Tricina	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS/tricina
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TMB	Tetrametilbenzidina
TR	Tempo de retenção

1 Introdução

A alergia alimentar é a reação adversa mediada imunologicamente, que afeta 8 % das crianças abaixo de 3 anos e 1-2 % dos adultos (HELM e BURKS, 200). Alérgenos alimentares são, geralmente, proteínas capazes de provocar sintomas em indivíduos pré-dispostos (KUMAR, VERMA, DAS, *et al.*, 2012). As reações alérgicas induzidas por alimentos são responsáveis por uma série de sintomas envolvendo pele (urticária, edema), trato respiratório (rinite, asma), trato gastrointestinal (vômito, diarreia), e sistema cardiovascular (choque anafilático) (MORISAWA, KITAMURA, UJIHARA, *et al.*, 2009; KNIPPING, VAN ESCH, VAN IEPEREN-VAN DIJK, *et al.*, 2012). As alergias alimentares podem ser mediadas por anticorpos IgE ou por células (LACORN e IMMERS, 2010). Distúrbios com sintomas de início agudo após a ingestão do alimento são mediados por IgE, os quais se ligam à superfície de mastócitos e basófilos, resultando em um estado denominado sensibilização. Após re-exposição ao alimento, os alérgenos podem se ligar às moléculas de IgE específicas associadas às células e desencadear a liberação de mediadores inflamatórios, tais como a histamina, que são os causadores dos sintomas (SICHERER, 2002; HUANG e KIM, 2012).

Um dos alimentos mais alergênicos, em especial na primeira infância, é o leite de vaca. A alergia ao leite de vaca é, geralmente, mediada por anticorpos IgE, os quais são produzidos, principalmente, contra as três principais proteínas do leite: caseínas, β -lactoglobulina (β -Lg) e α -lactoalbumina (α -La). As caseínas representam cerca de 80 % das proteínas totais e são os principais alérgenos do leite. A β -Lg e a α -La representam 70-80 % das proteínas totais do soro (SGARBIERI, 1996; KNIPPING, VAN ESCH, *et al.*, 2012) e são os principais alérgenos dessa fração.

A redução da alergenicidade das proteínas do soro tem sido estudada empregando-se diferentes métodos, tais como desnaturação térmica (KLEBER, KRAUSE, ILLGNER, *et al.*, 2004b), hidrólise química ou enzimática, fermentação (EHN, ALLMERE, TELEMO, *et al.*, 2005), polimerização enzimática pela

transglutaminase (VILLAS-BOAS, FERNANDES, ZOLLNER, *et al.*, 2012), alta pressão (IZQUIERDO, PEÑAS, BAEZA, *et al.*, 2008) e microondas (PEÑAS, SNEL, FLORIS, *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais utilizados para reduzir a alergenicidade de proteínas e pode ser realizada com a enzima livre ou imobilizada. A enzima imobilizada é definida como a enzima ligada a um suporte sólido que retém sua atividade catalítica e pode ser reutilizada (KATCHALSKI-KATZIR, 1993). Dentre as vantagens do uso de enzima imobilizada destacam-se a possibilidade de reuso, prevenção de autólise, facilidade de retirada da enzima do meio reacional e aumento da estabilidade (PEDROCHE, DEL MAR YUST, MATEO, *et al.*, 2007; MATEO, PALOMO, FERNANDEZ-LORENTE, *et al.*, 2007b; CABRERA-PADILLA, PINTO, GIORDANO, *et al.*, 2009; YUST, PEDROCHE, MILLÁN-LINARES, *et al.*, 2010). Uma das diferenças entre a utilização da enzima livre ou imobilizada está na forma de interrupção da reação. Quando a enzima imobilizada é utilizada, a interrupção da hidrólise é feita pela retirada da enzima do meio reacional por filtração. Quando utilizada na forma livre, a enzima deve ser inativada, muitas vezes por aquecimento, para que a reação seja interrompida. Esse aquecimento ao final da hidrólise pode provocar a formação de agregados que, por sua vez, podem aumentar ou reduzir a alergenicidade dos hidrolisados pela exposição ou ocultação de epítomos que não foram destruídos pela hidrólise (WAL, 2004; MONACI, TREGOAT, HENGEL, *et al.*, 2006). Além disso, a fácil remoção da enzima do meio reacional também previne a contaminação do produto final, particularmente em casos de produção de hidrolisados hipoalergênicos, caso a enzima seja antigênica (CHAPLIN, 1990). Assim, a utilização da enzima na forma imobilizada pode permitir a investigação da detecção de alérgenos nos hidrolisados sem a interferência de outros processos, tais como o aquecimento após a hidrólise, e a própria presença da enzima.

Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório, Sabadin, Villas-Boas, Zollner, *et al.* (2012) avaliaram a antigenicidade de hidrolisados de β -Lg com diferentes enzimas. Os hidrolisados de β -Lg produzidos com Alcalase apresentaram a menor resposta antigênica. Portanto, para a continuidade do

estudo, a Alcalase foi a enzima escolhida. Tendo como hipótese que hidrolisados produzidos com Alcalase livre e imobilizada podem apresentar características diferentes, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da hidrólise do IPS com Alcalase na forma livre e imobilizada nas características dos hidrolisados e na detecção de alérgenos residuais (α -La e β -Lg).

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da hidrólise do isolado proteico do soro de leite bovino com a protease Alcalase nas formas livre e imobilizada nas características dos hidrolisados e na detecção das proteínas alergênicas α -La e β -Lg.

2.2 Específicos

- Imobilizar a enzima Alcalase em suporte glioxil-agarose e avaliar a sua estabilidade térmica e o seu reuso;
- Determinar as melhores condições de hidrólise do IPS para obtenção de hidrolisados com maiores grau de hidrólise com a Alcalase nas formas livre e imobilizada, utilizando a metodologia de planejamento experimental;
- Caracterizar os hidrolisados de IPS obtidos com Alcalase livre e imobilizada;
- Avaliar o efeito da hidrólise com Alcalase livre e imobilizada na detecção das proteínas alergênicas (α -La e β -Lg) nos hidrolisados de IPS.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Isolado proteico do soro do leite (IPS)

O soro é o líquido remanescente obtido quando a caseína é removida do leite desnatado (SGARBIERI, 1996) e é composto basicamente por proteínas, lactose, vitaminas, minerais e traços de gordura (KRISSENS, 2007). “Soro ácido” é obtido quando a remoção da caseína é feita pela adição de ácido (pH 4,6), enquanto o “soro doce” é obtido quando a remoção da caseína é feita pela ação da enzima renina. Este último contém maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres resultantes da ação da renina sobre as caseínas (SGARBIERI, 1996). O soro de leite pode, ainda, ser obtido por 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 (SGARBIERI, 2004). Após a ultrafiltração do soro do leite, obtém-se o isolado proteico do soro (IPS), que contém aproximadamente 90 % de proteínas (ESPINOZA, MORAWICKI e HAGER, 2012).

As proteínas representam 10 % dos sólidos do soro de leite (JAUREGI e WELDERUFAEL, 2010) e apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações da FAO/WHO, exceto pelos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, que estão nas recomendações adequadas tanto para adultos quanto para crianças (SGARBIERI, 2004; BIASUTTI, 2006). Além disso, as proteínas do soro apresentam alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), o que é interessante do ponto de vista nutricional, pois a leucina é considerada iniciadora de síntese muscular (BIASUTTI, 2006; JAUREGI e WELDERUFAEL, 2010). As proteínas do soro apresentam ainda atividades fisiológicas específicas, tais como imunomoduladora, antitumoral, antimicrobiana e antiviral, anticancerígena, protetora da mucosa gástrica contra agentes agressores, antihipertensiva e antioxidante (MADADLOU, SHEEHAN, EMAM-DJOMEH, *et al.*, 2011; PANCHAUD, AFFOLTER e USSMANN, 2012; UDENIGWE e ALUKO, 2012; WANG, WANG, CHENG, *et al.*, 2012).

As proteínas do soro correspondem a cerca de 20 % das proteínas do leite (KNIPPING, VAN ESCH, *et al.*, 2012). As suas duas principais proteínas são também as mais alergênicas α -lactoalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg), que representam 70-80 % das proteínas totais do soro (SGARBIERI, 1996; KNIPPING, VAN ESCH, *et al.*, 2012). São encontradas ainda no soro de leite soroalbumina (BSA), imunoglobulinas (Ig), proteose-peptonas, lactoferrina (LF), glicomacropéptido (GMP) e enzimas, tais como lactoperoxidase, lisozima, lactolina e relaxina (SGARBIERI, 1996; BIASUTTI, 2006). Estudos em grandes populações de pacientes alérgicos mostraram que muitos deles são sensibilizados também por BSA, LF e Ig (WAL, 2001).

A β -Lg corresponde à aproximadamente metade do total das proteínas do soro do leite (SEVERIN e XIA, 2006). Essa proteína tem nove fitas de folhas- β antiparalelas e uma α -hélice curta na extremidade N-terminal (NEGRONI, 1998) e ocorre naturalmente na forma de um dímero de 36 kDa em pH fisiológico (pH 6,7) (WAL, 2001; CHEISON, LAI, LEEB, *et al.*, 2011). Cada subunidade corresponde a um polipeptídeo de 162 resíduos de aminoácidos contendo cinco resíduos de cisteína, dos quais quatro estão envolvidos em ligações dissulfeto intracadeia (SÉLO, CLÉMENT, BERNARD, *et al.*, 1999) e são responsáveis pela sua estrutura (EMERTON, 2002). Existem nove variantes genéticas conhecidas da β -Lg: A, B, C, D, E, H, I, J, e W (CHEISON, LAI, *et al.*, 2011), mas as duas principais são A e B. Essas duas variantes diferem em apenas dois pontos, nos resíduos 64 e 118, ácido aspártico e valina em β -Lg A e glicina e alanina na β -Lg B, respectivamente (WAL, 2001). Essa proteína pertence à família das lipocalinas e é considerada uma proteína de alto potencial alergênico (WAL, 2001).

A α -La é uma proteína monomérica globular de 123 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 14,4 kDa e quatro pontes dissulfeto, e é um componente regulatório do sistema enzimático da galactosil-transferase responsável pela síntese de lactose (WAL, 2001). Além disso, possui grande afinidade de sítios ligantes por cálcio, e essa ligação estabiliza sua estrutura secundária (EMERTON, 2002). Duas variantes genéticas (A e B) da α -La já foram

identificadas, mas, somente a variante B tem sido observada em leites das raças bovinas ocidentais (SGARBIERI, 1996).

A soro albumina bovina (BSA) apresenta massa molecular de 66 kDa, é constituída por 582 resíduos de aminoácidos e está presente no soro em concentrações de 0,1 a 0,4 g/L. (TARDIOLI, 2003^a; WAL, 2004). Essa proteína possui 17 ligações dissulfeto intramoleculares e um grupo SH livre no resíduo 34 e é responsável pelo transporte de ácidos graxos no sistema sanguíneo (TARDIOLI, 2003a).

As imunoglobulinas (Ig) pertencem à família de glicoproteínas, apresentam massa molecular entre 15 e 1000 kDa e estão presentes no soro de leite bovino na quantidade de 0,6 a 1 g/L (TARDIOLI, 2003^a; WAL, 2004). São monômeros de duas cadeias polipeptídicas de 20 kDa e duas cadeias polipeptídicas de 50 a 70 kDa, unidas por ligações dissulfeto. As imunoglobulinas desnaturam-se em temperaturas mais elevadas que α -La e β -Lg, mas na presença de outras proteínas do soro são extremamente termolábeis, devido à interação por meio de ligações dissulfeto com β -Lg e BSA (TARDIOLI, 2003a).

As proteose-peptonas consistem de uma fração minoritária do soro de leite (aproximadamente 10 %) de estabilidade térmica e proteínas solúveis em ácido (ISGROVE, WILLIAMS, NIVEN, *et al.*, 1998). São conhecidos quatro principais grupos de proteose-peptonas: β -CN-5P (Mr 12 300), β -CN-4P (Mr 3469), β -CN-1P (Mr 9000) e HFPP (fração hidrofóbica de proteose-peptonas), os quais são conhecidos como PP5, PP8f, PP8s e PP3, respectivamente (ISGROVE, WILLIAMS, *et al.*, 1998). O componente PP3 é considerado responsável pela formação de espuma no leite (KARAMOKO, DANTHINE, OLIVE, *et al.*, 2012) e os componentes PP5 e PP8f contém a sequência peptídica SerP–SerP–SerP–Glu–Glu, conhecida por apresentar atividade anticariogênica e regulação da biomineralização (ISGROVE, WILLIAMS, *et al.*, 1998)

O glicomacropéptido está presente no soro de leite doce, pois é liberado pela κ -caseína sob ação de quimosina durante a fabricação do queijo (KRISSENSSEN, 2007; MADUREIRA, TAVARES, GOMES, *et al.*, 2010). Esse peptídeo aparece no soro em concentração de aproximadamente 1g/L e tem

massa molecular de 7 kDa (JAUREGI e WELDERUFAEL, 2010). O glicomacropéptido é uma molécula anfótera e também apresenta alta quantidade de aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada (JAUREGI e WELDERUFAEL, 2010).

A lactoferrina é uma glicoproteína ligante de ferro, pertencente à família das transferrinas, que existe tanto no leite humano quanto no leite bovino (ADLEROVA, BARTOSKOVA e FALDYNA, 2008; LI, DING, CHEN, *et al.*, 2012). Esta proteína tem massa molecular de aproximadamente 76 kDa e está presente no leite bovino em quantidade de 0,1 g/L (JAUREGI e WELDERUFAEL, 2010). A lactoferrina se caracteriza por uma cadeia polipeptídica simples contendo 703 resíduos de aminoácidos, dobrada em duas metades homólogas conhecidas como domínios globulares que representam suas extremidades N e C-terminal (BAKER, BAKER e KIDD, 2002; ADLEROVA, BARTOSKOVA, *et al.*, 2008). Em cada domínio existe um local onde o íon férrico se liga com um ânion sinérgico, normalmente bicarbonato (BAKER, BAKER, *et al.*, 2002; ADLEROVA, BARTOSKOVA, *et al.*, 2008). A lactoferrina é resistente à proteólise no trato digestivo e, apresenta atividades anti-bacteriana, anti-viral e anti-tumoral; regulação de crescimento e diferenciação celular; atividade anti-inflamatória e modulação da resposta imune (BAKER, 2005).

3.2 Alergia às proteínas do leite de vaca e principais antígenos

A alergia alimentar é uma doença que afeta tanto crianças quanto adultos, porém a maior incidência está entre os primeiros (WRÓBLEWSKA, KARAMAĆ, AMAROWICZ, *et al.*, 2004). A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade mediada imunologicamente a algum alimento, incluindo reações mediadas por anticorpos (IgE) e/ou por células (GREER, SICHERER, BURKS, *et al.*, 2008). As reações mediadas por IgE são conhecidas também como reações de hipersensibilidade do tipo imediata, pois ocorrem imediatamente ou dentro de 2 horas após a exposição ao alimento. Essas reações caracterizam-se pela ligação

de um alérgeno a anticorpos IgE específicos ligados à membrana plasmática de basófilos e/ou mastócitos, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios, que são os causadores dos sintomas (KNIPPING, VAN ESCH, *et al.*, 2012). Os sintomas mais comuns da alergia alimentar são urticária, edema, vômito, diarreia, podendo chegar ao choque anafilático (MORISAWA, KITAMURA, *et al.*, 2009; KNIPPING, VAN ESCH, *et al.*, 2012).

O leite de vaca é um dos alérgenos alimentares mais comuns para a população infantil, pois muitas vezes, ele é o primeiro alimento proteico ingerido por bebês alimentados com fórmulas, o que pode levar a sensibilização alérgica precoce (HEINE, ELSAYED, HOSKING, *et al.*, 2002). No Brasil, a incidência e a prevalência de alergia à proteína do leite de vaca são 2,2 e 5,7 %, respectivamente (WEFFORT, 2009). A alergia ao leite se manifesta, principalmente, pelas caseínas e pelas duas principais proteínas do soro: α -La e β -Lg (WAL, 2001).

O diagnóstico de alergia ao leite de vaca é baseado na história clínica, testes de alergia e, se necessário, um ensaio de eliminação do alimento, desafio oral e re-eliminação (KNEEPKENS e MEIJER, 2009; KATTAN, COCCO e JÄRVINEN, 2011). O tratamento de qualquer alergia alimentar se baseia na eliminação do alimento alergênico. Porém, a eliminação do leite pode causar problemas nutricionais, pois esse alimento é uma importante fonte de gorduras e proteínas na primeira infância (KATTAN, COCCO, *et al.*, 2011). Uma alternativa que tem sido utilizada é a substituição do leite por fórmulas hipoalergênicas compostas de caseínas ou proteínas do soro parcial ou extensivamente hidrolisadas. De acordo com a Academia Americana de Pediatria (AAP), para ser considerada hipoalergênica, essas fórmulas devem ser toleradas por pelo menos 90 % das crianças não amamentadas alérgicas às proteínas do leite de vaca (HUANG e KIM, 2012).

Qualquer molécula que se ligue a um anticorpo ou a um receptor de célula T (TCR) é considerada um antígeno (ABBAS, 2009). Os antígenos que produzem reações de hipersensibilidade imediata (alérgicas) são chamados de alérgenos (ABBAS, 2009). Os anticorpos podem reconhecer uma grande variedade de

estruturas químicas, incluindo proteínas, polissacarídeos, lipídeos e pequenas substâncias químicas (ABBAS, 2009). De acordo com Besler (2001), alérgenos alimentares geralmente são proteínas ou glicoproteínas com massa molecular entre 10 e 70 kDa. Antígenos proteicos estimulam a produção de anticorpos somente na presença de linfócitos T, que são chamados de células T auxiliares (CALICH, 2001; ABBAS, 2009). A porção específica de um antígeno macromolecular à qual um anticorpo se liga é denominada epítipo ou determinante antigênico (ABBAS, 2009). No caso de um antígeno proteico, um epítipo é a porção do peptídeo que interage com anticorpos ou com os receptores dos linfócitos sensibilizados (CALICH, 2001; KLEBER, KRAUSE, ILLGNER, *et al.*, 2004a).

Existem dois tipos de epítipos: os sequenciais e os conformacionais. Epítipos sequenciais incluem aminoácidos consecutivos ao longo da estrutura primária da proteína que são reconhecidos pelos anticorpos IgE, enquanto que epítipos conformacionais consistem de aminoácidos que são dispostos muito próximos devido à estrutura terciária da proteína (ALBRECHT, KÜHNE, BALLMER-WEBER, *et al.*, 2009; WANG, 2011). A estrutura tridimensional é uma importante característica na alergenicidade das proteínas do leite, pois os epítipos são numerosos e extensivamente distribuídos ao longo das moléculas das proteínas do leite (WAL, 2001). Eles podem estar localizados em partes hidrofóbicas da molécula, inacessível a anticorpos IgE na conformação nativa da proteína, mas após passar pelo trato gastrointestinal se tornam biodisponíveis .

A estrutura tridimensional da β -Lg está intimamente relacionada com sua alergenicidade, pois ela é responsável pela ocultação de alguns epítipos sequenciais à hidrólise ácida e à digestão por enzimas digestivas, o que permite a sua passagem de forma intacta pela mucosa intestinal (EMERTON, 2002; WAL, 2004). Isso pode estar relacionado com a alergia ao leite de vaca também em crianças exclusivamente amamentadas, pois proteínas alergênicas, tais como a β -Lg, ingeridas pela mãe passam de forma intacta pela mucosa intestinal e podem alcançar o leite materno (WAL, 2004).

A α -La e a β -Lg são os principais alérgenos do soro de leite e parecem apresentar certas porções alergênicas estruturadas em forma de alça (loops) com conformações semelhantes, o que sugere uma conformação característica para sítios alergênicos nessas proteínas (SHARMA, KUMAR, BETZEL, *et al.*, 2001). A estrutura da β -Lg é responsável pela ocultação de alguns epítomos sequenciais à hidrólise ácida e à digestão por enzimas digestivas, o que consiste em uma das razões de sua alergenicidade (EMERTON, 2002).

A α -La, por sua vez, é facilmente digerida pela pepsina, entretanto, é um dos principais alérgenos do leite de vaca. Uma possível explicação para isso é que outros componentes da matriz alimentar podem influenciar na proteólise dessa proteína (MORENO, MACKIE e MILLS, 2005). Moreno, Mackie Mills (2005), em estudo da digestão *in vitro* da α -La na presença e ausência de fosfatidilcolina, mostraram que ocorre interação entre esse lipídeo e a α -La capaz de retardar a digestão e, até mesmo, alterar o padrão de fragmentação dessa proteína.

3.3 Principais técnicas de detecção de alérgenos

Para indivíduos alérgicos, quantidades traços de alérgenos podem induzir reações severas e até mesmo fatais (CUCU, JACXSENS e DE MEULENAER, 2013). Diante da seriedade dessas reações, os EUA e a União Europeia criaram legislações que estabelecem a obrigatoriedade por parte da indústria de relatar de forma clara nos rótulos os alérgenos mais comuns presentes no alimento (EUROPEAN UNION, 2007; ASBAI, 2012). Segundo o Guia prático de diagnóstico e tratamento da alergia às proteínas do leite de vaca mediada pela imunoglobulina E (2012), no Brasil não há esse tipo de legislação, o que configura em risco de exposição inadvertida (ASBAI, 2012). Entretanto, mesmo nos países com legislação bem estabelecida, há relatos da presença de alérgenos não declarados em alguns alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2012). Em muitos casos, isso está relacionado à contaminação-cruzada que pode ocorrer por utilização do mesmo espaço ou até do mesmo equipamento pela indústria para produzir

diferentes tipos de alimentos (PELAEZ-LORENZO, DIEZ-MASA, VASALLO, *et al.*, 2010; CUCU, JACXSENS, *et al.*, 2013). Dessa forma, métodos para detecção de proteínas alergênicas são importantes para proteger o consumidor com alergias alimentares (TAYLOR, NORDLEE, NIEMANN, *et al.*, 2009; CUCU, JACXSENS, *et al.*, 2013).

Técnicas imunológicas são baseadas na formação de um complexo antígeno-anticorpo de alta afinidade (KRSKA, WELZIG e BAUMGARTNER, 2004) e tem sido o método de escolha para identificação de alérgenos alimentares (BESLER, 2001). Besler (2001) ressalta a importância de o método analítico ser altamente específico, sensível (detectando até os traços de alérgenos), rápido, robusto, confiável e custo-efetivo. Dentre os métodos mais utilizados para determinação de alérgenos em alimentos destacam-se *radioallergosorbent test* (RAST), *enzyme allergosorbenttest* (EAST), *Immunoblotting*, *Rocket immunoelectrophoresis* (RIE), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (BESLER, 2001; POMS, 2004; VAN HENGEL, 2007). RIE e *Immunoblotting* oferecem resultados qualitativos ou semi-qualitativos, enquanto que RAST, EAST e ELISA oferecem dados quantitativos (POMS, 2004).

RAST/EAST são imunoenaios que detectam alérgenos alimentares por ligação de anticorpo IgE específico à alérgenos ligados em um suporte sólido (BESLER, 2001). Essa ligação antígeno-anticorpo é detectada pelo uso de um anticorpo anti-IgE marcado com um isótopo (RAST) ou uma enzima (EAST) e pela adição de um substrato que muda de cor ou emite luz (POMS, 2004). Em RIE os antígenos são analisados de acordo com sua mobilidade eletroforética até precipitarem em complexos antígeno-anticorpo em gel (BESLER, 2001; POMS, 2004). *Immunoblotting* tem sido usado na identificação e caracterização de muitos alérgenos alimentares conhecidos (BESLER, 2001; VAN HENGEL, 2007). Nesta técnica as proteínas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com sua massa molecular e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BESLER, 2001). A posição dos antígenos na membrana é uma reprodução de sua posição no gel. As proteínas são detectadas com anticorpos anti-imunoglobulina marcados com radioisótopos ou uma enzima

(POMS, 2004). Contudo, *Immunoblotting* usando sobreposição de peptídeos não pode detectar epítomos conformacionais (MORISAWA, KITAMURA, *et al.*, 2009).

O teste de ELISA é um dos mais usados devido à sua fácil execução, rápida resposta e baixo limite de detecção (MONACI, BROHÉE, TREGOAT, *et al.*, 2011). No teste ELISA do tipo sanduíche, o mais utilizado para detecção de alérgenos alimentares (SCHUBERT-ULLRICH, RUDOLF, ANSARI, *et al.*, 2009), um anticorpo é adsorvido em uma fase sólida e é usado para capturar o antígeno, enquanto que outro anticorpo marcado com uma enzima específica é usado para detectar o antígeno capturado (BESLER, 2001). Em seguida, um substrato é adicionado para reagir com a enzima do anticorpo marcado, resultando em uma reação colorimétrica que pode ser medida por espectrofotometria (MONACI, TREGOAT, *et al.*, 2006). Segundo Puerta; Diez-Masa; de Frutos (2006), o método de ELISA é sensível, seletivo e permite análise de várias amostras simultaneamente, porém apresenta algumas desvantagens como: série de concentrações estreitas, volume de amostra limitado e, em alguns casos, provê apenas dados semi-quantitativos.

Segundo Cucu, Jacxsens, *et al.* (CUCU, JACXSENS, *et al.*, 2013), ELISA tem sido o método de escolha das indústrias de alimentos e das agências de controle para análises de contaminação por alérgenos, e *kits* comerciais são muito utilizados. Alguns grupos de pesquisa também têm utilizado *kits* ou desenvolvido métodos de ELISA para detectar proteínas alergênicas em diversas matrizes alimentares, tais como *cookies* (MONACI, BROHÉE, *et al.*, 2011), vinhos (RESTANI, UBERTI, TARANTINO, *et al.*, 2014), chocolates (KHUDA, SLATE, PEREIRA, *et al.*, 2012), massa folhada (DOWNS e TAYLOR, 2010), alimentos para bebês (PELAEZ-LORENZO, DIEZ-MASA, *et al.*, 2010), fórmulas infantis (WAHN, WAHL e RUGO, 1992; MÄKINEN-KILJUNEN e SORVA, 1993), dentre outros (HOLZHAUSER, STEPHAN e VIETHS, 2002; STEPHAN e VIETHS, 2004). Uma vez que grande parte das fórmulas comerciais é constituída de hidrolisados de proteínas do soro de leite bovino (IZQUIERDO, PEÑAS, *et al.*, 2008), a investigação da detecção de alérgenos residuais em hidrolisados proteicos de IPS é de considerável importância.

3.4 Modificação da alergenicidade do leite por diferentes processos

Muitos alimentos alergênicos são submetidos ao processamento térmico antes do consumo (ALBRECHT, KÜHNE, *et al.*, 2009). Sabe-se que o processamento do leite leva à alteração da alergenicidade (KNIPPING, VAN ESCH, *et al.*, 2012). O leite de vaca é comumente comercializado após sofrer algum processo tecnológico, usualmente envolvendo processo térmico (RESTANI, BALLABIO, LORENZO, *et al.*, 2009). Porém, o aquecimento pode apenas modificar os epítomos conformacionais, os quais podem perder sua capacidade de se ligar a IgEs específicas, mas epítomos lineares não são afetados pelas mudanças estruturais e mantém seu potencial alergênico após aquecimento (ALBRECHT, KÜHNE, *et al.*, 2009; RESTANI, BALLABIO, *et al.*, 2009). Kleber, Krause, Illger, *et al.* (2004b), em estudo do efeito do tratamento térmico na antigenicidade de β -Lg, relataram diminuição da antigenicidade em temperaturas acima de 90°C devido a formação de agregados, pois os anticorpos somente tinham acesso aos epítomos superficiais dos agregados.

Dentre os processos mais utilizados para redução da alergenicidade das proteínas do leite estão: desnaturação térmica, hidrólise química ou enzimática, fermentação, polimerização, alta pressão e microondas (KLEBER, KRAUSE, *et al.*, 2004a; EHN, ALLMERE, *et al.*, 2005; PEÑAS, SNEL, *et al.*, 2006; IZQUIERDO, PEÑAS, *et al.*, 2008; ZHONG, LIU, LIU, *et al.*, 2011; VILLAS-BOAS, FERNANDES, ZOLLNER *et al.*, 2012). A hidrólise de proteínas, que consiste em quebra das ligações peptídicas, pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém, os processos químicos apresentam desvantagens, tais como difícil controle da reação e formação de produtos com aminoácidos modificados (TAVANO, 2013). Tsugita e Sheffler (1982), em estudo de um método para hidrólise ácida de proteínas, usando HCl 6 M a 110°C por mais que 24 horas, observaram destruição de triptofano. A hidrólise enzimática, por sua vez, ocorre em condições mais brandas, o que facilita o controle da reação e diminui a formação de produtos indesejados (CLEMENTE, 2000).

Na hidrólise enzimática de proteínas, parâmetros tais como concentração de substrato, razão enzima:substrato (E:S), pH e temperatura devem ser considerados. A redução ou o aumento do pH pode causar mudanças na atividade da enzima, sendo que cada enzima tem um pH ótimo para sua atividade (CHEISON, SCHMITT, LEEB, *et al.*, 2010). Além disso, o pH influencia na solubilidade de soluções proteicas, pois afeta a natureza e a distribuição de cargas da proteína (PELEGRINE e GASPARETTO, 2005). Geralmente, as proteínas são mais solúveis em valores de pH ácidos ou básicos devido ao excesso de cargas do mesmo sinal, o que promove repulsão dessas cargas e causa a abertura da estrutura proteica, aumentando a solubilidade (PELEGRINE e GASPARETTO, 2005; DAMODARAN, 2010). Em estudo da influência de pH, temperatura, razão enzima-substrato e tempo de hidrólise na antigenicidade de hidrolisados de IPS produzidos com Alcalase, Zheng, Shen, *et al.* (2008) observaram que o parâmetro que mais influenciou na inibição da ligação de IgG anti- α -La foi a temperatura de hidrólise, enquanto que o pH foi o parâmetro que mais influenciou na inibição da ligação de IgG anti- β -Lg.

A escolha da enzima adequada é de crucial importância para obtenção de compostos com características físico-químicas e nutricionais definidas. Existem diferentes tipos de proteases e suas fontes podem ser animais, plantas ou micro-organismos (DAMODARAN, 2010). As enzimas que pertencem ao alimento são chamadas de endógenas e aquelas que são adicionadas ao alimento para causar alguma mudança desejável são chamadas de exógenas. As enzimas exógenas são subdivididas em quatro classes de acordo com o seu comportamento catalítico: as serina proteases, proteases aspárticas (ácidas), as cisteína (sulfidril) proteases, e as metaloproteases. As serina proteases têm seletividade tanto pelo reconhecimento do resíduo N-terminal quanto do C-terminal. Proteases aspárticas (ácidas) se caracterizam por agirem em valores de pH ácidos e por reconhecerem resíduos de aminoácidos apolares. Cisteína (sulfidril) proteases tem ampla seletividade para ligações peptídicas, com preferência por aminoácidos aromáticos, básicos e apolares. As metaloproteases em sua maioria são exoenzimas e necessitam de Zn^{2+} para a sua atividade (DAMODARAN, 2010).

Enzimas proteolíticas são classificadas como endopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas dentro da molécula de proteína ou exopeptidases, que removem aminoácidos das posições N e C-terminal (CLEMENTE, 2000). As exopeptidases podem ainda ser divididas em duas subclasses: as carboxipeptidases, caso sejam específicas para C-terminal e as aminopeptidases, caso sejam específicas para N-terminal (DAMODARAN, 2010). Exopeptidases são úteis para eliminar o sabor amargo característico de peptídeos hidrofóbicos liberados pela proteólise com endopeptidases (DAMODARAN, 2010).

A enzima empregada e sua especificidade também podem influenciar na eficiência da redução da resposta alergênica (KLEBER, KRAUSE, *et al.*, 2004b). Isquierdo *et al.* (2008) obtiveram hidrolisados com menor imunorreatividade utilizando hidrólise com Alcalase ou papaína combinada ao tratamento por microondas. Sabadin, Villas-Boas, Zollner, *et al.* (2012) avaliaram a antigenicidade de hidrolisados de β -Lg produzidos por diferentes enzimas e obtiveram maior grau de hidrólise e menores respostas antigênicas com uso de Alcalase. Os mesmos autores obtiveram peptídeos de massa molecular menor que 6,5 kDa da hidrólise de β -Lg, o que mostra a ampla especificidade da Alcalase. Essa enzima tem sido utilizada também para melhorar as propriedades funcionais de proteínas de grão de bico (YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010), do leite (SOUSA JR, LOPES, TARDIOLI, *et al.*, 2004; WRÓBLEWSKA, JĘDRYCHOWSKI, HAJÓS, *et al.*, 2008), do arroz (GUO, ZHANG, MA, *et al.*, 2012), do camarão (ZHAO, HUANG, ZHANG, *et al.*, 2011), entre outras.

A Alcalase é uma serina protease não-específica produzida pelo *Bacillus licheniformis*. Seu principal componente enzimático é a subtilisina, formada por uma única cadeia polipeptídica com 274 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27 kDa (TARDIOLI, 2003a; TARDIOLI, PEDROCHE, GIORDANO, *et al.*, 2003b). Subtilisina Carlsberg tem ampla especificidade, além de ser de baixo custo, o que viabiliza a sua utilização (ZHENG, SHEN, *et al.*, 2008). A Alcalase quebra ligações peptídicas das quais participam resíduos de aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, e Tyr), ácidos (Glu), sulfurados (Met), alifáticos (Leu e Ala), hidroxil (Ser) e básicos (Lys) no lado

carboxílico (DOUCET, OTTER, GAUTHIER, *et al.*, 2003; DONLON, 2007). O pH ótimo de atuação varia de 6,5 a 8,5 (YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010), enquanto que em pH 1 e 2 a enzima sofre desnaturação e ao redor de pH 4 uma mistura de enzima ativa e desnaturada pode levar à autólise (TARDIOLI, 2003a).

A autólise, interação entre duas moléculas de enzima vizinhas onde uma se comporta como substrato e a outra como enzima, é um problema quando se utiliza a enzima na forma livre (KLIBANOV, 1983). Esse processo de autodigestão é acelerado em temperaturas elevadas e está intimamente relacionado com a inativação térmica de enzimas proteolíticas (KLIBANOV, 1983). A estabilidade térmica da enzima é um fator importante na obtenção de hidrolisados proteicos, pois permite que se trabalhe em temperaturas maiores por períodos prolongados, o que evita o crescimento microbiano no reator (TARDIOLI, PEDROCHE, *et al.*, 2003b; YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010). Uma técnica que tem sido utilizada para aumentar a estabilidade térmica da enzima é a imobilização, pois a fixação em um suporte sólido dificulta sua movimentação e, conseqüentemente, reduz a capacidade de autodigestão (KLIBANOV, 1983).

Enzima imobilizada corresponde àquela enzima ligada a algum suporte sólido que retém sua atividade catalítica e pode ser reutilizada (KATCHALSKI-KATZIR, 1993). Vários estudos têm demonstrado as vantagens do uso de enzimas imobilizadas para a preparação de hidrolisados proteicos (SOUSA JR, RESENDE, GIORDANO, *et al.*, 2003; TARDIOLI, PEDROCHE, *et al.*, 2003b; CABRERA-PADILLA, PINTO, *et al.*, 2009; YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010). Cabrera-Padilla, Pinto, Giordano, *et al.* (2009) afirmam que a imobilização aumenta a meia vida da enzima, o que permite que a mesma enzima seja utilizada repetidas vezes. Para ser interessante do ponto de vista industrial, a enzima deve ser reciclável e reutilizável (YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010), porém a recuperação e o reuso de enzimas livres são trabalhosos e têm altos custos (SOBRAL, RODRIGUES, OLIVEIRA, *et al.*, 2003). Por outro lado, enzimas imobilizadas podem ser retiradas do meio reacional por simples filtração e reutilizadas com facilidade, o que também exclui a necessidade de inativação da enzima (PEDROCHE, DEL MAR YUST, *et al.*, 2007; YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010). Essa última característica

torna o uso de enzimas imobilizadas interessante para produção de hidrolisados hipoalergênicos, pois a presença e as condições de inativação da enzima livre podem influenciar nas características dos hidrolisados formados (CHAPLIN, 1990; MONACI, TREGOAT, *et al.*, 2006).

A agregação de peptídeos durante a hidrólise enzimática de algumas proteínas globulares tem sido relatada em alguns estudos (OTTE, LOMHOLT, IPSEN, *et al.*, 1997; CREUSOT e GRUPPEN, 2007; CREUSOT e GRUPPEN, 2008). Essa agregação ocorre devido à exposição de grupos hidrofóbicos que estavam ocultos na proteína nativa (CREUSOT e GRUPPEN, 2007). Groleau, Morin, Gauthier, *et al.* (2003) observaram agregação de hidrolisados de β -Lg produzidos com tripsina. Cresout e Gruppen (2008) relataram a formação de agregados de peptídeos durante a hidrólise de IPS por tripsina, e os principais peptídeos envolvidos na rede de agregados foram β -Lg AB [f1-45], β -Lg AB [f90-108], e α -L4a [f50-113]. Doucet, Gauthier, Foegeding (2001) observaram agregação de hidrolisados de IPS produzidos com Alcalase. Os agregados, geralmente, são formados por peptídeos de 2 a 6 kDa associados por interações hidrofóbicas e, em menor escala, interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio (POULIOT, GUY, TREMBLAY, *et al.*, 2009).

As interações hidrofóbicas são favorecidas em temperaturas entre 70 e 90 °C (DAMODARAN, 2010). Quando a enzima livre é utilizada para catálise, a reação muitas vezes é interrompida por aquecimento a 90 °C, o que pode favorecer ainda mais a formação dessas interações. Isso pode aumentar a formação de agregados que, por sua vez, podem aumentar ou reduzir a alergenicidade dos hidrolisados (MONACI, TREGOAT, *et al.*, 2006) pela exposição ou ocultação de epítomos sequenciais que não foram destruídos pela hidrólise (WAL, 2004). Além disso, a presença da enzima pode contaminar o produto final, caso ela seja antigênica (CHAPLIN, 1990). Assim, o uso de enzima imobilizada para produção de hidrolisados hipoalergênicos permite a investigação da antigenicidade destes sem a interferência de outros fatores, tais como o aquecimento ou a própria presença da enzima.

A imobilização de enzimas pode ocorrer de duas maneiras: reversível ou irreversível. Uma vez que a enzima é ligada ao suporte e essa ligação só pode ser desfeita mediante perda da atividade biológica do catalisador ou do suporte, a ligação é considerada irreversível (BRENA, 2006). Se essa ligação pode ser desfeita, a imobilização é dita reversível (BRENA, 2006). O uso de métodos reversíveis é atrativo, em especial por razões econômicas, pois quando a atividade enzimática decai, o suporte pode ser regenerado e recarregado com uma enzima nova (BRENA, 2006). Por outro lado, a natureza estável das ligações formadas entre a enzima e o suporte na ligação do tipo irreversível, garante que a enzima não seja liberada na solução durante o uso (BRENA, 2006). Exemplos de ligação do tipo irreversível são a ligação covalente, aprisionamento ou micro-encapsulação e ligações cruzadas, enquanto que adsorção física, ligações iônicas, quelação, ligações metálicas e formação de pontes dissulfeto representam ligações reversíveis (BRENA, 2006).

Diversos suportes podem ser utilizados para imobilizar enzimas e, estes são classificados como inorgânicos ou orgânicos de acordo com sua composição química. Os suportes orgânicos são, ainda, classificados como polímeros naturais ou sintéticos (BRENA, 2006). Dentre os suportes mais utilizados estão sílica, alumina, vidro, agarose, celulose, poliácridamida, poliamida e quitosana (TARDIOLI, PEDROCHE, *et al.*, 2003b). Uma característica física importante dos suportes é a presença ou não de poros. Os suportes não porosos apresentam poucas limitações estéricas, porém os suportes porosos são preferidos aos não porosos devido à sua maior área de contato, que permite ligação de maior quantidade de enzima (BRENA, 2006). Uma matriz porosa que tem sido amplamente utilizada por suas características físico-químicas satisfatórias é a agarose. A agarose é um polímero de galactose obtido a partir do ágar isolado de certas algas marinhas (TARDIOLI, 2003a), que apresenta alta hidrofiliabilidade, ausência de grupos carregados (o que previne adsorção não-específica entre o suporte e o substrato da reação) e disponibilidade comercial (BRENA, 2006). A imobilização em suporte glioxil-agarose ocorre via ligação de grupos aldeídos alifáticos do suporte aos grupos amino da enzima, formando bases de Schiff's

reversíveis e relativamente fracas (GUISÁN, PENZOL, ARMISEN, *et al.*, 1997; YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010).

Segundo Mateo, Grazu, Palomo *et al.* (2007a), a imobilização da enzima deve resultar no aumento da sua estabilidade térmica e ao pH. Pedroche, Yust *et al.* (2007) relacionam o aumento da estabilidade da enzima imobilizada com o aumento dos pontos de ligação da enzima ao suporte, o que é denominado ligação covalente multipontual. Quando uma enzima está ligada multipontualmente em um suporte rígido, ela mantém sua posição relativa inalterada mediante agentes desnaturantes, tais como calor, pH, solventes orgânicos, entre outros (MATEO, GRAZU, *et al.*, 2007a). Tardioli, Pedroche *et al.* (2003b) imobilizaram Alcalase multipontualmente em glioxil-agarose e, esta foi 500 vezes mais estável que a enzima livre. O tempo de imobilização pode aumentar a estabilidade térmica, porém a atividade enzimática diminui levemente devido a impedimentos estéricos da enzima ligada por muitos pontos ao suporte (YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010).

O uso de enzimas imobilizadas para a produção de hidrolisados proteicos tem sido relatado na literatura. Alguns autores imobilizaram Alcalase com sucesso em diferentes suportes (TARDIOLI, PEDROCHE, *et al.*, 2003b; SOUSA JR, LOPES, *et al.*, 2004; YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010; CORÍCI, FRISSEN, VAN ZOELEN, *et al.*, 2011). Tardioli, Pedroche *et al.* (2003b) imobilizaram Alcalase para produção de hidrolisados de caseína. Cabrera-Padilla, Pinto, Giordano, *et al.* (2009) imobilizaram Alcalase em glioxil-agarose para produção de hidrolisados do soro de queijo com baixo conteúdo de fenilalanina destinados a pacientes fenilcetonúricos. Porém, até agora não há dados sobre o emprego de enzimas imobilizadas para produção de hidrolisados hipoalergênicos. Tendo em vista as vantagens já citadas da técnica de imobilização, o uso desse método para produção de hidrolisados hipoalergênicos pode ser promissor.

4 Material e Métodos

4.1 Material

Utilizou-se isolado proteico do soro de leite bovino (IPS) PROVON[®] (Glanbia Nutritionals, Kilkenny, Irlanda). A enzima Alcalase (Sigma-Aldrich[®] St. Louis, MO, EUA) foi utilizada nas formas livre e imobilizada. Para imobilização da Alcalase, foi utilizada a agarose comercial 4BCL (GE HealthCare, Little Chalfont, RU). Foram utilizados *kit* ELISA de quantificação de α -La bovina e *kit* ELISA de quantificação de β -Lg bovina, ambos comprados de Bethyl Laboratories. Inc (Montgomery, EUA). O *kit* acessório contendo todos os reagentes utilizados nos *kits* comerciais também foi adquirido de Bethyl Laboratories. Inc.

Os reagentes utilizados foram: acrilamida, tris (Bio-Rad, Hercules, CA, 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); ureia, Coomassie Brilliant Blue G250, ácido trifluoroacético (TFA) (Merck, Darmstald, Alemanha); ácido tricloroacético (TCA) (Synth, São Paulo, Brasil); acetonitrila (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau de analítico ou cromatográfico.

A Figura 1 (Página 22) ilustra o fluxograma geral do experimento. Para os testes de caracterização e detecção dos alérgenos, o IPS íntegro foi utilizado como controle.

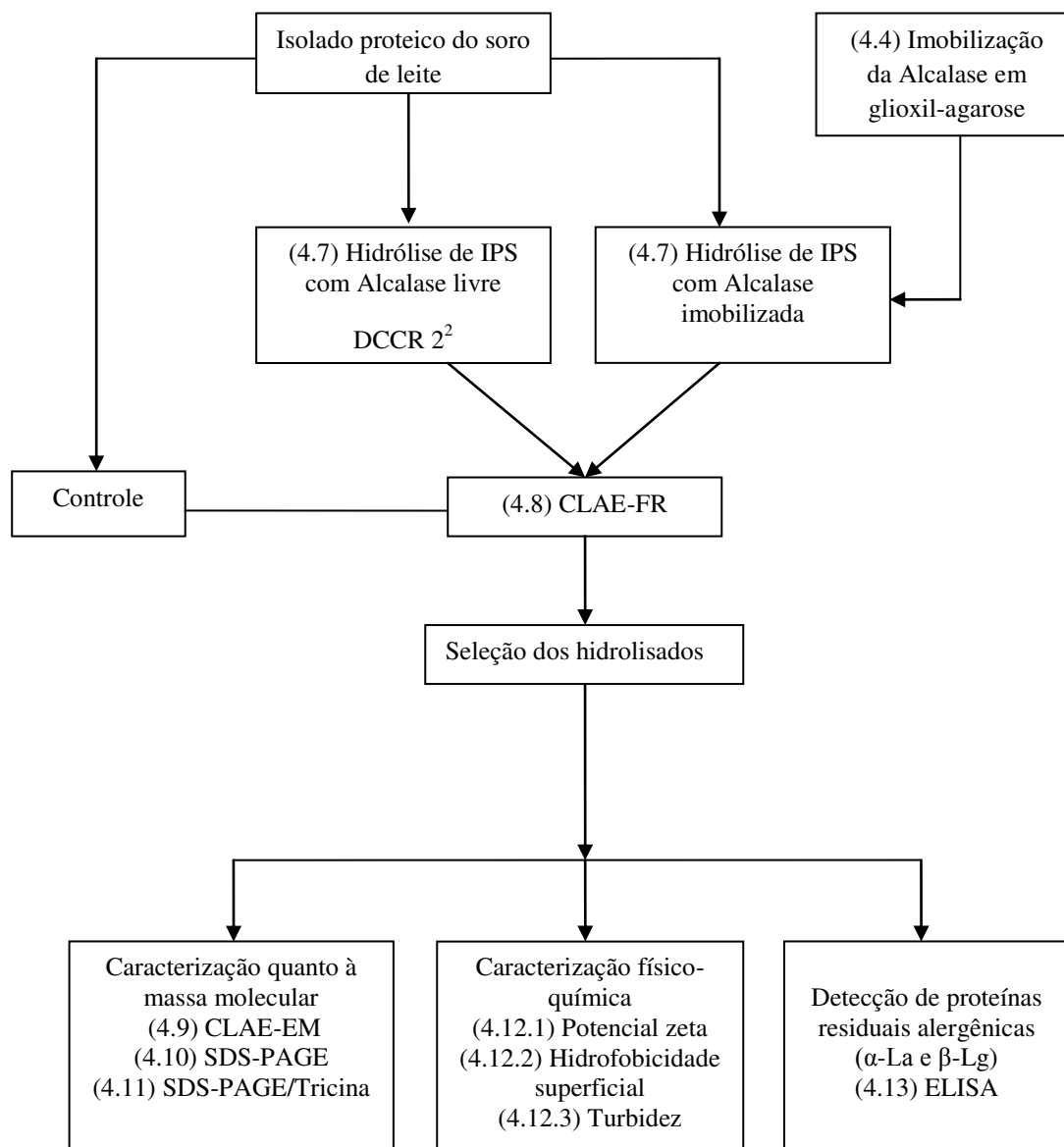


Figura 1: Fluxograma geral do experimento.

4.2 Teor de proteína

O teor de nitrogênio total do IPS e dos hidrolisados foi determinado pelo método de micro Kjeldahl e o teor de proteína calculado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38 (HORWITZ, 2006). A determinação de proteína na Alcalase comercial foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão.

4.3 Atividade enzimática

A atividade proteolítica da Alcalase livre (AL) e imobilizada (Alm) foi determinada utilizando-se solução 1,2 % (m/v) IPS em tampão fosfato (0,1 mol/L), pH 8. A reação foi conduzida a 60°C por 10 min e interrompida pela adição de solução de TCA 16 %, resultando em concentração final 8 % (m/v). O material foi filtrado, centrifugado ($31129 \times g$, 10 min a 25°C), e a absorbância do sobrenadante foi determinada em Espectrofotômetro (Agilent 8453, Xangai, China) a 280 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar em 1 min a proteína solúvel em TCA equivalente a 1 µg de tirosina (EMI, MYERS e IACOBUCCI, 1976). Foi construída uma curva de calibração de L-tirosina (Sigma) com 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de tirosina.

4.4 Imobilização da Alcalase

Para preparo do suporte glioxil, a agarose 4BCL foi ativada com glicidol (2,3-epoxi-propanol), como descrito por Guisán (1988). Para cada grama de agarose, foram adicionados, em banho de gelo, 286 µL de água, 476 µL de 1,7 N NaOH contendo 28,5 mg de borohidreto de sódio/mL de solução e 343 µL de glicidol. Após 18 horas sob agitação, o suporte foi lavado com água destilada e seco a vácuo. A agarose assim ativada foi oxidada com 100 mM NaIO₄ por 2 h sob

agitação mecânica suave, para ruptura dos grupos gliceril e formação dos grupos glioxil. A reação de oxidação com periodato é estequiométrica e, portanto, é possível controlar a reação para obtenção do grau de ativação desejado (GUISÁN, 1997c). Ao final, a agarose ativada foi lavada a vácuo abundantemente com água milli Q. A Alcalase foi diluída em tampão carbonato de sódio 10 mM pH 10,2 (480 µL de enzima/100 mL), 5 mL foram tomados como controle e o restante foi adicionado ao suporte (partindo-se da proporção de 10 mL de solução de enzima/g de suporte). A suspensão foi mantida a 4°C, sob agitação constante, por 24 horas. Amostras do sobrenadante foram retiradas para medida da concentração de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (item 4.2). Após 24 h, foi acrescentado 1 mg de boroidreto de sódio por mL de suspensão (volume total). Após mais 30 min de agitação, o gel foi lavado sob vácuo com água milli Q e, depois com tampão fosfato (0,1 mol/L), pH 8. A enzima imobilizada foi armazenada sob refrigeração, em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 8 contendo 0,02 % de azida sódica. A Figura 2 (Página 25) representa o processo de ativação do suporte e imobilização da enzima.

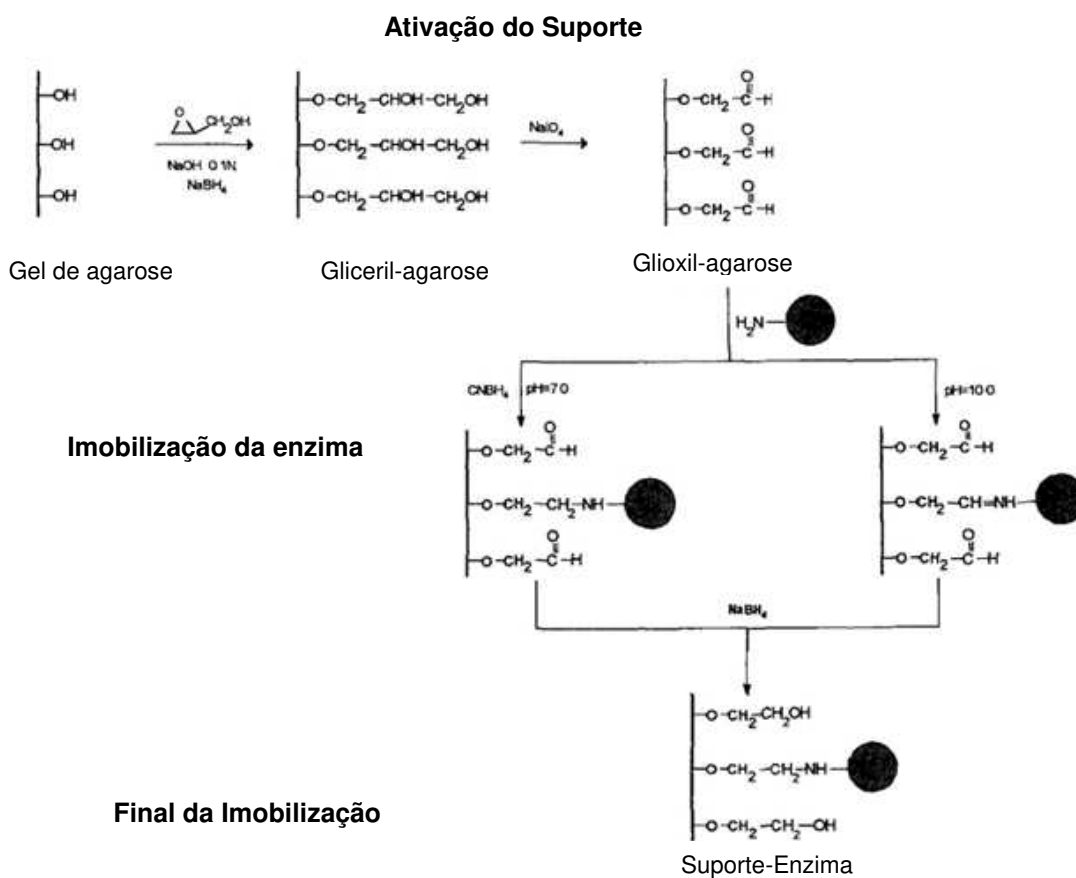


Figura 2: Ativação do suporte com grupos gloxil e química do processo de imobilização.
Fonte: Adaptado de Guisán, Bastida, Blanco (1997a).

4.5 Determinação de estabilidade enzimática

A estabilidade térmica foi determinada pela incubação da enzima nas formas livre e imobilizada a 65 °C e pH 8,0. Em diversos tempos de reação (0, 15, 30, 60 e 90 min), alíquotas foram retiradas das soluções incubadas para acompanhamento da atividade enzimática. A atividade residual a cada tempo foi expressa como percentual da atividade enzimática inicial (atividade relativa).

4.6 Testes de reuso da Alcalase imobilizada

A reutilização da Alm foi avaliada por meio de repetição de atividades enzimáticas. Ao final de cada atividade enzimática, a Alm foi recuperada por filtração a vácuo e reutilizada para nova reação de atividade. As mesmas condições iniciais (proporção massa de Alm: volume de solução de substrato) foram mantidas nos ensaios subsequentes. A atividade inicial foi considerada 100 %, para cálculo de atividade residual nos demais ciclos.

4.7 Obtenção dos hidrolisados do isolado proteico do soro (IPS)

Para determinar as melhores condições de hidrólise do IPS com a enzima livre e com a imobilizada foi utilizada a metodologia de planejamento experimental (RODRIGUES e IEMMA, 2009). As condições de hidrólise (Tabela 1, página 27) foram estabelecidas por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², contendo 3 pontos centrais (nível 0), 4 pontos axiais (níveis +1,41 e -1,41) e 4 pontos fatoriais (níveis +1 e -1), totalizando 11 experimentos por enzima. O planejamento experimental foi realizado para avaliar a influência das variáveis independentes: temperatura e pH no grau de hidrólise (GH), que foi a variável dependente. Para todos os ensaios, o IPS foi preparado em solução aquosa na concentração de 3 % (m/v) e a relação enzima: substrato foi fixada em 120 U de enzima/ g de substrato. A atividade da enzima foi determinada imediatamente antes de cada ensaio conforme descrito no item 4.3.

Após 180 min, a reação foi interrompida por aquecimento a 90° por 10 min ou pela retirada da enzima do meio reacional por filtração a vácuo quando a enzima livre ou imobilizada foi utilizada, respectivamente.

Tabela 1: Valores de pH e temperatura utilizados no DCCR para hidrólise de IPS com Alcalase livre e imobilizada.

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	7,0	7,3	8	8,7	9,0
Temperatura (°C)	45	48	55	62	65

A função matemática aplicada para a resposta (variável dependente Y) está em função das variáveis independentes, conforme a equação 1:

$$Y = \varphi(\text{pH}, T) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1^2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_{1,2} x_1 x_2 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: β_0 , β_1 , β_2 e $\beta_{1,2}$ são os coeficientes constante, lineares, quadráticos e as interações dos coeficientes, respectivamente, e x_1 e x_2 representam as variáveis independentes codificadas para o modelo.

Tanto para os experimentos realizados com a enzima livre como com a imobilizada, a reação de hidrólise foi monitorada utilizando-se o método pH-stat, com uso de titulador automático modelo Metler DL 21 (Schwerzenbach, Suíça) com sistema de agitação por 180 min. O GH foi definido pela equação 2 (ADLER-NISSEN, 1986):

$$\text{GH (\%)} = \frac{B N_b (1/\alpha) (1/MP) (1/h_{\text{tot}})}{100} \quad (\text{Equação 2})$$

onde: B = consumo de base em mL; N_b = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo α -NH₂; MP = massa da proteína em g; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato proteico, cujo valor é de 8,8 mmol/g de proteína para o isolado proteico do soro de leite (STĂNCIUC, VAN PLANCKEN, ROTARU, *et al.*, 2008).

Após hidrólise, os hidrolisados tiveram o pH ajustado para 6,5 com 1 N HCl e, em seguida, foram liofilizados e armazenados a -20°C para análises posteriores.

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

A análise cromatográfica foi realizada de acordo com Sabadin, Villas-Boas, Zollner, *et al.* (2012) com algumas modificações. Utilizou-se coluna C18 Luna (250 mm x 4,6 mm DI, 5 μ m) – Phenomenex - Woburn, MA, EUA. A composição dos solventes utilizada foi: solvente A: 0,04 % de ácido trifluoracético (TFA) (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) em água Milli-Q, solvente B: 0,03 % TFA em acetronitrila (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) de grau HPLC (High Performance Liquid Chromatography), filtrados em membrana 0,45 μ m (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha). A coluna foi mantida em temperatura ambiente, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, detector fixado em 214 nm, volume de injeção de 25 μ L, sendo equilibrada com 100 % do solvente A. A eluição das amostras foi realizada em gradiente linear até 70 % do solvente B em 40 min, mantida de forma isocrática por 5 min e reequilibrada às condições iniciais durante 15 min. As proteínas α -La e β -Lg foram utilizadas como padrões. As amostras foram solubilizadas em 0,03 % TFA na concentração de 3 mg de proteína/mL de solução e filtradas em membranas de acetato de celulose 22 μ m (Schleicher & Schüll, Dassel, Dassel, Alemanha). Cada amostra foi analisada em duplicata.

Para fim de avaliação, os cromatogramas dos hidrolisados com enzima livre e dos hidrolisados com enzima imobilizada foram divididos em 3 zonas: (I) alta hidrofiliçidade, até 16 min, com solução B na concentração entre 10 % e 30 %; (II) média hidrofiliçidade, entre 16 e 22 min, com solução B entre 30 % e 40 % e (III) baixa hidrofiliçidade, a partir de 22 min, com concentração de solução B acima de 40 %.

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas foram realizadas em sistema SDS-PAGE 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. O IPS e os hidrolisados foram diluídos em tampão redutor (0,0625 mol/L Tris-HCl, 2,0 % SDS, 20 % glicerol, 5,0 % β -mercaptoetanol e azul de bromofenol, pH 6,8) na concentração de 2 % proteína e aquecida a 95 °C/4 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 μ L de amostra. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie 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 *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. A concentração relativa de α -La e β -Lg foi obtida pela densitometria dos géis de eletroforese, que foram analisados utilizando o software livre *Image J* (v1.45s). Os resultados foram expressos como porcentagem da área de cada pico em relação à somatória da área de todos os picos das proteínas detectados em cada amostra.

4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS/Tricina (SDS-PAGE/Tricina)

No sistema SDS-PAGE-Tricina foram utilizados géis de poliacrilamida de diferentes concentrações: gel de separação (16,5 %T e 3 %C) com 6 mol/L ureia, gel espaçador (10 %T e 3 %C) e gel de empilhamento (4 % T e 3 %C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (0,0625 mol/L Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 20 % glicerol, 5 % β -mercaptoetanol e 0,1 % Coomassie Blue G250), aquecidos a 90 °C por 5 min. Aplicou-se alíquotas de 10 μ L de solução 2 % das amostras. Após as corridas, os géis foram fixados por 1 h em solução metanol/ácido acético/água (5:1:4) e corados por Coomassie Blue G250 (0,025 % de Coomassie Blue em 10% ácido acético). Posteriormente, foram descorados em 10 % ácido acético. A MM dos peptídeos foi estimada utilizando padrão de 3,5 a 26 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

4.11 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

Os hidrolisados foram avaliados por cromatografia de exclusão molecular (CLAE-EM), a fim de se verificar sua distribuição de massa molecular (MM) aparente. Foi utilizado Sistema de HPLC Agilent, Sistema de bombas quaternário, Semi Preparativo e Analítico com Detector por Arranjo de Diodos (DAD), com coluna Protein-Pak™ 60 Å – 7,8 mm x 300 mm (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) (faixa de separação de 1-20 kDa). A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,8, utilizando α -La como referência. O fluxo foi de 0,5 mL/min e o monitoramento a 214 nm. O volume de injeção de amostra foi de 20 μ L (3 mg/mL) e o tempo de eluição 40 min.

4.12 Caracterização físico-química

4.12.1 Potencial zeta

A análise do potencial zeta foi realizada em equipamento Zetasizer para avaliar o ponto isoelétrico (pI) dos hidrolisados de IPS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Os hidrolisados foram reidratados em água deionizada (0,1 % m/v) e a varredura da carga líquida dos hidrolisados foi realizada variando o pH de 7 a 3. A titulação foi realizada com 0,2 N HCl. As análises foram realizadas em triplicata.

4.12.2 Hidrofobicidade superficial

A hidrofobicidade superficial (S_0) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Alizadeh-Pasdar e Li-Chan (2000) com algumas adaptações, utilizando a sonda fluorescente aniônica 1-anilino-naphthalene8-

sulfonate (ANS). Os hidrolisados foram diluídos em 0,01 M de tampão fosfato (pH 7,4) em concentrações de 0,005 % a 0,025 % (g/mL) e a concentração de ANS foi mantida em 8 mM em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4). Para determinação da hidrofobicidade superficial, o comprimento de onda de excitação e emissão foi 390 nm e 470 nm, respectivamente. Às alíquotas de 2 mL das soluções dos hidrolisados, foram adicionados 10 μ L de solução 8 mM ANS e misturada em vórtex. Alíquota de 200 μ L foi transferida para microplaca preta. Após 15 min em ambiente escuro, a intensidade de fluorescência relativa (RFI) de cada solução foi medida contra o branco (tampão com ANS) utilizando um leitor de microplaca *Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek®, Vermont, EUA). Os valores de RFI dos controles de cada diluição, sem ANS, foram obtidos e subtraídos da leitura da solução correspondente com ANS, obtendo-se a RFI. A S_0 foi determinada a partir do slope inicial da regressão linear obtida no gráfico de RFI versus a concentração de proteína (%). Cada amostra foi lida em duplicata.

4.12.3 Turbidez

Análise de turbidez dos hidrolisados foi realizada de acordo com Groleau, Morin, Gauthier, *et al.* (2003). Os hidrolisados foram reidratados (1 % m/v) em tampão pH 4 preparado com 0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato de sódio, e em tampão pH 7 preparado com 0,2 M de fosfato de sódio. Para análise da turbidez, soluções tamponadas dos hidrolisados foram analisadas na presença de NaCl (0,5 e 1 M), ureia (6 M), SDS (5 %) ou uma mistura de SDS (5 %)/ β -mercaptoetanol (5 %). Todas as soluções reagiram por 90 min à temperatura ambiente, e soluções com SDS e β -mercaptoetanol (β -ME) foram fervidas por 2 min. Agregação nas diferentes soluções foi estimada pela densidade óptica medidas a 500 nm (A_{500}) usando um espectrofotômetro (Agilent 8453, Xangai, China). As análises foram feitas em triplicata.

4.13 Detecção de proteínas alergênicas por ELISA

O IPS e os hidrolisados obtidos com AL e Alm foram analisados com os *kits* comerciais para detecção de α -La e β -Lg de acordo com instruções do fabricante. Para determinar a melhor concentração para as avaliações, testes preliminares foram realizados com diluições seriadas de uma solução inicial (100 μ g/mL) das amostras. As curvas de calibração foram construídas com padrões de α -La e β -Lg fornecidos pelos *kits*. As amostras foram analisadas em triplicata e os dados quantitativos foram obtidos pela medida da absorbância a 450 nm, em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, Toronto, Canadá), utilizando microplaca de 96 poços. As curvas do tipo quatro parâmetros para a determinação de concentração de α -La e β -Lg foram construídas com sete pontos (duas replicatas para cada ponto). O máximo CV aceito foi igual a 5 %. A equação da curva (Equação 3) representa um padrão para expressão de dados de imunoenensaio (CUCU, PLATTEAU, TAVERNIERS, *et al.*, 2013).

$$\text{Absorbância} = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D \quad (\text{Equação 3})$$

onde A é a mínima absorbância da curva, B é a inclinação da curva, C é o valor de E_{50} (concentração na qual se tem a metade da saturação máxima), x é a concentração de padrão ou amostra e D é a máxima absorbância da curva.

4.14 Análise estatística

Para os DCCR, a análise de variância (ANOVA) foi feita pelo programa *Statistica 7.0* (Statsoft, Tulsa, EUA). Apenas as variáveis com nível de confiança $\geq 90\%$ ($p \leq 0,1$) foram consideradas significativas. O programa *Prisma GraphPad* versão 5.0 foi utilizado para a validação do DCCR com Alcalase livre por teste T não pareado e para os testes de análise de variância (ANOVA) e teste de médias

de Tukey da turbidez, hidrofobicidade superficial e ELISA, utilizando nível de confiança $\geq 95\%$ ($p \leq 0,05$).

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do IPS

O IPS utilizado apresentou $84,4 \pm 0,2$ % de proteína. Em seu perfil eletroforético (SDS-PAGE) (Figura 3, página 34) foram identificadas duas bandas de maior intensidade referentes às proteínas β -Lg e α -La, de massa molecular (MM) 18,3 e 14,4 kDa, respectivamente. A banda que aparece na região de MM em torno de 66 kDa refere-se à albumina de soro bovina (BSA). Observa-se ainda, banda de menor intensidade com MM em torno de 36 kDa que, possivelmente, refere-se à dímeros de β -Lg que não foram destruídos pelas condições redutoras da eletroforese.

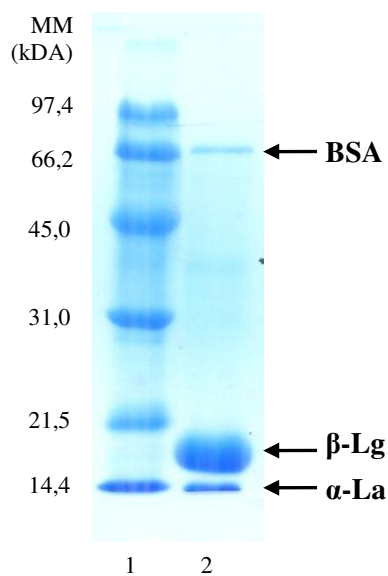


Figura 3: Perfil eletroforético SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12 %), em meio redutor, do isolado proteico do soro de leite. Coluna 1: padrão de MM (14,4-97,4 kDa), coluna 2: isolado proteico do soro de leite.

5.2 Imobilização da Alcalase

O teor de proteína na Alcalase comercial foi de 1,94 mg/mL de preparado. A quantidade máxima de Alcalase imobilizada no suporte foi 0,028 mg de proteína/g de suporte e o rendimento de imobilização foi 23 %. Embora o rendimento de imobilização tenha sido baixo, houve alta retenção da atividade da enzima imobilizada. Tardioli, Pedroche, Giordano et al. (2003b) obtiveram 54 % de retenção da atividade da Alcalase imobilizada em suporte glioxil-agarose, enquanto nesse trabalho obteve-se 85 % de retenção de atividade. A reação de imobilização da Alcalase foi interrompida após 24 horas, tempo considerado ótimo para obtenção de máxima estabilidade da enzima (YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010). O alto grau de ativação (111,4 $\mu\text{mol/mL}$ de suporte) e a grande superfície de contato do suporte também podem ter facilitado a interação com a enzima e resultado em maior formação de ligações covalentes multipontuais (MATEO, PALOMO, FUENTES, *et al.*, 2006). A imobilização da enzima, em geral, ocorre nos primeiros minutos de contato enzima-suporte. Porém, é necessário maior tempo de imobilização para permitir um rearranjo da enzima, de forma que ela se estabilize e se ligue por mais pontos ao suporte (ligação covalente multipontual) (MATEO, PALOMO, *et al.*, 2006). A ligação covalente multipontual aumenta a estabilidade da enzima pela rigidificação de sua estrutura tridimensional, o que confere resistência às pequenas mudanças conformacionais causadas por calor, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes (KLIBANOV, 1983; PEDROCHE, DEL MAR YUST, *et al.*, 2007).

A estabilidade térmica da AL e Alm e os testes de reuso da Alm estão apresentados na Figura 4 (Página 36). Na análise da estabilidade térmica, observou-se que com o aumento do tempo de incubação em pH 8 e 65°C, a atividade da AL decaiu rapidamente, enquanto que Alm manteve-se mais estável, principalmente nos primeiros 15 min de incubação. A Alm manteve 15 % de sua atividade inicial em 90 min de incubação, enquanto que a AL perdeu totalmente a atividade em 60 min. Isso confirma que a imobilização da Alcalase em suporte glioxil-agarose aumentou a estabilidade da enzima quando essa foi exposta a

temperatura de 65 °C. Essa característica é de grande importância, visto que a possibilidade de conduzir processos biotecnológicos a temperaturas elevadas reduz o risco de contaminação por mesófilos comuns (YUST, PEDROCHE, *et al.*, 2010).

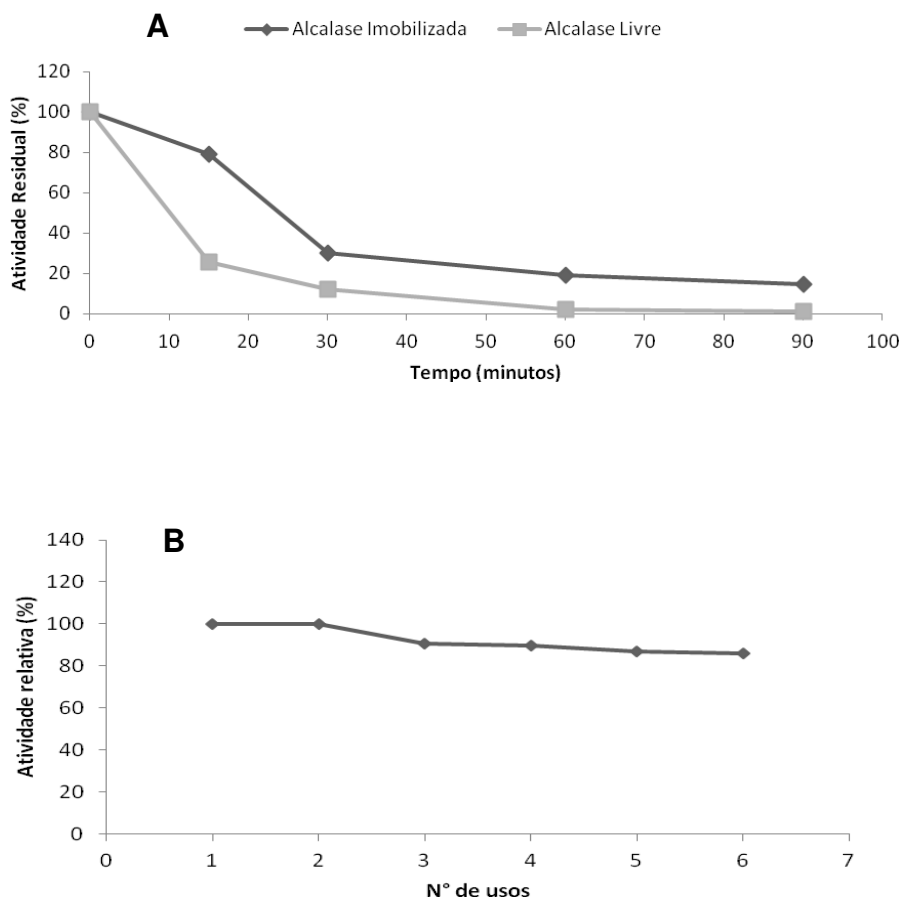


Figura 4: (A) Estabilidade térmica da Alcalase livre e imobilizada avaliada pela incubação em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 e 65°C. (B) Testes de reuso da Alcalase imobilizada em glioxil-agarose

Quando o reuso foi avaliado, a Alm apresentou retenção de atividade nos 6 ciclos realizados, com perda de apenas 15 % de sua atividade após o terceiro ciclo de utilização. A reutilização é uma das características mais importantes da imobilização de enzimas, pois uma vez que a enzima pode ser recuperada e

reutilizada, os custos de produção de hidrolisados diminuem (BRENA, 2006). Outra vantagem da fácil retirada da enzima do meio reacional para a produção de hidrolisados hipoalergênicos é a investigação da antigenicidade da própria enzima, uma vez que essa é retirada do produto final quando está imobilizada (CHAPLIN, 1990).

5.3 Obtenção dos hidrolisados do isolado proteico do soro (IPS)

A Figura 5 (Página 38) apresenta as curvas de hidrólise do IPS com Alcalase livre e imobilizada nas diferentes condições de hidrólise estudadas, apresentadas na Tabela 2 (Página 39). As curvas obtidas com ambas as enzimas mostram taxa de reação elevada nos primeiros 20 minutos de hidrólise. Após esse tempo a velocidade de reação começou a diminuir, chegando próximo de um platô, que se manteve até o final dos 180 min de hidrólise.

De forma geral, a velocidade inicial de reação com a enzima imobilizada foi menor que com a enzima livre. Isso pode ser explicado pela dificuldade de acesso do substrato à enzima imobilizada dentro dos poros do suporte (BICKERSTAFF, 1997; GUIÁN, PENZOL, *et al.*, 1997; PEDROCHE, DEL MAR YUST, *et al.*, 2007). O comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir significativamente daquele da mesma enzima na forma livre (CHAPLIN, 1990). Essas mudanças podem ser tanto devido às alterações conformacionais na enzima, resultante do processo de imobilização, quanto da presença e natureza do suporte de imobilização (CHAPLIN, 1990).

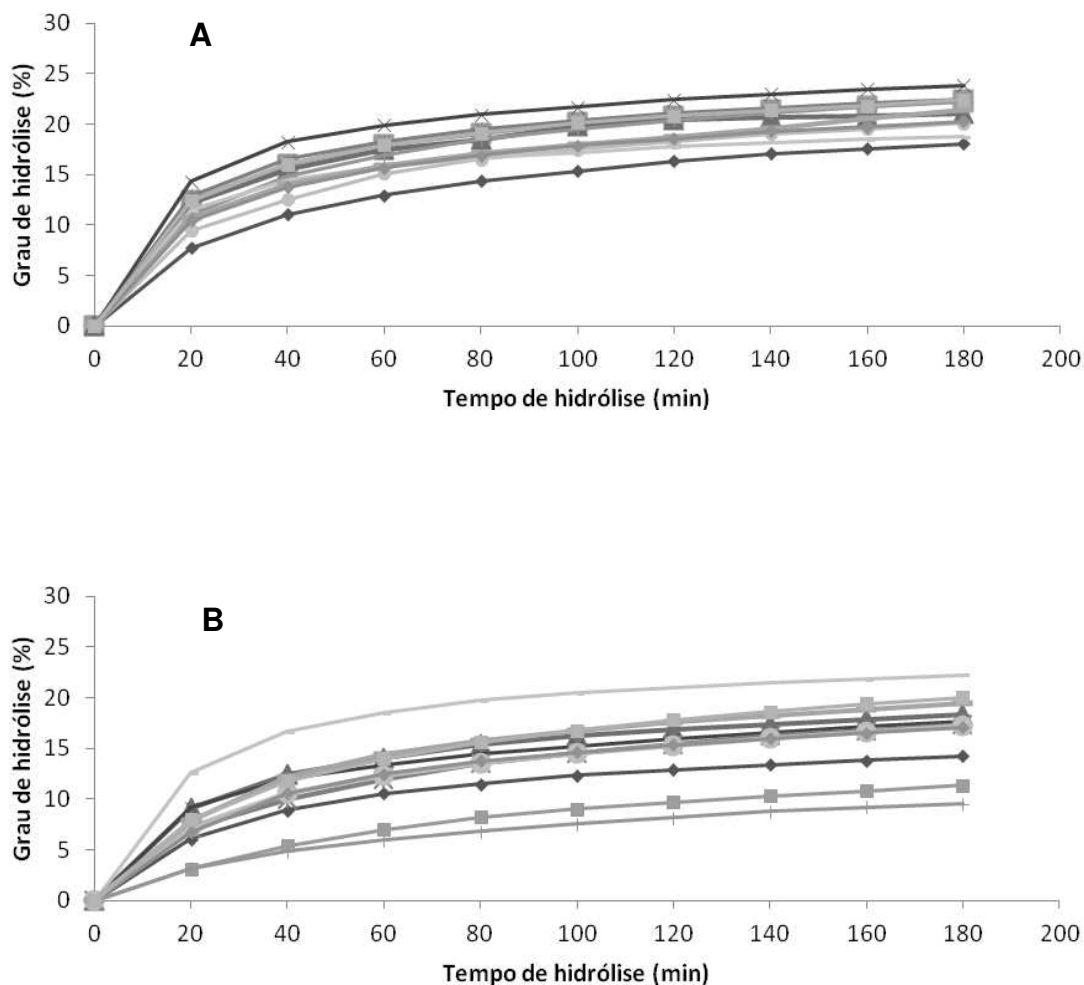


Figura 5: Curvas de hidrólise obtidas com Alcalase livre (A) e imobilizada (B) nas condições de pH e temperatura descritas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR): (1) 7,3 e 48°C; (2) 8,7 e 48°C; (3) 7,3 e 62°C; (4) 8,7 e 62°C; (5) 7,0 e 55°C; (6) 9,0 e 55°C; (7) 8,0 e 45°C; (8) 8,0 e 65°C; (9, 10 e 11) 8,0 e 55°C. Ensaios: 1 (◆); 2 (■); 3 (▲); 4 (×); 5 (✱); 6 (●); 7 (⊕); 8 (—); 9 (—); 10 (◆); 11 (■).

A matriz com os ensaios experimentais e os resultados de GH para cada enzima estão apresentados na Tabela 2 (Página 39).

Tabela 2: Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) para estudo dos efeitos da hidrólise com Alcalase livre e imobilizada na resposta grau de hidrólise (GH %) do isolado proteico do soro de leite.

Ensaio	Variáveis Independentes		Variável Dependente – GH (%)	
	pH	Temperatura (°C)	Alcalase Livre	Alcalase Imobilizada
1	7,3	48	18,1	14,3
2	8,7	48	18,1	11,4
3	7,3	62	21,0	18,3
4	8,7	62	23,9	17,7
5	7,0	55	22,4	17,4
6	9,0	55	20,1	17,3
7	8,0	45	22,2	9,5
8	8,0	65	18,8	22,2
9	8,0	55	21,5	19,4
10	8,0	55	20,3	17,1
11	8,0	55	22,4	20,0

O GH variou de 18,1 a 23,9 % para a AL e de 9,5 a 22,2 % para a Alm. Apesar da mesma relação E:S (em relação à atividade enzimática) ter sido utilizada, a Alm resultou em maior variação de GH que a AL. Uma das principais limitações associadas ao uso de enzimas imobilizadas é a menor atividade catalítica, especialmente quando agem em substratos macromoleculares (BRENA, 2006). Quando suportes porosos, como glioxil-agarose, são utilizados para imobilização, parte da enzima é imobilizada na superfície e parte no interior do suporte, o que pode gerar dificuldades de acesso do substrato a estas enzimas, restringindo a velocidade de ação da enzima imobilizada. Isso pode explicar a obtenção de hidrolisados com menor GH quando a Alm foi utilizada. Esse fenômeno, denominado impedimentos estéricos, se refere à superfície do suporte restringindo o acesso do substrato macromolecular aos sítios ativos da enzima e está esquematizado na Figura 6 (Página 40). Apenas no ensaio 8 o GH do

hidrolisado obtido com a Alm foi maior que aquele obtido com a AL, o que sugere que as condições deste ensaio foram mais favoráveis à ação da Alm. A imobilização aumenta a estabilidade térmica da enzima pela rigidificação de sua estrutura, o que restringe sua movimentação e interação com o substrato (PEDROCHE, DEL MAR YUST, *et al.*, 2007). Entretanto, as condições de hidrólise do ensaio 8 (pH 8,0 e 65 °C) podem ter promovido alterações conformacionais no substrato que facilitaram a sua entrada na malha do suporte, resultando no aumento da interação enzima-substrato (BENJAKUL e MORRISSEY, 1997). Além disso, a temperatura elevada pode ter colaborado com maior energia ao sistema, facilitando o encontro entre enzima e substrato.

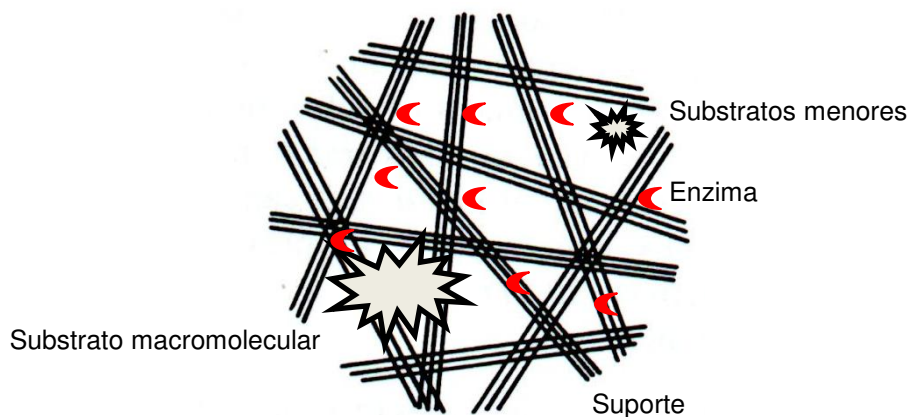


Figura 6: Impedimentos estéricos sofridos pelo substrato durante hidrólise catalisada por enzima imobilizada.

Fonte: Adaptado de Bickerstaff (1997).

A análise estatística dos resultados relativos à AL está apresentada na Tabela 3 (Página 41) e à Alm nas Tabelas 4 e 5 (Página 41).

No DCCR conduzido com a AL, o GH obtido na condição do ponto central foi de 20,3 a 22,4 % (Tabela 2, página 39), ou seja, valores muito próximos aos obtidos nas outras condições do delineamento. Assim, nenhum dos parâmetros avaliados foi estatisticamente significativo, não sendo possível estabelecer um modelo para a resposta GH em função das variáveis pH e temperatura.

Tabela 3: Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com Alcalase livre.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p-valor	Lim. de conf. – 90%	Lim. de conf. + 90%
Média	21,333333	1,436878	14,84701	0,000025	18,43796	24,22871
pH (L)	-0,06176	0,879904	-0,07019	0,946760	-1,83481	1,71129
pH (Q)	-0,17292	1,047296	-0,16511	0,875327	-2,28327	1,93743
T (L)	0,48646	0,879904	0,55285	0,604169	-1,28659	2,25951
T (Q)	-0,62292	1,047296	-0,59479	0,577879	-2,73327	1,48743
pH(L)xT(L)	0,67500	1,244372	0,54244	0,610807	-1,83247	3,18247

Tabela 4: Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com Alcalase imobilizada.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p-valor	Lim. de conf. – 90%	Lim. de conf. + 90%
Média	18,83667	1,044457	18,03489	0,000010	16,73204	20,94130
pH (L)	-0,45414	0,639596	-0,71004	0,509410	-1,74296	0,83468
pH (Q)	-1,06333	0,761272	-1,39678	0,221311	-2,59733	0,47067
T (L)	3,53403	0,639596	5,52540	0,002661	2,24521	4,82285
T (Q)	-1,77833	0,761272	-2,33600	0,066711	-3,31233	-0,24433
pH(L)xT(L)	0,57000	0,904526	0,63016	0,556260	-1,25266	2,39266

Tabela 5: Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com Alcalase imobilizada após reparametrização.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p-valor	Lim. de conf. – 90%	Lim. de conf. + 90%
Média	18,83667	1,044457	18,03489	0,000010	16,73204	20,94130
T (L)	3,53403	0,639596	5,52540	0,002661	2,24521	4,82285
T (Q)	-1,77833	0,761272	-2,33600	0,066711	-3,31233	-0,24433

O DCCR conduzido com a Alm resultou na equação do modelo reparametrizado representada na Equação 4.

$$Y = \varphi(\text{pH}, T) = 17,83 + 3,53x_2 - 1,46x_2^2 \text{ (Equação 4)}$$

As ANOVA dos resultados de cada enzima estão apresentadas na Tabela 6 (Página 42) e 7 (Página 43). O F_{calc} para a regressão foi de 0,19 e 17,62, e a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi de 16,08 e 81,49 % para Alcalase livre e imobilizada, respectivamente. Os valores baixos tanto de F_{cal} quanto de R^2 para a enzima livre são resultado dos valores semelhantes de GH obtidos no DCCR, pois uma vez que não houve variação muito grande desses valores, não foi obtido modelo. Quanto à enzima imobilizada, o F_{cal} foi significativo e, apesar do valor de R^2 ter sido relativamente baixo, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos resultados experimentais, principalmente por se tratar de processos enzimáticos, que apresentam grande variabilidade.

Tabela 6: ANOVA para grau de hidrólise do IPS com Alcalase livre.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{cal}	p-valor
Regressão	5,93801	5	1,18	0,19	0,88
Resíduos	30,96926	5	6,19		
F. ajuste	28,54259	3	9,51		
E. puro	2,42667	2	1,21		
Total	36,90727	10	3,69		

% variação explicada (R^2) = 16,08; $F_{5;5; 0,10} = 10,97$

Tabela 7: ANOVA para grau de hidrólise do IPS com Alcalase imobilizada.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	113,19	2	56,59	17,62	0,02
Resíduos	25,69	8	3,21		
F. ajuste	20,87	6	3,47		
E. puro	4,82	2	2,41		
Total	138,89	10	13,89		

% variação explicada (R^2) = 81,49; $F_{2;8; 0,10}$ = 8,65

A superfície de resposta e a curva de contorno geradas pelo modelo para Alm estão apresentadas na Figura 7 (Página 44). Na faixa de condições estudadas, o pH não interferiu no GH. Porém, à medida que a temperatura aumentou, o GH também aumentou, o que indica que a Alm teve sua atividade aumentada em temperaturas acima de 60 °.

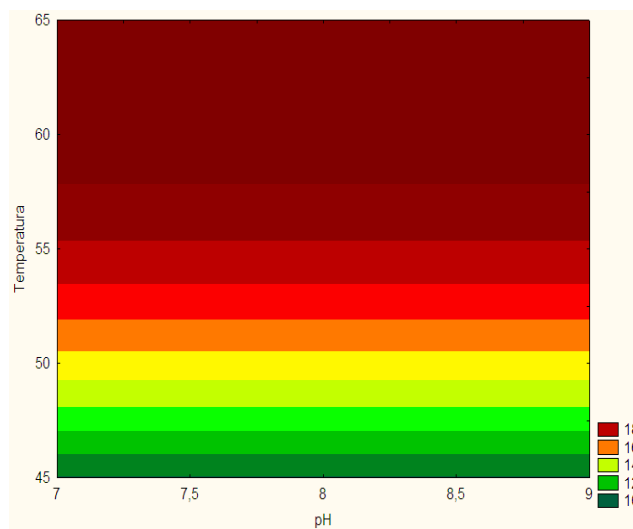
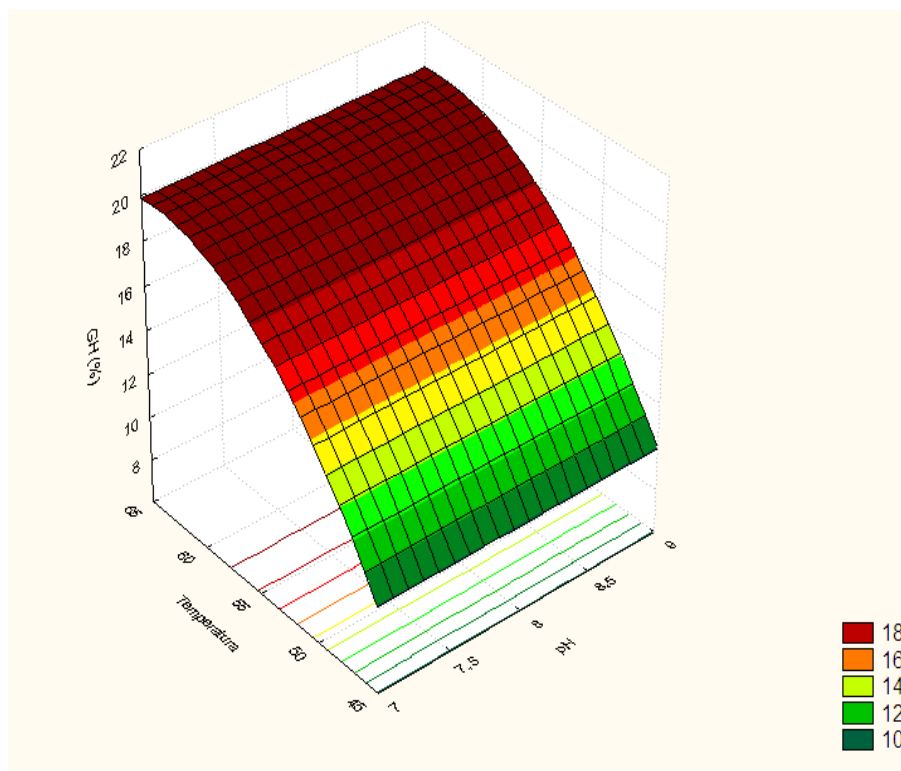


Figura 7: Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta GH do isolado proteico de soro de leite obtida com Alcalase imobilizada em função da temperatura e do pH.

A fim de validar os resultados do DCCR da AL, o ensaio 2 (pH 8,7 e 48 °C) foi realizado em triplicata. Os resultados destes experimentos, $\text{GH} = 17,7 \pm 0,6 \%$, foram comparados aos do ponto central, $\text{GH} = 21,4 \pm 1,05 \%$, por teste T não-pareado e não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre eles. Pode-se considerar, então, os resultados da validação satisfatórios, uma vez que esses confirmaram os resultados do planejamento experimental, os quais mostraram que dentro das faixas de pH e temperatura estudadas, o GH resultante da ação da AL foi muito semelhante.

A partir da análise da superfície de resposta gerada pelo modelo obtido com a Alm determinou-se a temperatura na qual se obtém maior GH, entre 60 e 65°C. O modelo gerado para os resultados com a Alm foi, então, validado realizando-se ensaio de hidrólise em triplicata a 60°C e pH 8,5. Como a variável pH não foi significativa para a construção do modelo experimental, este foi escolhido de acordo com a faixa ótima de atuação da Alcalase (6,5 a 8,5), optando-se pelo limite superior, pois a imobilização aumenta a estabilidade da enzima ao pH. O GH obtido experimentalmente foi $18,4 \pm 0,4 \%$ enquanto que o valor predito pelo modelo reparametrizado (Equação 4, página 42) foi de 19,6 %. Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e os preditos, pode-se considerar que o modelo é eficiente, pois o erro de predição foi pequeno ($\pm 0,84 \%$) e se relaciona com a simplicidade do modelo estatístico que teve como único termo significativo a variável temperatura (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

5.4 Caracterização dos hidrolisados

Os hidrolisados obtidos com a AL foram denominados como HAL e os obtidos com a Alm como HALm, seguidos pelo número referente ao ensaio de hidrólise do DCCR. Por exemplo, os hidrolisados obtidos no ensaio 1 com Alcalase livre e imobilizada foram denominados de HAL1 e HALm1, respectivamente.

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

Os perfis cromatográficos (CLAE-FR) dos hidrolisados obtidos nas condições do DCCR com AL e Alm estão apresentados nas Figuras 8 (Página 47) e 9 (Página 49), respectivamente. As proteínas α -La e β -Lg, utilizadas como padrões, apresentaram tempo de retenção (TR) de 27,2 e 28,0 min, respectivamente, e podem ser observadas no cromatograma do IPS íntegro (Figura 8 A, página 47; Figura 9 A, página 49).

Na Figura 8 (Página 47) observa-se que os perfis cromatográficos dos hidrolisados obtidos com AL sob as diferentes condições de hidrólise apresentaram, em geral, poucos picos na região III, sendo que a maioria dos peptídeos foram eluídos nas regiões de alta (I) e média (II) hidrofiliidade. Isso indica a formação preferencial de pequenos peptídeos hidrofílicos como resultado da ampla especificidade da Alcalase. Embora os hidrolisados tenham apresentado GH semelhantes e perfis cromatográficos com mais picos na região I e II, as condições de reação levaram a diferentes padrões de hidrólise, em especial na região III. Os hidrolisados HAL1, HAL3, HAL4, HAL6, HAL7 e HAL9 apresentaram mais picos nessa região em comparação com os hidrolisados HAL2, HAL5 e HAL8.

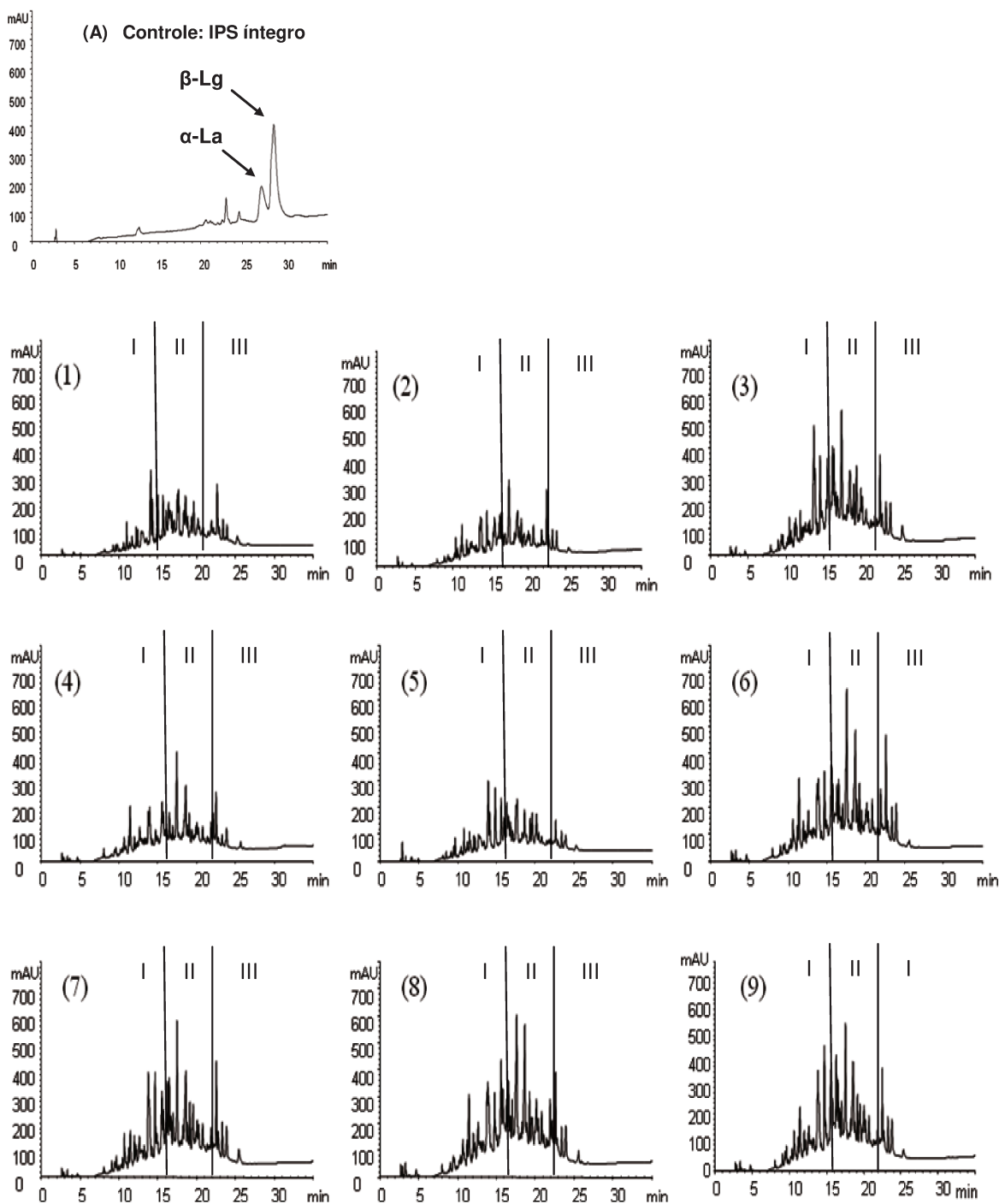


Figura 8: Cromatogramas de CLA-E-FR com detecção UV a 214 nm de hidrolisados obtidos com Alcalase livre nas condições de pH e temperatura descritas no DCCR: (1) 7,3 e 48°C; (2) 8,7 e 48°C; (3) 7,3 e 62°C; (4) 8,7 e 62°C; (5) 7,0 e 55°C; (6) 9,0 e 55°C; (7) 8,0 e 45°C; (8) 8,0 e 65°C; (9, 10 e 11) 8,0 e 55°C. Região I: alta hidrofiliicidade; região II: média hidrofiliicidade; região III: baixa hidrofiliicidade.

Nos perfis cromatográficos dos hidrolisados obtidos com Alm (Figura 9, página 49) observa-se mais picos na região de baixa hidrofiliçidade (III) em comparação aos dos hidrolisados com a enzima livre (Figura 8, página 47). Nos cromatogramas dos hidrolisados HAlm1 e HAlm7 observa-se picos referentes à α -La e β -Lg não hidrolisadas, indicando que estas condições não foram adequadas à reação com Alm e que a hidrólise foi menos eficiente que com AL. Da mesma forma que observado para a hidrólise com AL, as condições de reação também influenciaram no padrão de peptídeos liberados pela Alm. Mesmo hidrolisados com GH semelhantes mostraram diferenças no perfil cromatográfico. Os hidrolisados HAlm4, HAlm5 e HAlm6, por exemplo, todos com GH em torno de 17%, apresentaram diferenças, em especial na região III, onde HAlm4 e HAlm6 apresentaram mais picos nessa região que HAlm5.

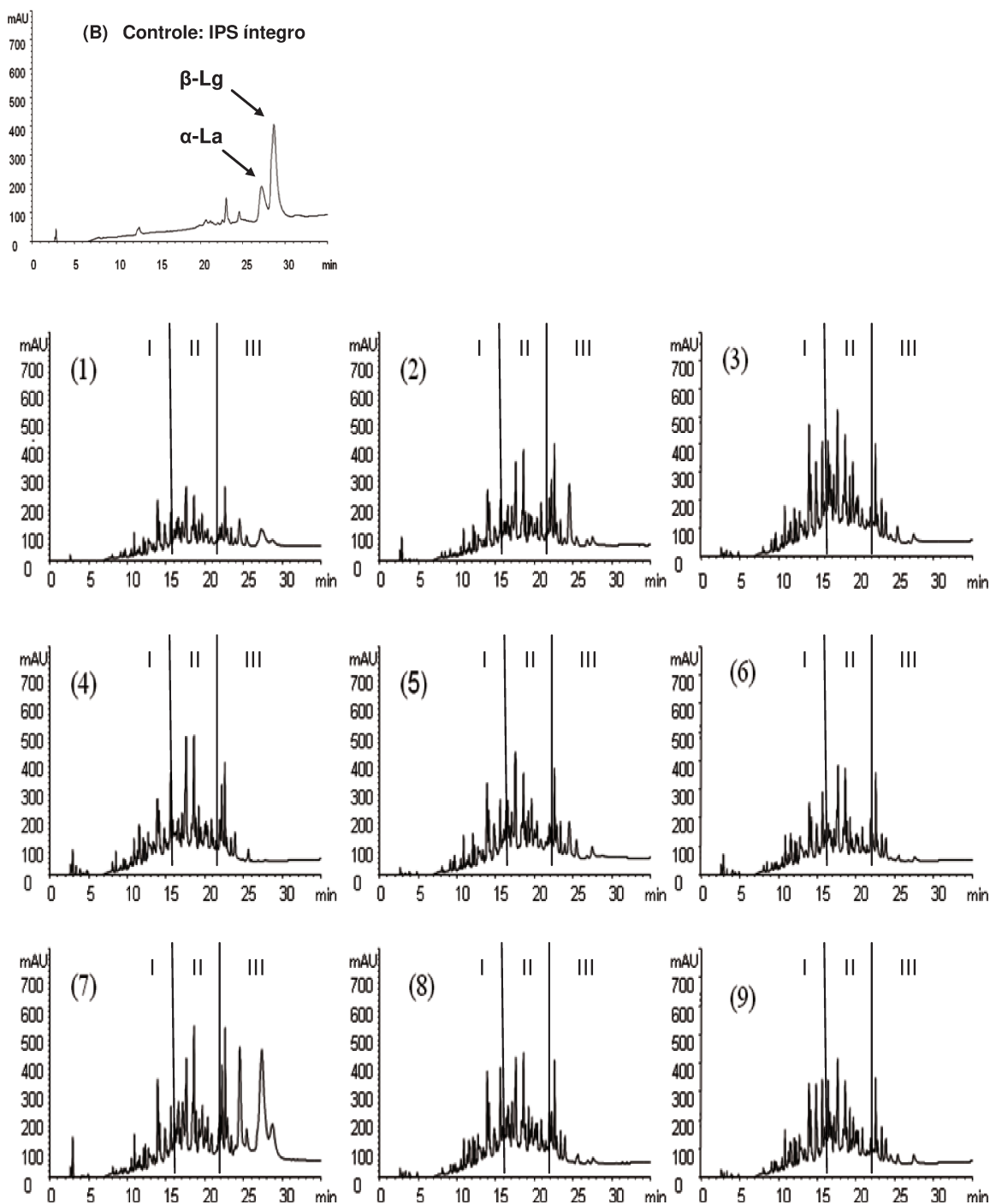


Figura 9: Cromatogramas de CLAE-FR com detecção UV a 214 nm de hidrolisados obtidos no DCCR com Alcalase imobilizada nas condições de pH e temperatura : (1) 7,3 e 48°C; (2) 8,7 e 48°C; (3) 7,3 e 62°C; (4) 8,7 e 62°C; (5) 7,0 e 55°C; (6) 9,0 e 55°C; (7) 8,0 e 45°C; (8) 8,0 e 65°C; (9, 10 e 11) 8,0 e 55°C. Região I: alta hidrofiliicidade; região II: média hidrofiliicidade; região III: baixa hidrofiliicidade.

Alguns dos hidrolisados foram selecionados para as caracterizações posteriores à CLAE-FR. Esta escolha foi direcionada para hidrolisados com perfil mais hidrofílico (eluídos na região I e II dos cromatogramas), o que sugere a presença de peptídeos de baixa MM e exclui os hidrolisados que apresentaram α -La e β -Lg não hidrolisadas, considerando que estas são características relacionadas à diminuição da antigenicidade (KANANEN, SAVOLAINEN, MÄKINEN, *et al.*, 2000). Optou-se também por hidrolisados com diferentes GH e produzidos em condições bem distintas de hidrólise (pH e temperatura). Para a comparação do desempenho da enzima na forma livre e imobilizada nas características dos hidrolisados, para cada hidrolisado escolhido, o correspondente obtido na mesma condição, porém com a enzima na outra forma (livre ou imobilizada) também foi analisado.

Uma vez que o hidrolisado HAlm8 apresentou o maior GH (22,2 %) do planejamento para a enzima imobilizada, esse hidrolisado foi escolhido para as caracterizações posteriores. O hidrolisado HAL5 apresentou GH semelhante (22,4%) ao HAlm8 e foi escolhido para permitir a comparação de hidrolisados de GH semelhantes. Já os hidrolisados obtidos no ensaio 2 com ambas as formas da enzima foram escolhidos com o objetivo de caracterizar também hidrolisados de GH menores.

5.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina)

O perfil de MM dos hidrolisados produzidos tanto com a AL quanto com a Alm foram obtidos em dois sistemas, SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina e estão apresentados na Figura 10 (Página 51).

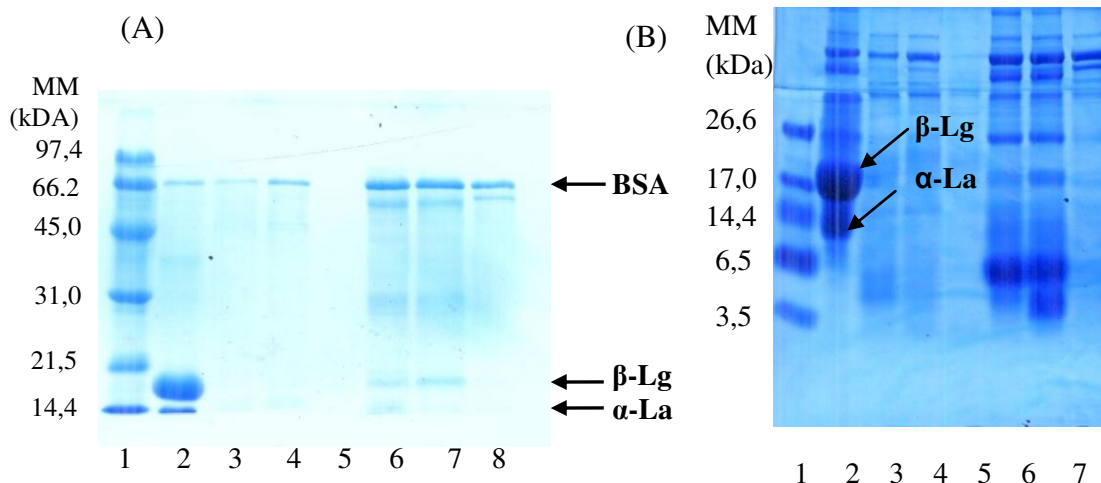


Figura 10: Perfis eletroforéticos de IPS íntegro e hidrolisados com Alcalase livre e imobilizada obtidos nos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. (A) SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12 %): (1) Padrão de massa molecular (14,4 a 97,4 kDa); (2) IPS não hidrolisado; (3) HAL2; (4) HAL5; (5) HAL8; (6) HAlm2; (7) HAlm5; (8) HAlm8. (B) SDS-PAGE/Tricina em meio redutor: (1) Padrão de massa molecular (3,5 a 26 kDa); (2) IPS não hidrolisado; (3) HAL2; (4) HAL5; (5) HAL8; (6) HAlm2; (7) HAlm5; (8) HAlm8.

Nos dois sistemas é possível observar as bandas das duas principais proteínas do IPS, β -Lg e α -La e, no sistema SDS-PAGE (Figura 10 A), observa-se também a BSA (66 kDa). Nos perfis dos hidrolisados observou-se a banda referente à BSA, porém, nos hidrolisados com Alm essas bandas estão mais intensas, o que sugere que a Alm teve mais dificuldade para hidrolisar essa proteína. Os perfis dos HAL2 e HAL5 mostraram desaparecimento quase total de β -Lg e α -La, enquanto no perfil do hidrolisado HAL8 não se detecta nenhuma banda nos dois sistemas. Isso sugere a presença apenas de peptídeos menores que 3 kDa, que podem não ter sido corados, por haver perda destes durante a fixação e/ou coloração do gel (CLAEYS, DE SMET, BALCAEN, *et al.*, 2004). Sabadin, Villas-Boas, Zollner *et al.* (2012) relataram peptídeos de MM menor que 6,5 kDa em hidrolisados de β -Lg produzidos com Alcalase livre que apresentaram cerca de 12 % de GH. Doucet, Otter, Gauthier (2003) relataram formação de peptídeos menores que 2 kDa a partir da hidrólise com Alcalase por 5 h.

Nos perfis eletroforéticos (SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina) dos hidrolisados HAlm2 e HAlm5 observa-se bandas de fraca intensidade referentes às proteínas β -Lg e α -La. É possível observar também bandas na região de MM um pouco abaixo de 66,2, de 31, 26,6 e 17 kDa, o que sugere a presença de peptídeos originários de proteínas maiores. Já o hidrolisado HAlm8 apresentou perfis semelhantes aos dos hidrolisados com a enzima livre, o que condiz com o maior GH obtido nessa condição.

5.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

A α -La (14,4 kDa) e a BSA (66 kDa) foram utilizadas como referências para avaliar a distribuição de MM aparente das amostras por cromatografia de exclusão molecular utilizando tampão fosfato de sódio 50 mmol pH 6,8 como fase móvel. A MM da BSA (66 kDa) é superior à faixa de separação da coluna (1-20 kDa) e, assim, o TR dessa proteína, 11,4 min, representa o volume morto da coluna. O TR da α -La (14,4 kDa) foi 13,4 min. Os cromatogramas dos hidrolisados encontram-se na Figura 11 (Página 53).

Nas condições da cromatografia, de forma geral, os hidrolisados com enzima livre e imobilizada apresentaram, majoritariamente, MM aparente menor que 14,4 kDa, o que está em conformidade com os resultados obtidos por SDS-PAGE/Tricina (Figura 10 B, página 51), que mostraram peptídeos com MM abaixo deste valor. Porém, os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE/Tricina) dos hidrolisados com AL indicam que estes são constituídos, principalmente, por peptídeos de MM menor que 3,5 kDa, sugerindo que picos eluídos próximos ao TR da α -La são agregados de peptídeos, formados na condição da cromatografia.

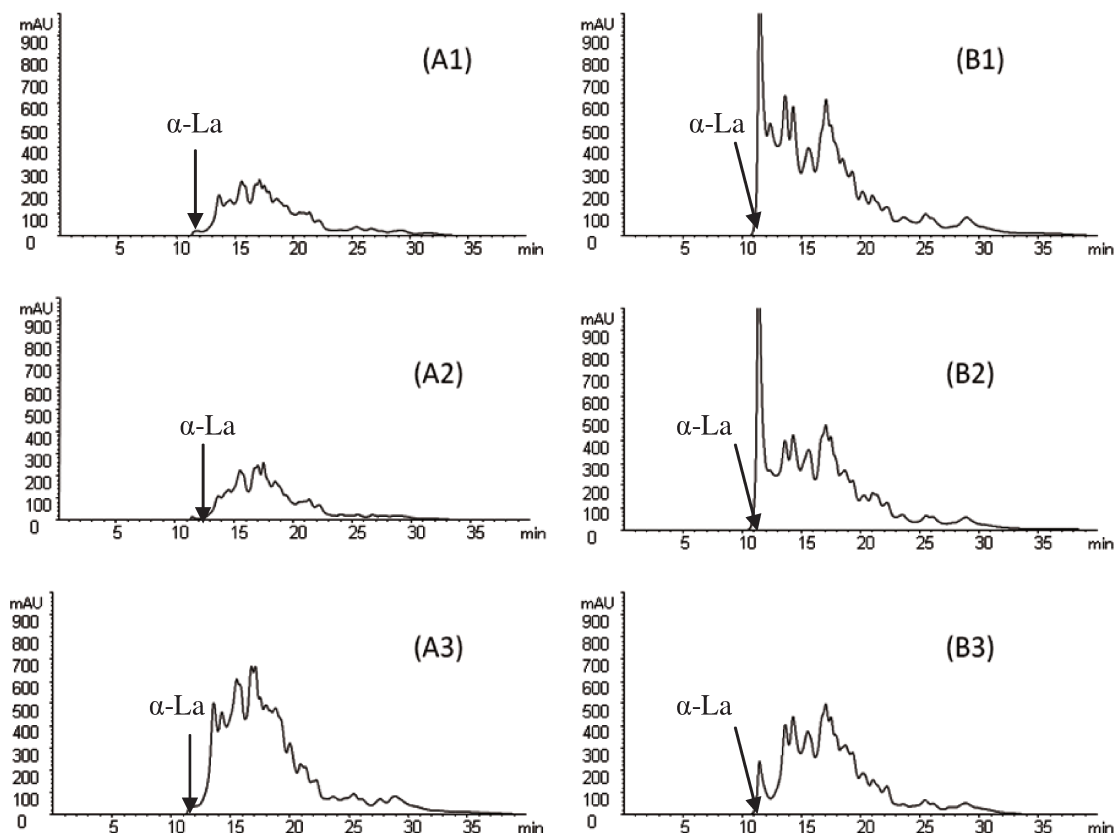


Figura 11: Cromatogramas de CLAE-EM dos hidrolisados com (A) Alcalase livre e (B) imobilizada obtidos nas condições dos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. (A1) HAL2. (A2) HAL5. (A3) HAL8. (B1) HALm2. (B2) HALm5. (B3) HALm8. Condições de análise: coluna Protein-Pak TM 60Å (7,8 mm x 300 mm), fluxo de 0,5 mL/min, fase móvel: tampão fosfato de sódio 50 mmol, pH 6,8.

Nos cromatogramas (CLAE-EM) dos hidrolisados obtidos com a Alm observa-se um pico eluído no volume morto da coluna. Esse pico pode ser referente aos peptídeos de MM aparente maiores que o tamanho de exclusão da coluna (1-20 kDa), eluídos juntamente com resíduos de BSA, pois, de acordo com o perfil eletroforético (Figura 10, página 51), essa proteína não foi totalmente hidrolisada pela Alm. De acordo com o perfil eletroforético, que mostra a MM real das frações presentes nos hidrolisados, há BSA residual também nos hidrolisados produzidos com AL, porém as bandas mostraram-se mais discretas, o que sugere a presença dessa proteína em baixa concentração nesses hidrolisados.

5.4.4 Caracterização físico-química

Hidrolisados proteicos podem apresentar diferentes características físico-químicas em função dos peptídeos formados e dos tratamentos sofridos. Sendo assim, a hidrofobicidade superficial (S_0), o ponto isoelétrico (pI) (Tabela 8, página 54) e a turbidez (Figuras 12, página 56 e 13, página 57) foram avaliados com o intuito de estimar a agregação dos hidrolisados.

Tabela 8: Hidrofobicidade superficial (S_0) e ponto isoelétrico (pI) dos hidrolisados com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HAIm) obtidos nos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR.

Hidrolisado	Condições de Hidrólise		GH (%)	Hidrofobicidade superficial (S_0)*	Ponto Isoelétrico (pI)*
	pH	T (°C)			
IPS		Íntegro		2610 ± 269,6 ^c	4-5**
HAL2	8,7	48	18,1	1300 ± 81,9 ^e	4,2 ± 0,2 ^c
HAIm2			11,4	3330 ± 70,9 ^b	4,3 ± 0,4 ^b
HAL5	7,0	55	22,4	1470 ± 88,9 ^e	3,8 ± 0,18 ^e
HAIm5			17,4	4287 ± 80,2 ^a	4,6 ± 0,8 ^a
HAL8	8,0	65	18,8	877 ± 56,9 ^f	3,6 ± 0,2 ^f
HAIm8			22,2	2100 ± 15,3 ^d	4,0 ± 0,2 ^d

*Resultados expressos em média ± desvio padrão de triplicata. Letras diferentes na mesma coluna expressam diferenças significativas ($p < 0,05$).

** Fonte: Kuipers, Alting e Gruppen (2007).

Os valores de S_0 variaram de 877 a 1470 para os hidrolisados obtidos com AL, e de 2100 a 4287 para os hidrolisados obtidos com a Alm, enquanto que a S_0 do IPS foi 2610. A hidrólise enzimática e o tratamento térmico podem alterar a S_0 e é difícil separar os dois efeitos (PANYAM e KILARA, 1996). Os valores significativamente diferentes de S_0 entre os HAL e HAIm em relação ao IPS íntegro podem estar relacionados ao padrão de hidrólise, pois as condições de hidrólise (pH e temperatura) podem afetar a conformação do substrato e, dessa forma, alterar as características dos peptídeos liberados pela ação da enzima. De

acordo com Cresout e Gruppen (2008) a presença de determinados peptídeos tais como β -Lg AB [f1-45], β -Lg AB [f90-108], α -La [f50-113] aumentam a tendência de agregação de hidrolisados proteicos.

Os valores distintos de S_0 dos hidrolisados podem estar relacionados também às diferenças na forma de interromper a reação quando se utiliza a enzima livre ou imobilizada. O aquecimento após a hidrólise para inativar a enzima livre pode ter contribuído para agregação dos peptídeos (PANYAM e KILARA, 1996), pois o aumento da temperatura favorece a formação de interações hidrofóbicas (DAMODARAN, 2010). Assim, os grupos hidrofóbicos dos HAL podem ter sido ocultos no interior dos agregados. A maior exposição de grupos hidrofóbicos nos HALm e, conseqüentemente, maior S_0 pode ser explicada pela ausência de tratamento térmico para inativar a enzima.

Os valores significativamente maiores de S_0 dos HALm, não somente em relação aos HAL, mas também ao próprio IPS podem ser também parcialmente explicados pela presença de BSA. Essa proteína não foi totalmente hidrolisada pela Alm, conforme visto no perfil eletroforético desses hidrolisados (Figura 10, página 51) e pode ter sofrido desnaturação devido às condições de hidrólise, o que possivelmente levou à exposição de seus sítios hidrofóbicos.

As diferenças de pI dos hidrolisados também podem estar associadas ao GH, pela liberação dos grupos ionizáveis α -amino e α -carboxilícos, aos diferentes padrões de hidrólise e às condições de inativação da enzima, que podem levar à diferentes exposições de cargas superficiais. O menor valor de pI foi do hidrolisado HAL8, que tem o menor valor de S_0 , o que sugere ocultação de cargas nos agregados formados.

A medida da turbidez de soluções dos hidrolisados com diferentes valores de pH, força iônica e presença de agentes desnaturantes e/ou redutores foi realizada para estimar a agregação e a contribuição de diferentes forças de interação envolvidas nessa agregação (OTTE, LOMHOLT, *et al.*, 1997). A agregação resulta na formação de partículas que dispersam a luz e fazem a solução parecer turva (HERMANSSON, 1979). A Figura 12 (Página 56) mostra a

turbidez das soluções (1 % m/v) dos hidrolisados em função do pH e concentração de NaCl. Em pH 4,0 (Figura 12 A, página 56), a turbidez de todos os hidrolisados foi maior que em pH 7,0 (Figura 12 B, página 56). Isso é devido ao ponto isoelétrico (pI) dos hidrolisados estar em torno de 4,0. No pI, como a carga líquida é nula, a repulsão eletrostática diminui, favorecendo a aproximação das cargas e aumentando as interações entre os peptídeos (MUSCHIOLIK, 1997).

De forma geral, a força iônica (0-1 M NaCl) teve efeito pouco significativo na turbidez o que sugere a baixa contribuição de interações eletrostáticas no processo de agregação dos peptídeos.

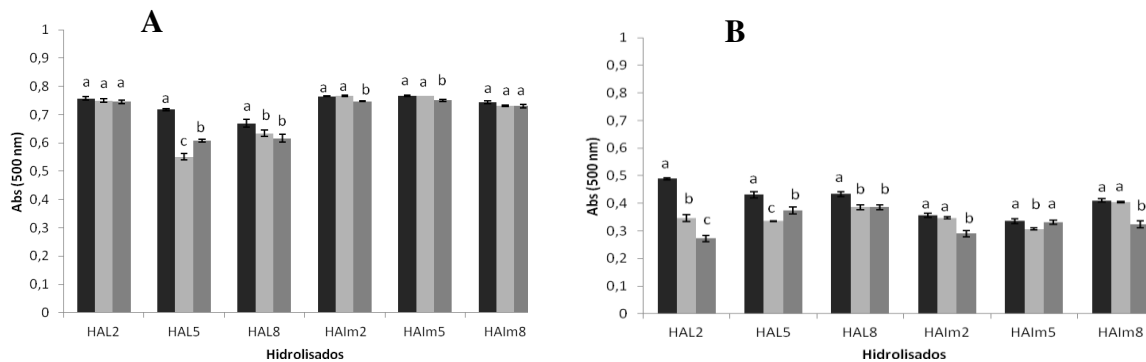


Figura 12: Turbidez (Abs 500 nm) de soluções 1 % (m/v) dos hidrolisados de isolado proteico do soro de leite com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HALm), obtidos nas condições de hidrólise dos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. Em função do pH: (A) pH 4,0 e (B) pH 7,0, e diferentes concentrações de sal (NaCl). (■) 0 M NaCl; (▒) 0,5 M NaCl; (■) 1M NaCl. Valores expressos em média \pm desvio padrão de triplicata. Letras diferentes entre as colunas de uma mesma amostra expressam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Na Figura 13 (Página 57) estão representados os valores de turbidez dos hidrolisados em diferentes solventes. De forma geral, nos dois valores de pH estudados (4,0 e 7,0), a turbidez diminuiu significativamente na presença de ureia, e, de maneira mais expressiva, na presença de SDS e SDS + β -ME em relação ao controle. Apenas na solução do hidrolisado HALm8 em pH 7,0, a adição de ureia teve efeito pouco significativo na diminuição da turbidez, sugerindo que pontes de hidrogênio têm pequena participação na estabilização dos agregados formados

nesse hidrolisado. A desestruturação de agregados pela ureia se relaciona com a alta capacidade deste agente desnaturante para formar pontes de hidrogênio (DAMODARAN, 2010). Em concentrações acima de 6 M, a ureia quebra as ligações de hidrogênio da água e essa desestruturação faz com que ela se torne um solvente melhor para resíduos apolares (DAMODARAN, 2010). Isso resulta em maior exposição e solubilização de resíduos hidrofóbicos provenientes do interior dos agregados e diminuição da turbidez (DAMODARAN, 2010). Já o SDS solubiliza os agregados proteicos pela desestabilização de interações hidrofóbicas e adição de cargas negativas à proteína. A solubilização dos hidrolisados em ureia e SDS, bem como a diminuição significativa da turbidez na presença desses agentes desnaturantes sugere que pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas estão envolvidas na formação dos agregados nos hidrolisados (OTTE, LOMHOLT, *et al.*, 1997).

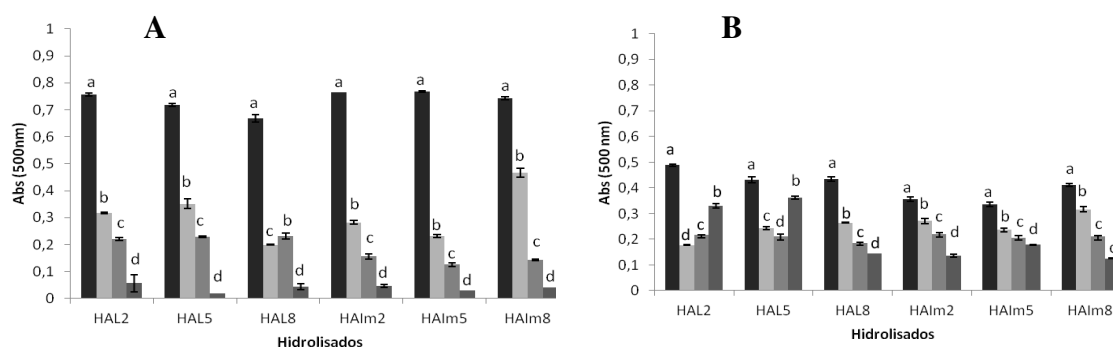


Figura 13: Turbidez (Abs 500 nm) de soluções 1 % (m/v) dos hidrolisados de isolado proteico do soro de leite com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HALm), obtidos nas condições de hidrólise dos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR. Em função do pH: (A) pH 4,0 e (B) pH 7,0, e da presença de agentes desnaturantes/redutores. (■) Controle: tampão; (■) Ureia; (■) SDS; (■) SDS + β-ME. Valores expressos em média ± desvio padrão de triplicata. Letras diferentes entre as colunas de uma mesma amostra expressam diferenças significativas ($p < 0,05$).

De forma geral, a presença de SDS no solvente diminuiu significativamente a turbidez dos agregados e, quando associado ao β-ME, essa diminuição foi ainda

maior. Isso sugere que as principais forças envolvidas na agregação dos hidrolisados tanto com AL quanto com Alm são interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto. Os agregados formados pelos hidrolisados HAL2 e HAL5 foram os únicos que apresentaram comportamento diferente, sendo que a diminuição da turbidez em pH 7,0 foi maior na presença de ureia, e não de SDS+ β -ME, o que sugere que as principais interações envolvidas na agregação desses hidrolisados nesse valor de pH são as pontes de hidrogênio.

Em pH 7,0 a presença de SDS+ β -ME teve efeito na diminuição da turbidez, porém não de forma tão evidente quanto em pH 4,0. Isso pode estar relacionado ao aumento da reatividade dos grupos tiol livre de resíduos de cisteína em pH próximos de 8,0 (pKa dos grupos SH), o que resulta na formação de novas pontes dissulfeto (ANDERSSON, 1970; TURGEON, GAUTHIER, MOLLE, *et al.*, 1992).

5.5 Detecção de proteínas alergênicas por ELISA

Imunoensaios são ferramentas adequadas para avaliar produtos hipoalergênicos, pois são altamente sensíveis e os anticorpos reconhecem proteínas específicas mesmo em matrizes alimentares compostas por diversos ingredientes (MONACI, BROHÉE, *et al.*, 2011). Em *kits* ELISA comerciais do tipo sanduíche os anticorpos de captura são, geralmente, policlonais, pois estes reconhecem um número de diferentes epítopos na proteína alvo e são menos sensíveis à pequenas mudanças (MONACI, BROHÉE, *et al.*, 2011; BETHYL, 2013). Os anticorpos policlonais são principalmente IgG, sendo esse isotipo nos *kits* utilizados no presente trabalho (TAYLOR, NORDLEE, *et al.*, 2009; BETHYL, 2013).

A Tabela 9 (Página 59) mostra a detecção de α -La e β -Lg no IPS e nos hidrolisados com AL e Alm. O IPS apresentou cerca de 13,50 % de α -La e 75,34 % de β -Lg. Este percentual está próximo do que foi obtido pela análise densitométrica do gel de eletroforese do IPS (Figura 3, página 34) onde α -La e β -Lg representaram 14,27 e 79,59 % da área total, respectivamente. A hidrólise do IPS com AL ou Alm diminuiu significativamente a concentração detectada de α -La

e β -Lg em relação ao IPS íntegro. Possivelmente epítomos que se ligam aos anticorpos utilizados foram destruídos pela hidrólise parcial (CUCU, PLATTEAU, *et al.*, 2013), o que explica a diminuição tão expressiva da detecção dos alérgenos. Cucu, Platteau, *et al.*, (2013), utilizando kits comerciais, observaram redução, aumento ou nenhuma alteração da concentração de alérgenos de avelã. Os autores associaram os resultados à destruição ou não de epítomos conformacionais e lineares pela hidrólise das proteínas de avelã e pela variação de especificidade dos anticorpos utilizados em cada um dos *kits*.

Tabela 9: Detecção de proteínas alergênicas α -La e β -Lg ($\mu\text{g}/\text{mg}$) em isolado proteico do soro de leite bovino íntegro (IPS) e hidrolisados com Alcalase livre (HAL) e imobilizada (HALm) nos ensaios 2, 5 e 8 do DCCR.

Amostra	GH (%)	α -La ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)*	β -Lg ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)*
IPS	Íntegro	135,50 \pm 0,10 ^a	753,45 \pm 0,50 ^a
HAL2	18,1	nd ^e	0,41 \pm 0,13 ^e
HAL5	22,4	nd ^e	0,20 \pm 0,11 ^f
HAL8	18,8	nd ^e	nd ^g
HALm2	11,4	1,54 \pm 0,40 ^b	32,10 \pm 0,28 ^b
HALm5	17,4	0,90 \pm 0,04 ^c	30,53 \pm 0,44 ^c
HALm8	22,2	0,24 \pm 0,1 ^d	2,49 \pm 0,03 ^d

* Resultados expressos em média \pm desvio padrão de triplicata. Letras diferentes na mesma coluna expressam diferenças significativas ($p < 0,05$). nd = não detectado na menor diluição avaliada (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Os hidrolisados produzidos com Alm apresentaram maiores concentrações das proteínas alergênicas em relação aos produzidos com AL. A alta concentração dessas proteínas detectadas nos HALm2 e HALm5 está em conformidade com o perfil eletroforético (Figura 10, página 51) desses hidrolisados, que mostrou a presença de α -La e β -Lg não hidrolisadas. O perfil cromatográfico (CLAE-FR) dos hidrolisados obtidos com Alm (Figura 9, página 49) apresentaram mais picos na

região de baixa hidrofiliçidade, sugerindo a presença de peptídeos hidrofóbicos e de maior MM, que podem ter mantido sequências específicas reconhecidas pelos anticorpos dos *kits* ELISA (DIEZ-MASA, FRUTOS e PUERTA, 2006), sendo então detectados.

Uma vez que os hidrolisados de menor GH (HALm2 e HALm5) apresentaram maiores concentrações de α -La e β -Lg, os resultados sugerem que maior GH está relacionado com a diminuição da detecção dessas proteínas. Entretanto, apenas maior GH não explica totalmente a diminuição da detecção dos alérgenos, pois no hidrolisado HALm8 a detecção de α -La e β -Lg foi maior que no HAL5, embora ambos tenham GH semelhantes, em torno de 22 %. O hidrolisado HAL2 também apresentou concentração cerca de 2 vezes maior de β -Lg que o HAL8, de GH semelhante, aproximadamente 18 %. As características dos hidrolisados como resultado das condições de hidrólise e a formação de diferentes tipos de agregados também podem ter efeito na detecção dos alérgenos (KLEBER, KRAUSE, et al., 2004b). Entre os hidrolisados com GH semelhante (HALm8 e HAL5; HAL2 e HAL8) aqueles com menor valor de S_0 , HAL5 e HAL8 tiveram menor detecção dos alérgenos. Isso sugere que os hidrolisados de menor valor de S_0 podem estar mais agregados, o que possivelmente resultou na ocultação de epítomos reconhecidos pelos anticorpos IgG utilizados nos *kits* (KLEBER, KRAUSE, et al., 2004b). Além de menor valor de S_0 , o que sugere maior agregação, os hidrolisados avaliados apresentaram agregados estabilizados por diferentes interações (item 5.4.4). O hidrolisado HAL5, por exemplo, apresentou agregados estabilizados, principalmente, por pontes de hidrogênio, enquanto os demais apresentaram agregados estabilizados por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto. Essas diferenças possivelmente resultaram em exposição de diferentes regiões dos peptídeos para reação com os anticorpos.

A detecção de alérgenos após a produção de hidrolisados com fins hipoalergênicos é considerada importante, pois aumenta a segurança de produtos alimentares oferecidos aos consumidores alérgicos (PELAEZ-LORENZO, DIEZ-MASA, et al., 2010; CUCU, PLATTEAU, et al., 2013). Durante a produção de alimentos industrializados pode ocorrer contaminação cruzada, que acarreta na

presença de alérgenos não declarados nesses produtos e é possível que ela ocorra até mesmo durante a produção de alimentos hipoalergênicos, tais como fórmulas infantis. (PELAEZ-LORENZO, DIEZ-MASA, *et al.*, 2010; CUCU, PLATTEAU, *et al.*, 2013). β -Lg foi detectada em alimentos para bebês (PELAEZ-LORENZO, DIEZ-MASA, *et al.*, 2010) e em fórmulas infantis a base de hidrolisados de caseína e soro de leite utilizando ELISA (MÄKINEN-KILJUNEN e SORVA, 1993) e imunocromatografia (DIEZ-MASA, FRUTOS, *et al.*, 2006).

No presente trabalho, embora a hidrólise tenha diminuído a detecção de α -La e β -Lg, os hidrolisados não podem ser considerados hipoalergênicos (KILARA e PANYAM, 2003; TAYLOR, NORDLEE, *et al.*, 2009). Muitas vezes, os *kits* comerciais não fornecem informação sobre a especificidade dos anticorpos utilizados, o que é de grande importância para avaliar o efeito de determinado processo na detecção dos alérgenos (CUCU, PLATTEAU, *et al.*, 2013). Portanto, análises que se baseiam na ligação de IgE específica devem ser realizadas. Dois exemplos dessas análises são: o próprio método de ELISA e o *Immunoblotting*, os quais já foram utilizados por nosso grupo de pesquisa (VILLAS-BOAS, VIEIRA, TREVIZAN, *et al.*, 2010; SABADIN, VILLAS-BOAS, ZOLLNER *et al.*, 2012; VILLAS-BOAS, FERNANDES, ZOLLNER, *et al.*, 2012).

6 Conclusões

A imobilização da protease comercial Alcalase em suporte glioxil-agarose aumentou a estabilidade térmica e a possibilidade de reuso da enzima.

O pH, na faixa estudada (7,0 a 9,0), não interferiu na atuação da Alcalase imobilizada (Alm), enquanto que temperaturas entre 60 e 65°C aumentaram o grau de hidrólise (GH). Para a Alcalase livre (AL), pH e temperatura (45 a 65 °C), nas faixas estudadas, não interferiram na atividade catalítica.

Os hidrolisados de isolado proteico de soro de leite (IPS) produzidos nas mesmas condições de pH e temperatura e utilizando AL e Alm na mesma relação enzima:substrato diferiram quanto ao perfil de hidrofiliicidade, massa molecular (MM) e características físico-químicas. Os hidrolisados produzidos com a Alm apresentaram caráter mais hidrofóbico devido possivelmente à presença de peptídeos de MM maiores e, até mesmo de proteínas não hidrolisadas.

As diferenças nas características dos hidrolisados produzidos com a AL e Alm podem estar relacionadas aos impedimentos estéricos, que configuram uma limitação quando a enzima imobilizada é utilizada para hidrólise, mas também às diferenças na forma de interromper a hidrólise. A alteração do substrato em função das condições de hidrólise (pH e temperatura) também podem ter influenciado no padrão de hidrólise e, conseqüentemente, nas características dos hidrolisados.

A hidrólise de IPS com a AL e Alm diminuiu significativamente a detecção das proteínas alergênicas α -La e β -Lg. Os hidrolisados produzidos com a Alm apresentaram maiores concentrações dos alérgenos em relação aos produzidos com a AL, possivelmente devido ao menor grau de hidrólise, bem como a presença de peptídeos maiores e mais hidrofóbicos que mantiveram sequências reconhecidas pelos anticorpos dos *kits* comerciais. Além disso, é possível que agregação provocada pelo aquecimento para inativar a AL tenha ocultado epítomos reconhecidos pelos anticorpos dos *kits*, o que resultou em menor detecção dos alérgenos nos hidrolisados produzidos com essa enzima.

7 Considerações Finais

As diferenças nas características e na detecção de α -La e β -Lg entre os hidrolisados produzidos com AL e Alm apontam para diferenças também quanto a alergenicidade. Entretanto, para maior conhecimento das características alergênicas dos hidrolisados produzidos no presente trabalho faz-se necessário mais estudos baseados na ligação de IgE específica.

Estudos adicionais do processo de imobilização podem propiciar a obtenção de enzima imobilizada que não apresente impedimentos estéricos tão marcantes, como observados no presente trabalho. Isso facilitaria a comparação das características dos hidrolisados em função, principalmente, da forma de interrupção da reação e presença da enzima.

8 Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K. L., A. H. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 2009 (Elsevier Editora)

ADLER-NISSEN, H. S. O. J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. London. 1986 (Elsevier Applied Science Publishers)

ADLEROVA, L., BARTOSKOVA, A. e FALDYNA, M. **Vet. Med.** 53: 457-468 p. 2008.

ALBRECHT, M., KÜHNE, Y., BALLMER-WEBER, B. K., *et al.* Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.124, n.2, p.328-336.e6. 2009.

ALIZADEH-PASDAR, N. e LI-CHAN, E. C. Y. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.2, 2000/02/01, p.328-334. 2000.

ANDERSSON, L.-O. Hydrolysis of disulfide bonds in weakly alkaline media II. Bovine serum albumin dimer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, v.200, n.2, p.363-369. 1970.

ASBAI. Guia prático de diagnóstico e tratamento da alergia às proteínas do leite de vaca mediada pela imunoglobulina E. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 2012.

BAKER, E. N. Lactoferrin: a multi-tasking protein par excellence. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v.62, n.22, p.2529. 2005.

BAKER, E. N., BAKER, H. M. e KIDD, R. D. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v.80, n.1, p.27. 2002.

BENJAKUL, S. e MORRISSEY, M. T. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.9, 1997/09/01, p.3423-3430. 1997.

BESLER, M. Determination of allergens in foods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.20, n.11, p.662-672. 2001.

BETHYL. Bethyl Laboratories, Inc Web site. <http://www.bethyl.com/>. Acessado em Setembro 2013.

BIASUTTI, E. A. R. **Otimização das condições de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina.** (Dissertação). Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of enzymes and cells.** Totowa. 1997 (The Humana Press Inc)

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. . **Analytical Biochemistry**, v. v. 72, p.248-254. 1976.

BRENA, B. M. B.-V., F. . Immobilization of Enzymes. In: J. M. GUISÁN (Ed.). **Immobilization of enzymes and cells.** . Towota: Bickerstaff Humana Presss Inc., 2006. Immobilization of Enzymes., p.15-30

CABRERA-PADILLA, R. Y., PINTO, G. A., GIORDANO, R. L. C., *et al.* A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. **Process Biochemistry**, v.44, n.3, p.269-276. 2009.

CALICH, V. V., C. . **Imunologia**, Editora Revinter. 2001

CHAPLIN, M. F. E. B., C. **Enzyme Technology.** Nova York, Cambridge University Press. 1990

CHEISON, S. C., LAI, M.-Y., LEEB, E., *et al.* Hydrolysis of β -lactoglobulin by trypsin under acidic pH and analysis of the hydrolysates with MALDI-TOF-MS/MS. **Food Chemistry**, v.125, n.4, p.1241-1248. 2011.

CHEISON, S. C., SCHMITT, M., LEEB, E., *et al.* Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of β -lactoglobulin: Analysis by LC-ESI-TOF/MS. **Food Chem**, v.121, n.2, p.457-467. 2010.

CLAEYS, E., DE SMET, S., BALCAEN, A., *et al.* Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity. **Meat Science**, v.67, n.2, p.281-288. 2004.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n.7, p.254-262. 2000.

CORÍCI, L. N., FRISSEN, A. E., VAN ZOELLEN, D.-J., *et al.* Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.73, n.1-4, p.90-97. 2011.

CREUSOT, N. e GRUPPEN, H. Enzyme-induced aggregation and gelation of proteins. **Biotechnology Advances**, v.25, n.6, p.597-601. 2007.

_____. Hydrolysis of whey protein isolate with *Bacillus licheniformis* protease: aggregating capacities of peptide fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.21, p.10332-10339. 2008.

CUCU, T., JACXSENS, L. e DE MEULENAER, B. Analysis To Support Allergen Risk Management: Which Way To Go? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.24, 2013/06/19, p.5624-5633. 2013.

CUCU, T., PLATTEAU, C., TAVERNIERS, I., *et al.* Effect of partial hydrolysis on the hazelnut and soybean protein detectability by ELISA. **Food Control**, v.30, n.2, p.497-503. 2013.

DAMODARAN, S. P., K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. . Porto Alegre, Atmed. 2010

DIEZ-MASA, J. C., FRUTOS, M. D. e PUERTA, A. Immunochromatographic determination of beta-lactoglobulin and its antigenic peptides in hypoallergenic formulas. 2006.

DONLON, J. Subtilisin. In: J. POLAINA e A. MACCABE (Ed.). **Industrial Enzymes**: Springer Netherlands, 2007. Subtilisin, p.197-206

DOUCET, D., GAUTHIER, S. F. e FOEGEDING, E. A. Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v.66, n.5, p.711-715. 2001.

DOUCET, D., OTTER, D. E., GAUTHIER, S. F., *et al.* Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.21, 2003/10/01, p.6300-6308. 2003.

DOWNS, M. L. e TAYLOR, S. L. Effects of Thermal Processing on the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection of Milk Residues in a Model Food Matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.18, 2010/09/22, p.10085-10091. 2010.

EHN, B.-M., ALLMERE, T., TELEMO, E., *et al.* Modification of IgE Binding to β -Lactoglobulin by Fermentation and Proteolysis of Cow's Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.9, 2005/05/01, p.3743-3748. 2005.

EMERTON, V. **Food Allergy and Intolerance: corrent issues and concerns**. , Royal Society of Chemistry. 2002

EMI, S., MYERS, D. V. e IACOBUCCI, G. A. Purification and properties of the thermostable acid protease of *Penicillium duponti*. **Biochemistry**, v.15, n.4, p.842-848. 1976.

EUROPEAN COMMISSION. **Rapid Alert System for Food and Feed**. Brussels, Belgium. 2012

EUROPEAN UNION, COMMISSION DIRECTIVE 2007/68/EC. **Official Journal of the European Union** 2007.

ESPINOZA, A. D., MORAWICKI, R. O. e HAGER, T. Hydrolysis of whey protein isolate using subcritical water. **Journal of Food Science**, v.77, n.1, p.C20-C26. 2012.

GREER, F. R., SICHERER, S. H., BURKS, A. W., *et al.* Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: The role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. **Pediatrics**, v.121, n.1, January 2008, p.183-191. 2008.

GROLEAU, P. E., MORIN, P., GAUTHIER, S. F., *et al.* Effect of physicochemical conditions on peptide-peptide interactions in a tryptic hydrolysate of beta-lactoglobulin and identification of aggregating peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.15, p.4370. 2003.

GUISÁN, J., BASTIDA, A., BLANCO, R., *et al.* Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose. In: G. BICKERSTAFF (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**: Humana Press, v.1, 1997a. Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose, p.277-287. (Methods in Biotechnology)

GUISÁN, J., PENZOL, G., ARMISEN, P., *et al.* Immobilization of Enzymes Acting on Macromolecular Substrates. In: G. BICKERSTAFF (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**: Humana Press, v.1, 1997. Immobilization of Enzymes Acting on Macromolecular Substrates, p.261-275. (Methods in Biotechnology)

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, n.6, p.375-382. 1988.

GUISÁN, J. M. E. A. Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment. In: G. BICKERSTAFF (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**: Humana Press, 1997c. Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment, p.289-298. (Methods in Biotechnology)

GUO, X., ZHANG, J., MA, Y., *et al.* Optimization of limited hydrolysis of proteins in rice residue and characterization of the functional properties of the products. **Journal of Food Processing and Preservation**. 2012.

HEINE, R. G., ELSAYED, S., HOSKING, C. S., *et al.* Cow's milk allergy in infancy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v.2, n.3, p.217-225. 2002.

HELM, R. M. e BURKS, A. W. Mechanisms of food allergy. **Current Opinion in Immunology**, v.12, n.6, p.647-653. 2000.

HERMANSSON, A. M. Aggregation and Denaturation Involved in Gel Formation. In: (Ed.). **Functionality and Protein Structure**: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, v.92, 1979. Aggregation and Denaturation Involved in Gel Formation, p.81-103. (ACS Symposium Series)

HOLZHAUSER, T., STEPHAN, O. e VIETHS, S. Detection of Potentially Allergenic Hazelnut (*Corylus avellana*) Residues in Food: A Comparative Study with DNA PCR-ELISA and Protein Sandwich-ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.21, 2002/10/01, p.5808-5815. 2002.

HORWITZ, W. L. G. W. A. O. O. A. C. I. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg (Maryland), AOAC International. 2006.

HUANG, F. e KIM, J. IgE-Mediated cow's milk allergy in children. **Current Allergy and Asthma Reports**, v.12, n.6, 2012/12/01, p.630-640. 2012.

INTERNATIONAL, A. O. O. A. C. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg (Maryland), AOAC-Association of Official Analytical Chemists International. 2006.

ISGROVE, F. H., WILLIAMS, R. J. H., NIVEN, G. W., *et al.* Aqueous two-phase systems: a novel approach for the separation of proteose peptones. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.711, n.1-2, p.91-96. 1998.

IZQUIERDO, F. J., PEÑAS, E., BAEZA, M. L., *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.

JÄRVINEN, K. M., CHATCHATEE, P., BARDINA, L., *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.

JAUREGI, P. e WELDERUFAEL, F. Added-value protein products from whey. **Nutrafoods**, v.9, n.4, p.13-23. 2010.

KANANEN, A., SAVOLAINEN, J., MÄKINEN, J., *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.

KARAMOKO, G., DANTHINE, S., OLIVE, G., *et al.* Interfacial and foaming properties of two types of total proteose-peptone fractions. **Food and Bioprocess Technology**, p.1-9. 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes — learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, v.11, n.11, p.471-478. 1993.

KATTAN, J. D., COCCO, R. R. e JÄRVINEN, K. M. Milk and soy allergy. **Pediatric Clinics of North America**, v.58, n.2, p.407-426. 2011.

KHUDA, S., SLATE, A., PEREIRA, M., *et al.* Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: dark chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.17, 2012/05/02, p.4204-4211. 2012.

KILARA, A. e PANYAM, D. Peptides from milk proteins and their properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.6, 2003/10/01, p.607-633. 2003.

KLEBER, N., KRAUSE, I., ILLGNER, S., *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. 2004a.

_____. The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research and Technology**, v.219, n.2, 2004/07/01, p.105-110. 2004b.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Adv Appl Microbiol**, v.29, p.1-28. 1983.

KNEEPKENS, C. M. F. e MEIJER, Y. Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. **European Journal of Pediatrics**, v.168, n.8, 2009/08/01, p.891-896. 2009.

KNIPPING, K., VAN ESCH, B. C. A. M., VAN IEPEREN-VAN DIJK, A. G., *et al.* Enzymatic treatment of whey proteins in cow's milk results in differential inhibition of IgE-mediated mast cell activation compared to T-cell activation. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.159, n.3, p.263-270. 2012.

KRISSANSEN, G. W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **Journal of the American College of Nutrition**, v.26, n.6, p.713S-723S. 2007.

KRSKA, R., WELZIG, E. e BAUMGARTNER, S. Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, n.1, p.63-65. 2004.

KUIPERS, B. J. H., ALTING, A. C. e GRUPPEN, H. Comparison of the aggregation behavior of soy and bovine whey protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v.25, n.6, p.606-610. 2007.

KUMAR, S., VERMA, A. K., DAS, M., *et al.* Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. **International Immunopharmacology**, v.13, n.4, p.432-439. 2012.

LACORN, M. e IMMER, U. Standardization in allergen determination. **Accreditation and Quality Assurance**, v.15, n.4, 2010/04/01, p.207-216. 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

LI, J., DING, X., CHEN, Y., *et al.* Determination of bovine lactoferrin in infant formula by capillary electrophoresis with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v.1244, n.0, p.178-183. 2012.

MADADLOU, A., SHEEHAN, D., EMAM-DJOMEH, Z., *et al.* Ultrasound-assisted generation of ACE-inhibitory peptides from casein hydrolyzed with nanoencapsulated protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.11, p.2112-2116. 2011.

MADUREIRA, A. R., TAVARES, T., GOMES, A. M. P., *et al.* Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.2, p.437-455. 2010.

MÄKINEN-KILJUNEN, S. e SORVA, R. Bovine β -lactoglobulin levels in hydrolysed protein formulas for infant feeding. **Clinical & Experimental Allergy**, v.23, n.4, p.287-291. 1993.

MATEO, C., GRAZU, V., PALOMO, J. M., *et al.* Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v.2, n.5, p.1022-1033. 2007a.

MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n.6, p.1451-1463. 2007b.

MATEO, C., PALOMO, J. M., FUENTES, M., *et al.* Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.274-280. 2006.

MONACI, L., BROHÉE, M., TREGOAT, V., *et al.* Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. **Food Chemistry**, v.127, n.2, p.669-675. 2011.

MONACI, L., TREGOAT, V., HENGEL, A., *et al.* Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, v.223, n.2, 2006/06/01, p.149-179. 2006.

MORENO, F. J., MACKIE, A. R. e MILLS, E. N. Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.25, p.9810-9816. 2005.

MORISAWA, Y., KITAMURA, A., UJIHARA, T., *et al.* Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins. **Clinical and Experimental Allergy**, v.39, n.6, p.918-925. 2009.

MUSCHIOLIK, G. Methods of testing protein functionality. Edited by G. M. Hall. XII and 265 pages, numerous figures and tables. Blackie Academic & Professional, London 1996. **Food / Nahrung**, v.41, n.1, p.55-55. 1997.

NEGRONI, L. B., H.; CLEMENT, G.; CHATEL, J. M.; BRUNE, P.; FROBERT, Y.; WAL, J. M. ; GRASSI, J. Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured β -lactoglobulin. **Journal of Immunological Methods**, p.25-37. 1998.

OTTE, J., LOMHOLT, S. B., IPSEN, R., *et al.* Aggregate Formation during hydrolysis of β -Lactoglobulin with a Glu and Asp specific protease from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.12, 1997/12/01, p.4889-4896. 1997.

PANCHAUD, A., AFFOLTER, M. e KUSSMANN, M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. **Journal of Proteomics**, v.75, n.12, p.3546-3559. 2012.

PANYAM, D. e KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.4, p.120-125. 1996.

PEDROCHE, J., DEL MAR YUST, M., MATEO, C., *et al.* Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n.5, p.1160-1166. 2007.

PELAEZ-LORENZO, C., DIEZ-MASA, J. C., VASALLO, I., *et al.* Development of an optimized ELISA and a sample preparation method for the detection of β -

lactoglobulin traces in baby foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.3, 2010/02/10, p.1664-1671. 2010.

PELEGRINE, D. H. G. e GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, n.1, p.77-80. 2005.

PEÑAS, E., SNEL, H., FLORIS, R., *et al.* High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.969-975. 2006.

POMS, K., ANKLAM. Methods for allergen analysis in food: a review. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n.1, p.1-31. 2004.

POULIOT, Y., GUY, M. M., TREMBLAY, M., *et al.* Isolation and characterization of an aggregating peptide from a tryptic hydrolysate of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.3760-3764. 2009.

PUERTA, A., DIEZ-MASA, J. C. e DE 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.

RESTANI, P., BALLABIO, C., LORENZO, C., *et al.* Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, n.1, 2009/09/01, p.47-56. 2009.

RESTANI, P., UBERTI, F., TARANTINO, C., *et al.* Collaborative interlaboratory studies for the validation of ELISA methods for the detection of allergenic fining agents used in wine according to the criteria of OIV Resolution 427–2010 Modified by OIV–Comex 502–2012. **Food Analytical Methods**, v.7, n.3, 2014/03/01, p.706-712. 2014.

RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas. 2009

SABADIN, I., VILLAS-BOAS, M., ZOLLNER, R. L., *et al.* Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on β -lactoglobulin antigenicity. **European Food Research and Technology**, v.235, n.5, p.801-809. 2012.

SCHUBERT-ULLRICH, P., RUDOLF, J., ANSARI, P., *et al.* Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, n.1, p.69-81. 2009.

SÉLO, CLÉMENT, BERNARD, *et al.* Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clinical & Experimental Allergy**, v.29, n.8, p.1055-1063. 1999.

SEVERIN, S. e XIA, W. S. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v.30, n.1, p.77-97. 2006.

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

SGARBIERI, W. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo, Livraria Varela. 1996

SHARMA, S., KUMAR, P., BETZEL, C., *et al.* Structure and function of proteins involved in milk allergies. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.756, n.1-2, p.183-187. 2001.

SICHERER, S. H. Food allergy. **The Lancet**, v.360, n.9334, p.701-710. 2002.

SOBRAL, K. A., RODRIGUES, R. O., OLIVEIRA, R. D., *et al.* Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextrin-glycosyltransferase. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v.108, n.1-3, p.809-820. 2003.

SOUSA JR, R., LOPES, G. P., TARDIOLI, P. W., *et al.* Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.21, p.147-153. 2004.

SOUSA JR, R., RESENDE, M. M., GIORDANO, R. L. C., *et al.* Hybrid model for an enzymatic reactor: Hydrolysis of cheese whey proteins by alcalase immobilized in agarose gel particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v.106, n.1-3, p.413-422. 2003.

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

STEPHAN, O. e VIETHS, S. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.12, 2004/06/01, p.3754-3760. 2004.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando**

Carboxipeptidase A e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose. (Tese). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003a.

TARDIOLI, P. W., PEDROCHE, J., GIORDANO, R. L. C., *et al.* Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v.19, n.2, p.352-360. 2003b.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.90, n.0, p.1-11. 2013.

TAYLOR, S., NORDLEE, J., NIEMANN, L., *et al.* Allergen immunoassays—considerations for use of naturally incurred standards. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, n.1, 2009/09/01, p.83-92. 2009.

TSUGITA, A. e SCHEFFLER, J.-J. A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. **European Journal of Biochemistry**, v.124, n.3, p.585-588. 1982.

TURGEON, S. L., GAUTHIER, S. F., MOLLE, D., *et al.* Interfacial properties of tryptic peptides of β -lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.4, 1992/04/01, p.669-675. 1992.

UDENIGWE, C. C. e ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v.77, n.1, p.R11-R24. 2012.

VAN HENGEL, A. J. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, n.1, p.111-118. 2007.

VILLAS-BOAS, M. B., FERNANDES, M. A., ZOLLNER, R. L., *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.

VILLAS-BOAS, M. B., VIEIRA, K. P., TREVIZAN, G., *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.

WAHN, U., WAHL, R. e RUGO, E. Comparison of the residual allergenic activity of six different hydrolyzed protein formulas. **The Journal of Pediatrics**, v.121, n.5, Part 2, p.S80-S84. 1992.

WAL, J.-M. Bovine milk allergenicity. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v.93, n.5, Supplement 3, p.S2-S11. 2004.

WAL, J. M. Structure and function of milk allergens. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, Supplement**, v.56, n.67, p.35-38. 2001.

WANG, J. S., H. A. Food Allergy. **Science in Medicine**. 2011.

WANG, X., WANG, L., CHENG, X., *et al.* Hypertension-attenuating effect of whey protein hydrolysate on spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v.134, n.1, p.122-126. 2012.

WEFFORT, V. R. S. L., J. A. . **Nutrição em Pediatria: da neonatologia à adolescência**. São Paulo, Manole. 2009

WRÓBLEWSKA, B., JĘDRYCHOWSKI, L., HAJÓS, G., *et al.* Influence of alcalase and transglutaminase on immunoreactivity of cow milk whey proteins. **Czech Journal of Food Sciences**, v.26, n.1, p.15-23. 2008.

WRÓBLEWSKA, B., KARAMAĆ, M., AMAROWICZ, R., *et al.* Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, n.8, p.839-850. 2004.

YUST, M. D. M., PEDROCHE, J., MILLÁN-LINARES, M. D. C., *et al.* Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, v.122, n.4, p.1212-1217. 2010.

ZHAO, J., HUANG, G. R., ZHANG, M. N., *et al.* Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant stability of shrimp processing byproduct hydrolysate. **American Journal of Food Technology**, v.6, n.10, p.904-913. 2011.

ZHENG, H., SHEN, X., BU, G., *et al.* Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by Alcalase. **International Dairy Journal**, v.18, n.10-11, p.1028-1033. 2008.

ZHONG, J., LIU, C., LIU, W., *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.