



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

**EFEITO DA POLIMERIZAÇÃO POR TRANSGLUTAMINASE E DA
PROTEÓLISE NA ESTRUTURA E ANTIGENICIDADE
DA β -LACTOGLOBULINA**

Autora: MARIANA BATTAGLIN VILLAS BÔAS
Orientadora: Profa Dra. FLAVIA MARIA NETTO

CAMPINAS, 2012



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

**EFEITO DA POLIMERIZAÇÃO POR TRANSGLUTAMINASE E DA
PROTEÓLISE NA ESTRUTURA E ANTIGENICIDADE
DA β -LACTOGLOBULINA**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos / Unicamp para obtenção do título de doutora em Alimentos e Nutrição, na área de concentração Nutrição Experimental aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Mariana Battaglin Villas Bôas, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pela Profa. Dra. Flavia Maria Netto.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

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

Villas Bôas, Mariana Battaglin, 1981-V713e
Efeito da polimerização por transglutaminase e da
proteólise na estrutura e antigenicidade da beta-
lactoglobulina / Mariana Battaglin Villas-Boas. --
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Proteínas do soro do leite. 2. Ligações cruzadas.
3. Hidrólise. 4. Alergia alimentar. 5. Epítomos. I.
Netto, Flavia Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Effect of polymerization by transglutaminase and proteolysis on the structure of
beta-lactoglobulin and its antigenicity

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Whey proteins

Cross-link

Hydrolysis

Food allergy

Epitopes

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

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Adriana Franco Paes Leme

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Marilde Terezinha Bordignon Luiz

Ricardo de Lima Zollner

Data da defesa: 12-07-2012

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flavia Maria Netto
(Orientadora)

Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme
(Membro)

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
(Membro)

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz
(Membro)

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
(Membro)

Prof. Dr. Gabriel Hessel
(Suplente)

Profa. Dra. Adriane E. Antunes de Moraes
(Suplente)

Prof. Dr. Iván Lopez-Expósito
(Suplente)

Campinas, de de 2012.

Dedico

*Ao Alexandre e
Aos meus queridos pais, Gelson e Araci.
Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida.

À Profa. Dra. Flavia Maria Netto, pela oportunidade, orientação e confiança durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela orientação e confiança.

Aos demais professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade e importantes sugestões e considerações para o trabalho.

A minha linda família. Ao Alexandre, esposo e amigo. Por todo o amor e apoio incondicional. Obrigada por fazer parte da minha vida. Teu sucesso é o meu sucesso. Nova etapa, amor de sempre. Aos meus amados pais, Gelson e Araci, pela vida que me proporcionaram, com muito amor e constante apoio. Aos meus queridos irmãos, Fabrício e Lucas, aos meus sobrinhos lindos: Hellena, Isabella, Pedro, Eduardo e Murilo. Aos queridos Maria e Valdir. Aos cunhados e amigos Viviane, Jeniffer, Denise e Fábio. Às queridas tias: Clélia e Iracema. Muito obrigada por tudo! Amo todos vocês!

As amigas do LBN e companheiras de trabalho: Eliana, Bete, Fernanda, Célia, Elisa, Janaína, Milena, Cássia, Danilo, Tássia e Lucia de la Hoz por todo o trabalho realizado, apoio e amizade.

Às amigas Carol Pazi, Aline, Isabelle, Cinthia Betim, Jane e Daniella, pelos lindos e divertidos momentos e por todo o apoio e incentivo.

Aos técnicos e amigos do DEPAN Chico, Fátima, Susana e Lia, por todo o apoio, amizade e alegria.

A todos os professores, amigos e funcionários do DEPAN que tive o prazer de conhecer e que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos companheiros de trabalho e amigos do LIAE, Conceição, Meg, Celso, Regiane, Denise, Talita, Dani, Nayara, Luís e Natália, e também Karla e Giovana.

Aos amigos de sempre: Marielle, Carol, Bia, Dani, Carol (Amora), Marina (Fundí), Silvania (Indaiá) pelo apoio e momentos compartilhados.

Ao Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – FCM/UNICAMP, pelo suporte nas análises de imunologia.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, CPNEM – ABTLus, Campinas/SP, pelo suporte nas análises de espectrometria de massas.

Ao Instituto de Investigação de Ciências de Alimentos (CIAL, CSIC, UAM, Madri, Espanha), em especial à Profa. Dra. Elena Molina, pelo suporte nas análises de digestão *in vitro*, imunologia e espectrometria de massas desenvolvidas durante período de estágio sanduíche no exterior.

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

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

À Prozyn, pela gentileza no fornecimento da enzima bromelina, para o desenvolvimento do trabalho.

À Novozymes, pela gentileza no fornecimento das enzimas Alcalase e Neutrase, para o desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida e auxílio pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão de auxílio pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades”.*

Luís Vaz de Camões (In “Sonetos”)

*...Pela janela passa uma borboleta
Cores, furta cores...multi cores..
Veja as cores!*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 Proteínas do leite	24
3.2 Alergia às proteínas do leite.....	26
3.3 Detecção e quantificação da resposta antigênica e epítomos na proteína.....	31
3.4 Estratégias para redução da antigenicidade de proteínas	33
3.4.1 Tratamento térmico.....	33
3.4.2 Hidrólise enzimática.....	35
3.4.3 Uso da enzima transglutaminase.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Determinação da atividade enzimática.....	45
4.2 Hidrólise da β -Lg	46
4.4 Polimerização pré hidrólise	48
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS/tricina (SDS-PAGE/Tricina).....	48
4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE/FR)	49
4.7 Avaliação da massa intacta por espectrometria de massas.....	50
4.8 Avaliação do cross-link - determinação do dipeptídeo (- ϵ -(γ -Glu)Lys)	51
4.9 Avaliação da Antigenicidade	52
4.9.1 Obtenção do anticorpo (IgE anti- β Lg).....	52
4.9.2 Ensaio de ELISA – Atividade de ligação de IgE	53
4.9.3 Resposta de IgE avaliada por Imunoblote	54
4.10 Digestão <i>in vitro</i>	55
4.10.1 Simulação da digestão gástrica.....	55

4.10.2	Simulação da digestão duodenal.....	55
4.11	Análise dos digeridos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS ion trap)	56
4.12	Análise <i>in silico</i> do grau de antigenicidade <i>versus</i> peptídeos da β -lg ...	57
4.13	Análise Estatística.....	57
5.	NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS.....	58
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1	Obtenção e Caracterização dos Hidrolisados	59
6.2	Obtenção e caracterização dos hidrolisados e polimerizados pós hidrólise..	64
6.3	Obtenção e caracterização dos polimerizados pré-hidrólise.....	71
6.4	Avaliação do cross-link.....	79
6.5	Avaliação da antigenicidade.....	85
6.5.1	Ensaio de ELISA – Atividade de ligação de IgE	85
6.5.2.	Análise de IgE por Immunoblot.....	87
6.6	Simulação da digestão gastrointestinal.....	91
6.7	Análise dos peptídeos e identificação de epítomos nos digeridos gástricos e gastrointestinais.....	99
7.	CONCLUSÕES.....	140
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142
	ANEXO 1.....	157

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Classificação das reações adversas ao leite bovino. 27
- Figura 2.** Estrutura tridimensional e seqüência primária da β -Lg. Em negrito estão destacados os epítomos de maior reatividade para IgE. Fonte: RCSB PDB protein data bank. 29
- Figura 3.** Reações catalisadas pela transglutaminase. Fonte: Sharma et al. (2002) (adaptado). 39
- Figura 4.** Possível mecanismo de ação catalisada pela transglutaminase após tratamento da proteína com agente redutor, na formação de estruturas protéicas mais compactas (adaptado de EISSA & KHAN, 2006). 41
- Figura 5.** Fluxograma geral do experimento. 44
- Figura 6.** Curva padrão de tirosina para determinação da atividade enzimática da alcalase, neutrase e bromelina. 45
- Figura 7.** Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais. 53
- Figura 8.** Superfície de resposta para a resposta GH da β -Lg em função da concentração de Substrato ([S]) e relação enzima-substrato (E/S). (a) hidrólise com alcalase; (b) hidrólise com neutrase; (c) hidrólise com bromelina. 63
- Figura 9.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE/tricina), em meio redutor da β -Lg nativa, β -Lg hidrolisada com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina e hidrolisados polimerizados com TG (10 ou 25 U g⁻¹ de proteína). Colunas: (1) Padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg; (3) β -Lg /alcalase; (4) β -Lg alcalase/10 TG; (5) β -Lg alcalase/25TG; (6) β -Lg/neutrase; (7) β -Lg neutrase /10 TG; (8) β -Lg neutrase /25 TG; (9) β -Lg/bromelina; (10) β -Lg bromelina/10 TG; (11) β -Lg bromelina /25 TG. 64
- Figura 10.** Cromatogramas de CLAE-FR com detecção UV a 214 nm de hidrolisados da β -Lg nativa, hidrolisados com alcalase, neutrase ou bromelina e hidrolisados submetidos à polimerização com TG (polimerização pós hidrólise). (A) β -Lg/alcalase; (B) β -Lg alcalase/10TG; (C) β -Lg alcalase/ 25 TG; (D) β -Lg/neutrase; (E) β -Lg neutrase/10 TG; (F) β -Lg neutrase/25TG; (G) β -Lg/bromelina; (H) β -Lg bromelina/10TG; (I) β -Lg bromelina/25TG. Região I: alta hidrofiliçidade, região II: média hidrofiliçidade, região III: baixa hidrofiliçidade. 67
- Figura 11.** (A) Espectro de massas da β -Lg nativa detectado por MS-QTOF/ESI; (B) Deconvolução do espectro de massas (A) com identificação da massa molecular da β -Lg variantes A e B. 69
- Figura 12.** Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor da β -Lg nativa, β -Lg polimerizada com TG (β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG) e polímeros hidrolisados com as diferentes proteases (polimerização pré hidrólise). Colunas (1) padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg nativa; A – (3) β -Lg TT

- TG/alcalase; (4) β -Lg Cys TG /alcalase; B - (3) β -Lg TT TG/neutrase; (4) β -Lg Cys TG/neutrase; C - (3) β -Lg TT TG/ bromelina; (4) β -Lg Cys TG/bromelina; polimerizados não hidrolisados (5) β -Lg TT TG e (6) β -Lg Cys TG. 72
- Figura 13.** Cromatogramas de CLAE-FR com detecção UV a 214 nm de polimerizados da β -Lg submetidos à hidrólise com alcalase, neutrase ou bromelina (polimerização pré hidrólise). (A) β -Lg TT TG/alcalase; (B) β -Lg Cys TG/alcalase; (C) β -Lg TT TG/neutrase; (D) β -Lg Cys TG/neutrase; (E) β -Lg TT TG/bromelina; (F) β -Lg Cys TG/bromelina. Região I: alta hidrofiliçidade, região II: média hidrofiliçidade, região III: baixa hidrofiliçidade. 74
- Figura 14.** Identificação da massa molecular das amostras (A) β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG (β -Lg TT TG) e (B) β -Lg polimerizada com TG na presença de Cys (β -Lg Cys TG) obtidas após deconvolução dos espectros de massas correspondentes, por MS-QTOF/ESI. 76
- Figura 15.** Cromatograma de CLAE-FR com detecção por fluorescência (excitação a 334 nm e emissão a 440 nm). Padrão de referência para o dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys (A) e identificação da ligação ϵ -(γ -Gln)Lys nas amostras polimerizadas com TG: Blg TT TG (B) e Blg Cys TG (C). A flecha indica o pico correspondente ao dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys..... 80
- Figura 16.** Cromatograma de CLAE (detecção por fluorescência, Ex 334 nm / Em 440 nm). Identificação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys nas amostras tratadas com TG. (A) β -Lg alcalase /10 TG; (B) β -Lg alcalase /25 TG; (C) β -Lg TT TG/alcalase; (D) β -Lg Cys TG/alcalase; (E) β -Lg bromelina/10 TG (F) β -Lg bromelina/25 TG; (G) β -Lg TT TG/bromelina; (H) β -Lg Cys TG/bromelina; (I) β -Lg neutrase/10TG (J) β -Lg neutrase/25 TG; (K) β -Lg TT TG/neutrase; (L) β -Lg Cys TG/neutrase. A flecha indica o pico correspondente ao dipeptídeo... 81
- Figura 17.** Reatividade de IgE específica de pool dos soros dos animais sensibilizados com β -Lg nativa frente às amostras hidrolisadas com alcalase, neutrase ou bromelina pré e pós polimerização com TG. A - (1) β -Lg; (2) β -Lg/alcalase; (3) β -Lg alcalase/ 10TG; (4) β -Lg TT TG/alcalase; (5) β -Lg Cys TG/alcalase, (6) β -Lg TT TG; (7) β -Lg Cys TG. B - (1) β -Lg; (2) β -Lg/neutrase; (3) β -Lg neutrase/10TG; (4) β -Lg TT TG/neutrase; (5) β -Lg Cys TG/neutrase; (6) β -Lg/bromelina; (7) β -Lg bromelina/10TG; (8) β -Lg TT TG/bromelina; (9) β -Lg Cys TG/bromelina. 88
- Figura 18.** Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 220 nm dos digeridos gástricos e duodenais da (A) β -Lg nativa; (B) β -Lg TT TG; (C) β -Lg Cys TG.. 92
- Figura 19.** Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 220 nm dos digeridos gástricos e duodenais da (A) β -Lg/alcalase; (B) β -Lg TT TG/alcalase; (C) β -Lg Cys TG/alcalase; (D) β -Lg alcalase/10TG 95
- Figura 20.** Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 220 nm dos digeridos gástricos e duodenais da (A) β -Lg/bromelina; (B) β -Lg TT TG; (C) β -Lg Cys TG/bromelina; (D) β -Lg bromelina/10TG..... 97

- Figura 21.** Análise *in silico* referente ao grau de antigenicidade dos peptídeos liberados após hidrólise da β -Lg (CLC-bio *software*). 100
- Figura 22.** Espectro de MS (A) e MS/MS (B) correspondente ao peptídeo Tyr₄₂–Leu₅₄ identificado após digestão péptica da β -Lg nativa. 101
- Figura 23.** Sequência primária da β -Lg variante A. A substituição do aminoácido Asp por Gly (posição 54) e Val por Ala (posição 118) caracteriza a β -Lg variante B. (Fonte Biotools *software*, versão 3.2, Bruker Daltonik). 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal média do leite humano e bovino.	28
Tabela 2. Valores utilizados no DCCR para hidrólise da β -Lactoglobulina com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina.	46
Tabela 3. Matriz do delineamento e resposta grau de hidrólise (GH %) da β -Lg..	59
Tabela 4. Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com a enzima alcalase	60
Tabela 5. Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com a enzima neutrase.	60
Tabela 6. Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com a enzima bromelina.	60
Tabela 7. Análise de ANOVA para o grau de hidrólise da β -Lactoglobulina obtido com alcalase.	62
Tabela 8. Análise de ANOVA para o grau de hidrólise da β -Lactoglobulina obtido com neutrase.	62
Tabela 9. Análise de ANOVA para o grau de hidrólise da β -Lactoglobulina obtido com Bromelina.	62
Tabela 10. Análise da massa intacta (MM), por espectrometria de massas (MS-QTOF/ESI), das amostras polimerizadas pós hidrólise com alcalase, bromelina ou neutrase.....	70
Tabela 11. Análise da massa intacta (MM), obtida por espectrometria de massas (MS-QTOF/ESI), das amostras polimerizadas pré hidrólise e aquelas somente polimerizadas.	78
Tabela 12. Quantificação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys nas amostras polimerizadas com transglutaminase pré ou pós hidrólise com as enzima alcalase, neutrase ou bromelina.	82
Tabela 13. Resposta de IgE anti- β -Lg ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para da β -Lg nativa, β -Lg hidrolisada com alcalase, bromelina ou neutrase e polimerizados com TG pós hidrólise.....	85
Tabela 14. Resposta de IgE anti- β -Lg ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG e polimerizadas pré hidrólise com alcalase, bromelina ou neutrase.	87
Tabela 15. LC-ESI-MS ⁿ – Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg.	103
Tabela 16. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β -Lg TT TG.....	105

Tabela 17. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β -Lg CysTG.....	106
Tabela 18. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg / alcalase.....	108
Tabela 19. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β -Lg TT TG/ alcalase.....	109
Tabela 20. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg Cys TG/ alcalase.....	110
Tabela 21. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg alcalase/10TG.....	111
Tabela 22. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg/ bromelina.....	113
Tabela 23. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg TT TG /bromelina.....	114
Tabela 24. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β -Lg Cys TG /bromelina.....	115
Tabela 25. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β -Lg bromelina/10TG.....	116
Tabela 26. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg.....	118
Tabela 27. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg TT TG.....	120
Tabela 28. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg CysTG.....	121
Tabela 29. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg /alcalase.....	123
Tabela 30. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg TT TG/ alcalase.....	124
Tabela 31. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg Cys TG/alcalase.....	125
Tabela 32. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg alcalase/10TG.....	126
Tabela 33. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β -Lg/ bromelina.....	128
Tabela 34. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg TT TG /bromelina.....	129
Tabela 35. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão tríptica da β -Lg Cys TG /bromelina.....	130

Tabela 36. LC-ESI-MS ⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β -Lg bromelina/10TG.	131
Tabela 37. Peptídeos correspondentes aos epítomos identificados após digestão péptica das amostras.	134
Tabela 38. Peptídeos correspondentes aos epítomos identificados após digestão trípica das amostras.	134

RESUMO

Tratamento térmico, alta pressão ou hidrólise enzimática, utilizados em conjunto ou separadamente, podem alterar determinantes antigênicos (epítomos) presentes nas proteínas, e têm sido estudados como estratégia para obtenção de produtos com menor potencial alergênico, porém ainda com sucesso limitado. A enzima transglutaminase (TG), que catalisa a reação de ligação cruzada inter ou intramolecular em diversas proteínas, também tem sido utilizada com este propósito. A associação da hidrólise enzimática com a polimerização por TG é uma estratégia ainda pouco explorada, mas que oferece boas perspectivas em relação à redução da antigenicidade de proteínas. Diante disso, o presente estudo teve como objetivos obter e caracterizar a β -Lactoglobulina (β -Lg) polimerizada por TG e a β -Lg polimerizada pré e pós hidrólise enzimática com as proteases Alcalase, Neutrase ou bromelina, e avaliar o efeito destes processos na antigenicidade da proteína. A melhor condição de hidrólise da β -Lg, com cada uma das proteases estudadas foi definida a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR), tendo como variáveis independentes a concentração de proteína (2,2 - 7,8% p/v) e relação enzima : substrato (E:S), 6,9 - 28 U g⁻¹ proteína e, como variável dependente o grau de hidrólise (GH), determinado pelo método pH-stat. A condição selecionada, 3% de proteína e E:S 25 U g⁻¹, foi a utilizada para a hidrólise da β -Lg pré ou pós polimerização com a enzima TG. As condições experimentais foram: **(1)** hidrólise da β -Lg com as três enzimas, seguida de polimerização com TG (10 ou 25 U g⁻¹) ou **(2)** polimerização da β -Lg (7%p/v) com TG (10U TG g⁻¹) realizada pós tratamento térmico ou na presença de agente redutor Cys (0,1 mol L⁻¹), seguido por hidrólise com as diferentes proteases. As amostras hidrolisadas e as polimerizadas pré ou pós hidrólise foram caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE/tricina, cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (MS) e ensaios imunológicos (ELISA e *Imunoblote*). Os hidrolisados obtidos com Alcalase apresentaram 12,7% de GH e com Neutrase e bromelina aproximadamente 4%. Os perfis eletroforéticos da β -Lg polimerizada pós tratamento térmico (β -Lg TT TG) ou na presença de Cys (β -Lg Cys TG), apresentaram bandas de massa molecular (MM) alta, porém a polimerização pós hidrólise, avaliada por eletroforese e cromatografia, não resultou em aumento da MM aparente dos hidrolisados. A ligação isopeptídica ϵ -(γ -Gln)Lys, catalisada pela TG, foi detectada em concentração mais elevada no material polimerizado pós hidrólise com alcalase, seguido do tratamento de polimerização da presença de Cys. No estudo da polimerização pré hidrólise, a alcalase foi a enzima que hidrolisou mais eficientemente tanto a β -Lg como seus polímeros. Os polimerizados pre ou pós hidrólise com neutrase ou bromelina apresentaram β -Lg residual, observada no perfil eletroforético e cromatográfico, sendo que para os hidrolisados com neutrase, a fração correspondente à β -Lg residual apresentou maior intensidade. O tratamento isolado de hidrólise, principalmente com alcalase ou bromelina, ou a associação deste processo com a TG foram capazes de

reduzir significativamente a resposta antigênica da β -Lg. Os hidrolisados da β -Lg com neutrase apresentaram reação antígeno-anticorpo apenas na região correspondente ao monômero da β -Lg, sendo que a reação foi menos intensa após a polimerização do hidrolisado com a TG. As amostras foram submetidas à digestão *in vitro* e avaliadas por espectrometria de massas (MS/MS) quanto à identificação de epítomos lineares. Verificou-se que tanto a β -Lg polimerizada após tratamento térmico ou na presença de Cys como a amostras polimerizadas pré ou pós hidrólise com bromelina apresentaram alguns fragmentos correspondentes aos epítomos, embora em menor número quando comparados aos epítomos identificados na β -Lg nativa. Para o tratamento com a alcalase, isolado ou associado à TG, não foram identificados fragmentos correspondentes aos epítomos após digestão gastrointestinal das amostras. Os resultados obtidos indicaram que a hidrólise, principalmente com alcalase, associada ou não à polimerização com TG, foi capaz de reduzir a antigenicidade da β -Lg, mostrando-se uma alternativa para a produção de alimentos hipoalergênicos.

ABSTRACT

Heat treatment, high pressure and enzymatic hydrolysis have been studied aiming at obtaining products with low allergenic potential since they can alter antigenic determinants (epitopes) in the protein. The transglutaminase (TG), an enzyme that catalyzes inter or intramolecular cross-link in different proteins has also been used to reduce the protein antigenicity. The association of enzymatic hydrolysis and polymerization by TG is another strategy for reducing the antigenicity of food proteins, promising that needs further research. Therefore, the present study aimed to obtain and characterize the β -Lg polymerized by TG before or after enzymatic hydrolysis with the proteases alcalase, neutrase or bromelain and evaluate the effect of these processes on the protein antigenic response. The optimum conditions for hydrolysis of β -Lg, obtained with the three different enzymes, were defined using a central composite rotatable design (CCRD), where the independent variables were protein concentration (2.2% -7.8 w / v) and enzyme: substrate ratio (E:S), 6.9 to 28 U g⁻¹ protein, and the dependent variable (response) was the degree of hydrolysis (DH) determined by the pH-stat method. The hydrolysis condition defined by CCRD was 3% of protein (w/v) and E:S ratio 25 U g⁻¹. The experimental conditions were: **(1)** hydrolysis of β -Lg with the three enzymes used separately, followed by polymerization by TG (10 or 25 U g⁻¹) or **(2)** polymerization of β -Lg (7% w/v) by TG (10U g TG⁻¹) after heat-treatment (80 °C/60 min) or in presence of reducing agent Cys (0.1 mol L⁻¹), followed by hydrolysis. The samples were characterized by SDS-PAGE/tricine, reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) and by immunochemical assays (ELISA and Immunoblot). The highest DH of the β -Lg was obtained with alcalase (12.6%), while with neutrase or bromelain a DH of 4% approximately was achieved. The electrophoresis profiles of β -Lg polymerized after heat treatment (β -Lg TT TG) or in the presence of Cys (β -Lg Cys TG) showed bands with high molecular mass (MM). On the other hand, the post-hydrolysis polymerization, analyzed by SDS-PAGE and RP-HPLC, resulted in no increase in the MM of the hydrolysates. The highest concentration of the cross-link, by formation of the isopeptide bound ϵ -(γ -Gln) Lys, was found in the sample polymerized after hydrolysis with alcalase, followed by the sample β -Lg Cys TG. The polymerized pre or pos hydrolysis with neutrase or with bromelain showed residual β -Lg, observed in electrophoretic and chromatographic profiles, and for hydrolysates with neutrase, the band corresponding to β -Lg showed higher residual intensity. Alcalase was the enzyme which hydrolysed more efficiently both untreated and polymerized β -Lg. Using neutrase or bromelain to hydrolyse polymerized β -Lg, a residual β -Lg (18.3 kDa) was observed in the electrophoretic and chromatographic profiles. The evaluation of antigenicity showed that hydrolysis treatment used alone, especially with alcalase or bromelain, or the combination of this process with TG was capable to reduce significantly the antigenic response of β -Lg. The β -Lg hydrolysed with neutrase showed antigen-antibody reaction only in the region corresponding to the β -Lg monomer, and this reaction was less intense after the association of hydrolysis

with neutrase and polymerization by TG. The samples were submitted to *in vitro* digestion and then analyzed by mass spectrometry (MS / MS) to identification of linear epitopes in the protein. It was verified that the polymerized samples (β -Lg TT TG or β -Lg Cys TG) as well as those polymerized before or after hydrolysis with bromelain, retained some fragments corresponding to the epitopes, although to a lesser extent when compared to the epitopes identified in the untreated β -Lg. Interestingly that for the treatment with alcalase, associated or not with the TG, no epitopes were identified after gastrointestinal digestion. These results indicated that the hydrolysis, especially with alcalase, and the association of hydrolysis with polymerization, were capable to reduce the β -Lg antigenicity and could be an alternative for elaboration of hypoallergenic products.

1. INTRODUÇÃO

A alergia alimentar é uma doença cada vez mais freqüente nos países ocidentais e permanece um campo a ser explorado e compreendido pela ciência (CIANFERONI & SPERGEL, 2009). Trata-se de um importante problema de saúde pública, afetando de 1 a 2% da população adulta e até 8% das crianças com idade abaixo de três anos (BURKS e BALLMER-WEBER, 2000). Na infância, o leite bovino está no topo da lista dos alimentos considerados potencialmente alergênicos (MATSUMOTO, 2011).

As alergias alimentares são normalmente mediadas por imunoglobulinas do tipo E (IgE) produzidas no sistema imune pelos linfócitos B. As reações envolvidas na resposta são do tipo cutâneas (dermatite atópica, urticária), respiratórias (rinite, asma) ou gastrointestinais (vômito, diarreia, cólica, refluxo gastroesofágico), sendo que, em casos extremos, pode haver choque anafilático do indivíduo alérgico (MONACI et al., 2006).

A β -Lactoglobulina (β -Lg) é uma das principais proteínas do leite bovino que causa reação alérgica. Não está presente no leite humano, apresenta estrutura hidrofóbica e estável em pH ácido, o que a torna resistente à digestão, principalmente à ação da pepsina (CHICÓN et al., 2008b). Essa resistência resulta na não fragmentação de algumas seqüências específicas de aminoácidos, que podem sensibilizar indivíduos e desencadear o processo alérgico, mesmo quando administrada em baixas concentrações (MOUÉCOUCOU et al., 2007; SCHMIDT et al., 1995).

A alteração na conformação dos determinantes antigênicos – epítopos - como resultado da perda da estrutura terciária, pode reduzir o potencial antigênico da proteína (MONACI et al., 2006). Vários estudos têm focado a utilização de diferentes processos físicos, químicos ou enzimáticos para redução do potencial antigênico das proteínas do soro de leite. Dentre os processos físicos, o tratamento térmico é o mais utilizado para redução do potencial alergênico. (KLEBER et al., 2004). Outro tratamento físico que tem sido estudado é a eletrólise, que ao reduzir as pontes dissulfeto na proteína e modificar a sua

estrutura pode atenuar a atividade alergênica da β -Lg (MATSUMOTO, 2011). A glicação, processo químico que ocorre no processamento de alimentos, inclusive do leite, pode tanto aumentar o reconhecimento das IgE para os subprodutos formados na reação (CHUNG & CHAMPAGNE, 2006; NAKAMURA et al., 2005), como reduzir ou não afetar o seu reconhecimento (GRUBER et al., 2004; MONDOULET et al., 2005).

A hidrólise enzimática é o processo mais utilizado para obtenção de produtos hipoalergênicos, principalmente aqueles destinados às crianças e adultos alérgicos às proteínas do leite. No entanto, além de não ser muito palatável, há algumas questões concernentes à questão nutricional destas fórmulas industrializadas. Algumas delas podem apresentar menor conteúdo protéico comparado ao leite materno, o que nas crianças pode implicar em menor concentração plasmática de alguns aminoácidos (HERNELL & LÖNNERDAL, 2003; MAGGIO et al., 2005). Do ponto de vista imunológico, podem ainda apresentar atividade antigênica decorrente de material não hidrolisado, proveniente principalmente da β -Lg (CLARE et al., 2007; RESTANI et al., 1995; NATALE et al., 2004).

A enzima transglutaminase (TG) também tem sido utilizada com o mesmo propósito. A TG é a única enzima utilizada na indústria de alimentos que modifica as proteínas por meio de incorporação de amina, ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamil)lisil ou desaminação (MOTOKI & SEGURO, 1998; JONG & KOPPELMAN, 2002; FORT et al., 2007), convertendo proteínas em polímeros de alta massa molecular (MM) através de ligações cruzadas covalentes (KURAISHI, YAMASAKI, & SUSA, 2001; RODRIGUEZ-NOGALES, 2006). A capacidade da TG de introduzir ligações cruzadas inter e intraproteínas, além de aumentar o valor e as propriedades nutricionais e funcionais do material modificado, pode alterar a resposta antigênica das proteínas provenientes da soja, trigo, amendoim e leite (BABIKER et al., 1998a; BABIKER et al., 1998b; CLARE et al., 2007; WRÓBLEWSKA et al., 2008; VILLAS-BOAS et al., 2010).

As proteínas do soro de leite não são consideradas bons substratos para ação desta enzima a menos que haja tratamento prévio com agentes redutores como o dithiothreitol (DTT) ou desnaturação térmica da proteína, que aumentam a reatividade principalmente da β -Lg (TANG & MA, 2007). Empregando Cys como desnaturante químico e substituto do DTT, foi observado que polimerização da β -Lg pela TG foi facilitada, e houve redução da antigenicidade da proteína. (VILLAS-BOAS et al., 2010). A hidrólise enzimática é outro método que pode facilitar a ação da TG e implicar em alteração da resposta antigênica do material modificado. Wróblewska et al. (2008) observaram redução do potencial antigênico de proteínas do soro do leite combinando hidrólise com alcalase e polimerização com TG, sugerindo que este é um caminho promissor para obtenção de produtos com baixa atividade antigênica. Além disso, um fator importante a ser considerado, é a digestibilidade do material modificado. A avaliação da digestão *in vitro* é um dos métodos associados aos ensaios imunoquímicos existentes para a determinação do potencial alergênico de proteínas (SCHNELL & HERNAM, 2009). Após digestão da proteína nativa, pode haver liberação de peptídeos caracterizados como epítomos (ADAMS et al., 1991; HEINZMANN et al., 1999, CHICÓN et al., 2008b). No entanto, após tratamento da proteína, a digestão pode liberar peptídeos com características distintas daqueles oriundos da digestão *in vitro* da proteína nativa, o que poderia implicar em maior ou menor resposta antigênica do material.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a polimerização da β -Lg com TG pré ou pós hidrólise com diferentes proteases e o efeito destes tratamentos, isolado ou combinado, na antigenicidade da proteína.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as condições de hidrólise da β -Lg com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina, utilizando a metodologia de superfície de resposta;
- Obter e caracterizar a β -Lg polimerizada pré ou pós hidrólise com as três proteases;
- Identificação e quantificação do *cross-link* no material polimerizado pré ou pós hidrólise;
- Avaliar a antigenicidade das amostras polimerizadas pré ou pós hidrólise, por determinação da reatividade para IgE específica;
- Estudar a digestão *in vitro* das amostras polimerizadas pré ou pós hidrólise e, caracterizar os peptídeos formados após digestão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Proteínas do leite

O leite de vaca tem aproximadamente 3,5% de proteínas, sendo 2,9% caseína e 0,6% proteínas de soro. Caseína pode ser definida como a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado a pH 4,6 / 20 °C. O líquido remanescente é o soro, que contém cerca de 20% das proteínas do leite. A α -La e β -Lg perfazem 70-80% das proteínas totais do soro. As sub-frações, presentes em pequenas concentrações no soro de leite, são compostas por: lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (HARAGUCHI et al., 2006).

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

Na indústria de alimentos as proteínas do soro de leite têm sido utilizadas em diversas aplicações, pois apresentam importantes características tecnofuncionais tais como formação de gel, espumas e capacidade emulsificante (DAUBERT et al., 2006). Nutricionalmente, devido ao seu conteúdo de aminoácidos essenciais, o valor biológico das proteínas do soro é alto se comparado ao de outras proteínas, com alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (Leu, Ile, Val), que estão envolvidos na síntese muscular e, diferente das proteínas de origem vegetal, apresentam os aminoácidos essenciais Lys, Met, Thr e Ile em excesso, podendo ser utilizado em caráter suplementar (HA & ZEMEL, 2003).

Quando utilizadas como suplementos, as proteínas do soro de leite podem estar na forma íntegra ou hidrolisada. Na forma hidrolisada estão presentes em formulações para pacientes com síndromes de má absorção intestinal e com intolerância às proteínas do leite (FREITAS et al., 1993; BOZA et al., 1995), para

idosos e atletas (FRØKJAER, 1994). Os hidrolisados ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridos e absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (BOIRIE et al., 1997). Além disso, após hidrólise, pode haver a formação de peptídeos bioativos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo, como imunológica, opióide e ergogênica (GAUTHIER & POULIOT, 2003; SGARBIERI, 2004; PACHECO et al., 2005).

A β -Lg é a principal proteína do soro de leite em ruminantes, perfaz 50% do total das proteínas que constituem esta fração (MONACI et al., 2006). É uma proteína globular, constituída por 162 aminoácidos, contém um grupo sulfidril livre (-SH) e duas pontes dissulfeto intramolecular (-S-S-), ligando a Cys₆₆ – Cys₁₆₀ e Cys₁₀₆ – Cys₁₁₉. A estrutura secundária consiste de folhas- β antiparalelas formadas por nove cordas- β (β -*strands*). A estrutura cristalina mostra que o monômero de MM ~ 18,3 kDa, consiste predominantemente de folhas- β (50%) e uma pequena porção de α -hélice (15%), estruturas ao acaso (15%) e estruturas em volta ou *turns* (20%) (PAPIZ et al., 1986; MONACO et al., 1987; BROWNLOW et al., 1997). A β -Lg apresenta polimorfismo genético, sendo que as variantes A e B são mais comuns (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; HARAGUCHI et al., 2006).

Da mesma forma que as demais proteínas do soro de leite, a β -Lg desnatura a temperaturas superiores a 60 °C. A 95 °C há completa desnaturação, com extensa transformação conformacional, exposição de grupos nucleofílicos altamente reativos e de áreas hidrofóbicas (SGARBIERI, 1996).

A α -La é uma proteína monomérica globular, com MM 14,2 kDa, e representa aproximadamente 25% das proteínas do soro de leite. Caracteriza-se pela tendência a formar associações em pH abaixo do seu ponto isoelétrico, além de apresentar alta afinidade de ligação com íons cálcio, o que leva à maior estabilidade da estrutura secundária desta proteína (MONACI et al., 2006).

A BSA, com MM 66,4 kDa, é responsável por aproximadamente 5% do total das proteínas do soro de leite. Apresenta um grupo sulfidril livre na posição 34 (N-terminal) e 17 pontes dissulfeto intramoleculares (CARTER, 1994). Muitas das

ligações dissulfeto são protegidas no núcleo da proteína e, conseqüentemente, não são facilmente acessíveis (RESTANI et al., 2004).

3.2 Alergia às proteínas do leite

Alergia ao leite de vaca (ALV) é uma das alergias alimentares mais comuns em crianças, com uma incidência estimada de 2 – 3% para crianças com idade até 4 anos (SAMPSON, 2004). Sintomas de ALV podem surgir imediatamente, horas ou mesmo dias após a ingestão de quantidades moderadas de leite ou de formulações a base de suas proteínas. As reações envolvidas na ALV normalmente são mediadas por anticorpos IgE, e o aparecimento dos sinais e sintomas após a ingestão geralmente é agudo ativando principalmente os mastócitos teciduais e basófilos sangüíneos (SICHERER, 2002), conforme ilustrado na Figura 1. Quando os antígenos se ligam às moléculas de IgE específicas ocorre a liberação de mediadores que causam os sintomas, que podem ser do tipo cutâneos (urticária, angioedema), gastrointestinais (vômitos e diarréia), respiratórios como prurido ocular e lacrimejamento, congestão nasal e broncoespasmo ou então as reações sistêmicas como a anafilaxia com hipotensão e, em casos extremos, o choque anafilático (NOWAK-WEGRZYN & SAMPSON, 2006).

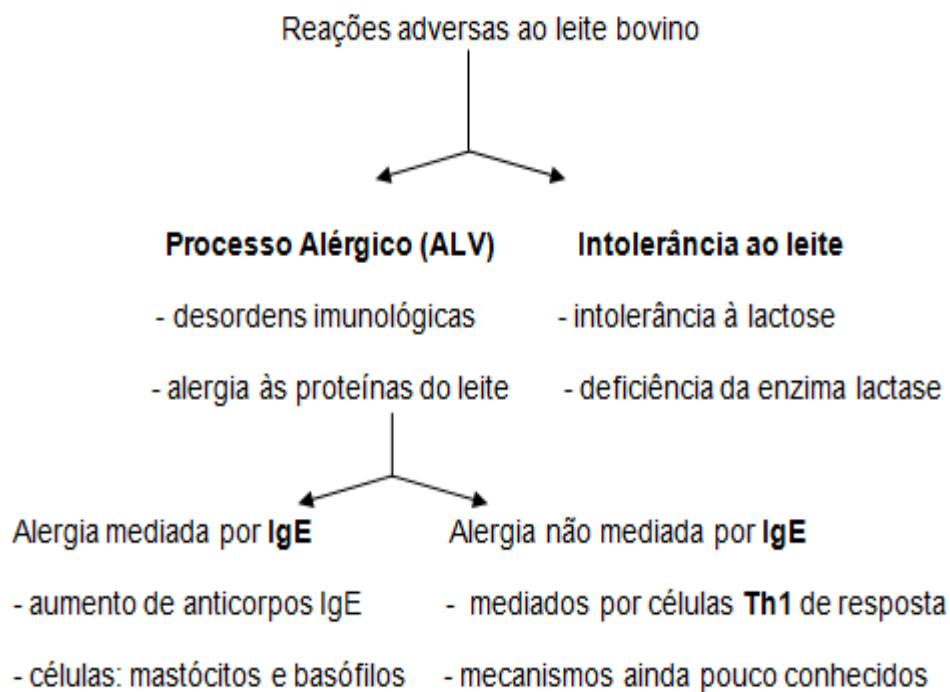


Figura 1. Classificação das reações adversas ao leite bovino. (SELO et al., 1999 – adaptado).

O leite é o principal alimento do recém-nascido e sua composição varia de acordo com a espécie animal. O leite não só fornece nutrientes necessários para o crescimento, como também funciona como meio de transferência de anticorpos de defesa do organismo (HETTINGA et al., 2011). A Tabela 1 mostra a composição centesimal das proteínas do leite bovino em comparação ao leite humano.

Tabela 1. Composição centesimal média do leite humano e bovino.

Parâmetros determinados (%)	Leite	
	Humano	Bovino
Proteínas	1,85	3,70
Lipídeos	1,84	3,68
Carboidratos	7,80	4,90
Cinzas	0,30	0,70
Umidade	87,82	87,02

Fontes: Smithers et al. (1996); Heetinga et al. (2011).

Comparado ao leite humano, o leite bovino apresenta maior teor de compostos nitrogenados, em grande parte devido ao maior conteúdo de caseína e também de β -Lg e albumina sérica bovina, proteínas ausentes no leite humano (MARTIN et al., 1991). No leite bovino, as quatro frações da caseína α S1-, α S2-, β - e κ -caseína e as proteínas do soro β -lactoglobulina, α -lactalbumina são considerados os principais responsáveis por desencadear a resposta alérgica (WAL, 1998; RUITIER et al., 2007).

A seqüência de aminoácidos que se liga aos anticorpos e pode causar algum tipo de reação é chamada determinante antigênico ou epítopo. Existem dois tipos de epítotos: “contínuo” ou “linear”, quando os aminoácidos estão em seqüência na estrutura primária e “conformacional”, quando vários aminoácidos estão muito próximos devido à estrutura tridimensional da proteína (BALL et al., 1994). Para as caseínas, Jarvinen et al. (2001) verificaram que cinco epítotos de ligação com IgE (dois na fração α -s1-caseína, um na α -s2-caseína, e dois na κ -caseína) foram reconhecidos em pacientes com alergia persistente, caracterizada por prevalecer mais de quatro dias por semana e mais de quatro semana por ano. Os anticorpos IgE reconhecem ao menos um entre três epítotos nestas frações, principalmente as seqüências de aminoácidos (AA) (123-132) na α -s1-caseína; AA(171-180) na α -s2-caseína, e AA(155-164) na κ -caseína. (JARVINEN et al.,

2001; NATALE et al., 2004). Quanto as proteínas do soro, a α -lactalbumina apresenta quatro principais epítomos de ligação com a IgE e, a β -Lg sete epítomos principais, de média e alta reatividade (JARVINEN et al., 2001). Na Figura 2 está ilustrada a estrutura da β -Lg e a sua seqüência primária, com destaque para alguns epítomos considerados altamente reativos.

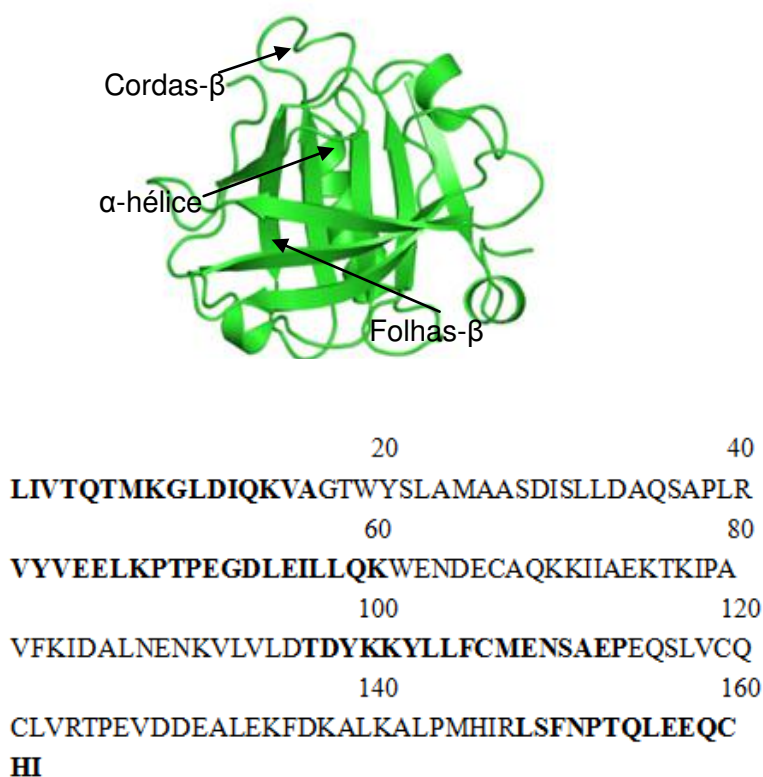


Figura 2. Estrutura tridimensional e seqüência primária da β -Lg. Em negrito estão destacados os epítomos de maior reatividade para IgE. Fonte: RCSB PDBe protein data bank.

Wal (2001) relatou que os epítomos da β -Lg reconhecidos por mais de 90% dos pacientes foram os fragmentos AA(41-60), AA(102-124) e AA(149-162). Empregando a técnica de espectrometria de massas foram identificadas as seqüências AA(75-86) e AA(127-146) (JARVINEN et al., 2001; CHICÓN et al., 2008b) e AA(102-124) e AA(41-69) (SÉLO et al., 1999), também caracterizadas como epítomos da β -Lg. Otani et al. (1985) e Kurisaki et al. (1982) mostraram que

a estrutura terciária da β -Lg era necessária para sua imunorreatividade. Clement et al. (2002) verificaram que os epítomos estão distribuídos na β -Lg tanto na α -hélice e *loops* externos, como também nas folhas- β da proteína.

Para as proteínas que apresentam propriedade antigênica, um importante aspecto a ser estudado é a digestão *in vitro*. Embora os mecanismos da sensibilização alérgica dos indivíduos não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a maioria destes mecanismos ocorre no trato gastrointestinal, quando antígenos são absorvidos e distribuídos no organismo (MILLS et al., 2003; BANNON, 2004; SCHNELL & HERMAN, 2009). Além da relação com a antigenicidade, o estudo da digestão *in vitro* é utilizado para avaliação estrutural e biodisponibilidade de nutrientes (HUR et al., 2011).

A β -Lg na forma nativa apresenta comportamento diferente das demais proteínas do soro quanto à susceptibilidade às enzimas gastrointestinais. É resistente à ação da pepsina em pH 2, condição na qual a enzima está com atividade máxima e a proteína está na forma monomérica (REDDY et al., 1988; KITABATAKE & KINEKAWA, 1998; KIM et al., 2007). A pepsina é uma endopeptidase que age essencialmente nas ligações que envolvem o grupo carboxílico dos resíduos dos aminoácidos aromáticos Phe, Trp, Tyr (KIM et al., 2007). A β -Lg contém em sua seqüência cerca de 50 ligações que são potenciais sítios de clivagem para esta enzima, mas a maioria delas está localizada no centro hidrofóbico da molécula de difícil acesso à pepsina (NACER et al., 2004).

Astwood et al. (1996) verificaram que proteínas consideradas não antigênicas foram totalmente digeridas pela pepsina, enquanto que a β -Lg e outras proteínas antigênicas apresentaram fragmentos estáveis à digestão, que podem ser absorvidos e causar reação alérgica. Assim, a resistência à pepsina é um dos fatores a serem considerados para avaliação da antigenicidade de proteínas alimentares (ASTWOOD et al., 1996; MORENO, 2007; SCHNELL & HERMAN, 2009).

Após digestão gastrointestinal, Otte et al. (1997) e Mandalari et al. (2009) verificaram que a β -Lg foi quase que totalmente digerida. As enzimas

pancreáticas, tripsina e quimotripsina, clivam as ligações peptídicas entre aminoácidos básicos (Lys e Arg) e aromáticos (Phe, Trp, Try) (KIM et al., 2007). Considera-se o pH 8,0 como sendo ótimo para atuação destas enzimas, sendo que nesta faixa a β -Lg sofre alteração conformacional ficando em sua forma monomérica, o que torna mais fácil o acesso das enzimas às ligações peptídicas (MOUÉCOUCOU et al., 2003; KIM et al., 2007). No entanto, há trabalhos que observaram resistência parcial da β -Lg à digestão com tripsina neste pH, o resultado que foi relacionado à relação E:S utilizada na hidrólise (GUO et al., 1995) Também na presença de polissacarídeos a β -Lg apresentou-se mais resistente à ação da tripsina e quimotripsina (MOUÉCOUCOU et al., 2003). Estudo multilaboratorial mostrou que durante simulação da digestão gastrointestinal, a inclusão da fosfatidilcolina (PC) na proporção fisiológica de 60:1 (PC : proteína) poderia manter protegida algumas proteínas, incluindo a β -Lg, tornando-a mais resistente à hidrólise (MORENO et al., 2005; MANDALARI et al., 2009; MACIERZANKA et al., 2009). Assim, a inclusão de agentes tensoativos na análise de digestão *in vitro* tem sido indicada para fazer parte do protocolo para avaliação da digestibilidade protéica (MANDALARI et al., 2009).

3.3 Detecção e quantificação da resposta antigênica e epítopos na proteína

Entre os testes imunquímicos normalmente utilizados na área de alérgenos alimentares, destacam-se o *Radio-Allergosorbent Test* (RAST), *Enzyme Allergosorbent Test* (EAST), *Rocket Immuno-Electrophoresis* (RIE), *Western Blotting*, *Immunoblotting* e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (BESLER, 2004; POMS, KLEIN & ANKLAM; 2004; KOPPELMAN & HEFLE, 2006; MONACI et al., 2006).

As análises são realizadas com anticorpos presentes na fase líquida do sangue (soro ou plasma), denominados anticorpos circulantes (HUDSON & RAY, 1989). O modelo experimental utilizando camundongos sensibilizados com diferentes antígenos é o mais indicado para obtenção de anticorpos específicos em estudos da avaliação de componentes alergênicos em alimentos (ADEL-PATIENT et al., 2000; BERNARD et al., 2000). Gaudry et al. (2004) verificaram

que as respostas dos anticorpos das classes IgE e IgG provenientes do de camundongos BALB/c que foram sensibilizados com as proteínas provenientes do amendoim, camarão ou castanha de caju foram similares às respostas observadas quando utilizado ensaios com soros de pacientes alérgicos a estas proteínas.

Camundongos BALB/c sensibilizados com β -Lg e posteriormente alimentados com IPS produziram IgG anti- β -Lg, indicando que a administração intraperitoneal de β -Lg causou imunoestimulação do organismo contra esta proteína (WRÓBLEWSKA & JEDRYCHOWSKI, 2005). Este modelo animal também é utilizado em testes de tolerância oral de fórmulas infantis hipoalergênicas (FRITSCHÉ, 2009).

Mizumachi e Kurisaki (2002) alimentaram camundongos BALB/c por 58 dias consecutivos com β -Lg e observaram que a ingestão contínua da proteína induziu a supressão da resposta de citocinas mediadoras da resposta alérgica devido à tolerância oral adquirida pelos animais neste período. O mecanismo de resposta alérgica aguda e tardia foi demonstrado por Adel-Pacient et al. (2003). Camundongos BALB/c foram sensibilizados intraperitonealmente com β -Lg desnaturada contendo epítopos lineares e tiveram produção aumentada de mediadores inflamatórios (leucotrienos e histamina) e da secreção de muco, IL-4 e IL-5 e exsudato de plasma, indicando que a proteína provocou resposta alérgica aguda e tardia nestes animais.

Por teste ELISA, método imunoquímico comumente utilizado em laboratórios e na indústria de alimentos, a concentração do complexo antígeno-anticorpo pode ser estimada com base em uma curva padrão gerada com quantidades conhecidas de anticorpo purificado. Existem dois tipos de ELISA: competitivo e sanduíche, sendo o último o mais aplicado para a detecção de alérgenos alimentares (POMS et al., 2004; KOPPELMAN & HEFLE, 2006; MONACI et al., 2006). Outro teste empregado, o Imonoblote, é utilizado para a identificação de uma proteína ou frações desta que apresentem propriedade antigênica. Utiliza-se primeiramente a técnica de SDS-PAGE para separar as proteínas que então são transferidas do gel para um suporte estável, como a

membrana de nitrocelulose. Proteínas específicas são então detectadas por anticorpos capazes de reagir com as mesmas, e a ligação antígeno-anticorpo é revelada com anticorpos antiimunoglobulina marcados com radioisótopos ou com uma enzima (JANEWAY et al., 2002).

Atualmente, aliada às técnicas imunoquímicas, utiliza-se a análise por espectrometria de massas (MS), que através da proteômica identifica e caracteriza epitopos nas proteínas. Em linhas gerais, MS é uma técnica capaz de determinar a relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD & MANN, 2003). As formas de ionização utilizadas em MS aplicada à proteômica são *Electrospray* (ESI) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), que ionizam a molécula polipeptídica, preservando-a e transferindo para a fase gasosa (FENN et al., 1989; KARAS & HILLENKAMP, 1988).

Os resultados relativos à MM dos peptídeos, obtida a partir de íons precursores presentes no espectro de massas, bem como a informação relativa à seqüência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (MS/MS), são utilizados pelos softwares para localizar as proteínas ou fragmentos destas nos bancos de dados disponíveis (CANTÚ et al., 2008). Portanto, esta técnica permite o mapeamento de peptídeos presentes na proteína nativa ou modificada, e conseqüentemente a presença ou não de epítomos lineares na estrutura na β -Lg e outras proteínas alergênicas.

3.4 Estratégias para redução da antigenicidade de proteínas

3.4.1 Tratamento térmico

A desnaturação térmica pode alterar a conformação dos epítomos como resultado da perda da estrutura terciária, conseqüentemente reduzindo o potencial antigênico da proteína (KLEBER et al., 2004; MONACI et al., 2006; RODRIGUEZ-NOGALES, 2006).

As proteínas do leite diferem quanto à estabilidade durante o tratamento térmico. Enquanto a α -caseína é a mais termicamente estável, a β -Lg é moderada e a BSA é termolábil (BAHNA & GANDHI, 1983). Portanto, os agregados formados

após desnaturação térmica podem apresentar características estruturais distintas quando diferentes condições de aquecimento são utilizadas, resultando em diferentes graus de antigenicidade (SPIEGEL et al., 2002).

Tratamento térmico a 120 °C por 15 minutos não afetou a antigenicidade da caseína, no entanto a BSA e Imunoglobulinas presentes no leite apresentaram redução da antigenicidade após tratamento térmico > 70 °C (FIOCCHI et al., 1998). Mierzejewska & Kubicka (2006) verificaram que os animais imunizados com a forma nativa apresentaram níveis séricos de IgE anti- β -Lg superiores àqueles imunizados com a forma tratada.

Entretanto, Kleber et al. (2004) observaram aumento da antigenicidade da β -Lg tratada termicamente entre 75 e 90 °C, sendo que o tempo de aquecimento foi determinante na indução da resposta antigênica, que foi mais elevada após 35 min de tratamento. Spiegel et al. (2002) também observaram aumento da antigenicidade da β -Lg com o prolongamento do tempo de aquecimento a 90 °C. Nesses casos, o aumento da antigenicidade está associado à maior exposição de epítomos intramoleculares devido ao desdobramento da cadeia polipeptídica, ou mesmo à formação de novos sítios antigênicos (KLEBER et al., 2004). Por outro lado, o tratamento sob temperatura mais elevada (148 °C) resultou na redução da antigenicidade da β -Lg, o que foi associado ao processo de agregação com rearranjo inter e intramolecular, e ocultamento de vários epítomos (KLEBER et al., 2004).

O leite bovino contém lactose e outros açúcares redutores e, portanto está sujeito à reação de Maillard ou glicação durante o tratamento térmico. A glicação é uma das modificações químicas mais freqüentemente observadas no processamento industrial. O processo resulta na formação de compostos intermediários, denominados produtos de Amadori os quais podem tanto aumentar a atividade de ligação de IgE (CHUNG & CHAMPAGNE, 2001; NAKAMURA et al., 2005), como reduzir ou não afetar o seu reconhecimento (GRUBER et al., 2004; MONDOULET et al., 2005; TAHERI-KAFRANI et al., 2009).

3.4.2 Hidrólise enzimática

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (RAO et al., 1998; CLEMENTE, 2000).

As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, região N ou C terminal, são classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal sendo que a presença de grupos amino ou carboxila livres tem um efeito negativo na atividade da enzima. Estas enzimas são divididas em quatro subgrupos de acordo com seu mecanismo catalítico: serina proteases, aspártico proteases, cisteína proteases, e metaloproteases (RAO et al., 1998).

A hidrólise enzimática de proteínas é utilizada para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo (CLEMENTE, 2000). Pode melhorar em particular as características de absorção das proteínas, reunindo as seguintes propriedades: nutricionalmente adequado, osmoticamente equilibrado e hipoalergênico (GONZÁLES-TELLO et al., 1994). Concernente à questão hipoalergênica, embora as formulações elaboradas com hidrolisados protéicos do soro de leite tenham sido um grande avanço na terapia de indivíduos alérgicos, estas podem apresentar atividade antigênica decorrente de material não hidrolisado, proveniente principalmente da β -Lg (VAN ESCH et al., 2011; NATALE et al., 2004; RESTANI et al., 1995). Até então, somente a hidrólise extensa das proteínas, até que maioria dos peptídeos formados atinja MM entre 2 e 5 kDa, pode anular alergenicidade das proteínas do soro de leite (KANANEN et al., 2000).

Dentre os fatores que influenciam a proteólise destacam-se o tratamento térmico do substrato que ao desnaturar a proteína aumenta a exposição das ligações peptídicas e impacta no seu grau de hidrólise; a relação enzima substrato

(E:S), que exerce influência na velocidade da reação e no tamanho dos peptídeos produzidos no final do processo de hidrólise (GAUTHIER et al., 1986) e a natureza e especificidade das enzimas, uma vez que irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos (GAUTHIER et al., 1986; HAQUE & MOZAFFAR, 1992). A especificidade da enzima também é um dos fatores determinantes na redução da alergenicidade das proteínas (SVENNING et al., 2000).

Para avaliar estes fatores acima mencionados, Zheng et al. (2008) utilizaram a metodologia de superfície de resposta com as variáveis independentes: pH (7,0 - 11,0), temperatura (30 - 60 °C) e relação enzima:substrato (E:S 4000 - 8000 U g⁻¹ de proteína), e variável dependente a atividade antigênica residual de proteínas de soro de leite hidrolisadas com alcalase. A variável temperatura exerceu o maior efeito sobre a redução da antigenicidade da α -La e, para a β -Lg o fator pH. Já a relação E:S foi a variável que menos influenciou na resposta antigênica das proteínas.

Kananen et al. (2000) mostraram que a hidrólise da fração precipitada das proteínas do soro de leite com pepsina por 3 horas, seguido pela tripsina por 30 minutos resultou em peptídeos com MM < 5 kDa e praticamente anulou a antigenicidade das proteínas. Para o mesmo substrato, Svenning et al. (2000) obtiveram redução da antigenicidade da amostra após hidrólise exaustiva com Corolase PP. Processos envolvendo a alta pressão, utilizada previamente ao tratamento enzimático, podem facilitar a ação das enzimas na clivagem de epítomos na proteína (VAN BERESTEIJN et al., 1994; DUMAY et al., 1994). Chicón et al. (2008a) verificaram que o tratamento com alta pressão (400 MPa) associado à hidrólise com Corolase PP, promoveu redução da antigenicidade da β -Lg, porém ainda foram detectados fragmentos capazes de promover resposta antigênica.

Relativo às enzimas utilizadas no presente estudo, a alcalase é uma serina protease produzida pelo *Bacillus licheniformis* que tem ampla especificidade, cliva o lado carboxila de aminoácidos hidrofóbicos Phe, Tyr, Trp,

Leu, Ile, Val e Met (MARKLAND & SMITH, 1971; ADLER-NISSEN & OLSEN, 1986). Tecnicamente, pode ser empregada na modificação das propriedades funcionais de diversos substratos protéicos, incluindo isolado de proteína de soja (ADLER-NISSEN, 1979), proteínas do leite (MIETSCH et al., 1989), glúten (CHOHOBERT et al., 1996), assim como proteína do grão de bico (CLEMENTE et al., 1999), plasma sanguíneo (HYUN e SHIN, 2000) e proteína de peixe (KRISTINSSON & RASCO, 2000).

A neutrase, metalo protease bacteriana produzida por fermentação submersa de cepa selecionada de *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizada na maioria dos casos onde se deseja degradação de proteínas moderada ou extensa (SIRIPORN et al., 2008), em que cliva preferencialmente aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Leu) (SIRIPORN et al., 2008).

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido. A bromelina é uma glicoproteína, com um resíduo de oligossacarídeo por molécula que está covalentemente ligado à cadeia peptídica, com MM próxima de 31 kDa (MARTINS et al., 1992). É uma enzima sulfidrílica, ou cisteína protease, sendo que o grupamento tiol é essencial para a sua atividade proteolítica (MURACHI, 1976). Sua utilização vai desde as indústrias de alimentos e cervejeira, como também na medicina e indústria farmacêutica (FREIMAN & SRURSABAA, 1999).

3.4.3 Uso da enzima transglutaminase

A reação com a enzima transglutaminase (TG) também pode alterar a antigenicidade das proteínas. A TG está naturalmente presente na maioria dos tecidos animais e fluidos corporais e tem um papel importante no processo de coagulação sanguínea (LORAND, 2002). Foi identificada por Heinrich Waelsch há mais de 40 anos como uma enzima com a função de incorporar aminas em proteínas no fígado (LORAND, 2002). A Figura 3 ilustra as reações catalisadas pela TG, que modifica as proteínas por meio de incorporação de aminas, ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamil)lisil ou desaminação, (MOTOKI & SEGURO, 1998;

SHARMA et al., 2002, JONG & KOPPELMAN, 2002; FORT et al., 2007). Essas reações levam às mudanças nas propriedades funcionais de proteínas vegetais e animais e conferem a possibilidade da formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais (NIELSEN, 1995). A incorporação de ligações intra ou intermoleculares em alimentos protéicos parece ser viável para o melhoramento das propriedades físicas e de textura de muitos produtos (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006, JAROS et al., 2006).

Com o aumento da disponibilidade da enzima de fonte microbiana, sua aplicação pela indústria de alimentos tem sido muito pesquisada. A TG independente de cálcio de *Streptovorticilium mobaraense* sp, linhagem S-8112 consiste de 331 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica e contém um resíduo de cisteína com um grupo tiol livre, que é essencial para a atividade enzimática (KANAJI et al., 1993). Kanaji et al. (1993) confirmaram a MM da TG microbiana, $37.869,2 \pm 8,8$ kDa, por espectrometria de massa (MS/ESI).

As condições ótimas para atividade da da TG microbiana são pH 5,0 a 8,0, temperatura em torno de 50 °C (ANDO et al., 1989). Para proteínas do soro de leite, a polimerização com TG conduzida em pH 8,0, aumentou significativamente a geleificação e força do gel, melhorando as propriedades funcionais do substrato (CLARE & DAUBERT, 2011).

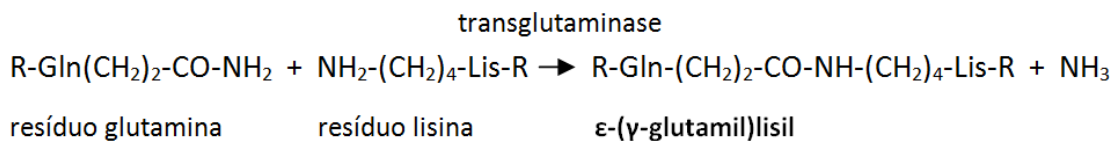
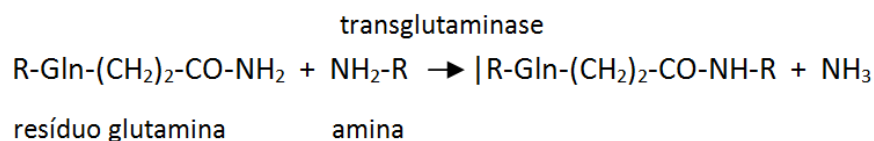
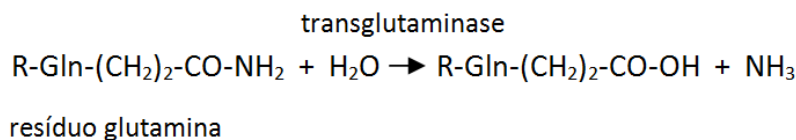
Polimerização**Incorporação de animais****Desaminação**

Figura 3. Reações catalisadas pela transglutaminase. Fonte: Sharma et al. (2002) (adaptado).

O efeito da deaminação química e enzimática de proteínas alimentares nas propriedades funcionais é de grande interesse na indústria alimentícia (MATSUDOMI et al., 1985). Alguns estudos têm reportado as propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas tratados com transglutaminase. Proteínas da soja hidrolisadas com quimotripsina (BABIKER et al., 2000), glúten hidrolisado com quimotripsina, papaina e pepsina (BABIKER et al., 1996) e caseinato de sódio hidrolisado com Protamex (FLANAGAN & FITZGERALD, 2002), submetidos posteriormente ao tratamento com TG, apresentaram aumento da solubilidade, melhora das propriedades de emulsificação e de formação de espuma.

Agyare et al. (2008) verificaram aumento da solubilidade do glúten hidrolisado com quimotripsina e polimerização com TG. Walsh et al. (2003) relataram aumento da solubilidade do isolado protéico de soja após hidrólise com alcalase e tratamento com TG. Efeito semelhante também foi observado no caseinato de sódio tratado com TG pré ou pós hidrólise com Protamex (FLANAGAN & FITZGERALD, 2002).

Apesar da ampla utilização da TG na indústria de alimentos, os mecanismos relacionados ao *cross-link* enzimático não estão totalmente esclarecidos, principalmente sobre a especificidade da TG para os resíduos laterais de Gln e Lys de diferentes proteínas (PARTSCHEFELD et al., 2007). Experimentos sobre a especificidade da TG para grupos doadores de acila mostraram que aminoácidos hidrofóbicos localizados no N-terminal dos resíduos de Gln aumentaram a reatividade da TG (OHTSUKA et al., 2000). A região onde estão localizados os resíduos dos aminoácidos AA também influencia a taxa de polimerização, sendo que resíduos de Gln situados nas regiões flexíveis da cadeia polipeptídica, principalmente nos *loops*, são preferencialmente modificados pela TG (DICKINSON, 1997).

A estrutura globular das proteínas do soro de leite, β -Lg e α -La, dificulta o acesso da TG aos sítios específicos na proteína. Entretanto, alguns processos podem facilitar a reação, sendo comumente utilizado o tratamento térmico superior a 70 °C (EISSA et al., 2006), a proteólise e também a alta pressão (400 MPa). O tratamento de alta pressão pode disponibilizar quatro resíduos de Gln localizados nas posições 5, 13, 35, e 59 na β -Lg, indicando que ocorre abertura parcial da molécula para ação da TG (PARTSCHEFELD et al., 2007).

A desnaturação dithiothreitol (DTT) altera a estrutura da β -Lg ao clivar as duas pontes dissulfeto presentes na molécula nativa: (Cys₆₆ – Cys₁₆₀) que liga o arco C – D à região carboxi-terminal e (Cys₁₀₆ – Cys₁₁₉) que liga os filamentos G – H na molécula, facilitando a ação da enzima TG para formação de polímeros (EISSA et al., 2006). Quando a β -Lg foi incubada com TG sob condições redutoras, observou-se que o resíduo de glutamina na posição 159 era o principal envolvido na reação de polimerização, e o Gln₁₅₅ o resíduo de menor participação (COUSSONS et al., 1992). Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) mostrou que comparado ao tratamento térmico, a utilização do DTT resultou em maior alteração da estrutura da β -Lg, facilitando a ação da TG e formação de *cross-linking* (EISSA et al., 2006). A Figura 4 ilustra o possível mecanismo de ação de agentes redutores.

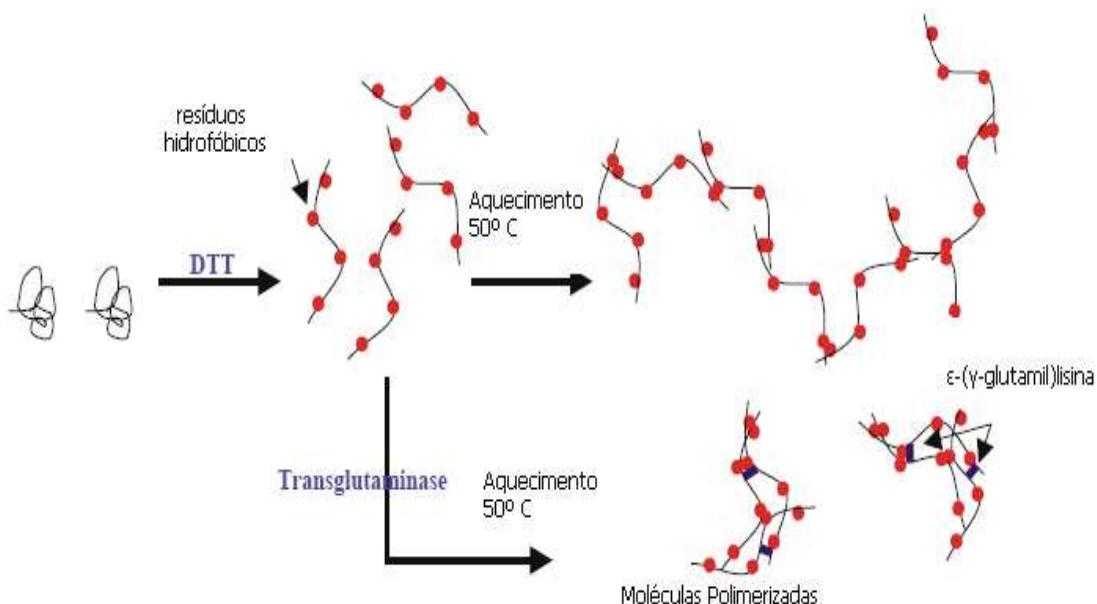


Figura 4. Possível mecanismo de ação catalisada pela transglutaminase após tratamento da proteína com agente redutor, na formação de estruturas protéicas mais compactas (adaptado de EISSA & KHAN, 2006).

Como o DTT não pode ser utilizado na produção de alimentos, alternativas para aumentar a reatividade da β -Lg por outros mecanismos têm sido investigadas. Faergemand et al. (1997) e posteriormente Villas-Boas et al. (2010) indicaram a Cys como possível substituto do DTT para modificação da β -Lg com a transglutaminase.

Quanto ao efeito da polimerização por TG na antigenicidade de proteínas, Babiker et al. (1998) verificaram que as proteínas de soja tratadas com TG apresentaram redução da antigenicidade devido ao mascaramento de determinantes antigênicos, efeito também reportado por Watanabe et al. (1994) para as frações protéicas solúveis e insolúveis do trigo tratadas com a TG. Por outro lado, foi verificado por teste ELISA que proteínas do amendoim tratadas termicamente foram polimerizadas apenas parcialmente com TG e não apresentaram diminuição da resposta antigênica (CLARE et al., 2007).

Em estudo conduzido por nosso grupo (VILLAS-BOAS et al., 2010), verificamos que tanto o tratamento térmico prévio como a utilização de Cys facilitaram a reação de polimerização por TG e promoveram a formação de

polímeros de MM alta. Estes resultados são promissores, em especial para o tratamento com agente redutor, uma vez que a Cys poderia ser utilizada em produtos alimentares, ao contrário do DTT. A β -Lg polimerizada nestas condições apresentou potencial antigênico reduzido, observado por testes *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que nestas condições ocorrem alterações nas regiões de determinantes antigênicos na proteína.

Quanto aos alimentos hipoalergênicos à base de hidrolisados protéicos disponíveis na indústria alimentícia e farmacêutica, podem ainda apresentar atividade antigênica decorrente de proteína intacta residual (CLARE et al., 2007; NATALE et al., 2004; RESTANI et al., 1995). A associação da polimerização por TG com a hidrólise enzimática pode, então, ser uma estratégia interessante na diminuição da antigenicidade de proteínas e produção de alimentos mais seguros. Na literatura, estudos relacionados ao efeito da combinação destes processos sobre a digestibilidade e antigenicidade da β -Lg são limitados. No estudo de O'Sullivan & FitzGerald (2012), foi verificado que não houve diferença significativa em relação à resposta antigênica entre os hidrolisados de caseinato de sódio tratados e aqueles não tratados com TG. Entretanto, Wróblewska et al. (2008) observaram redução da antigenicidade das proteínas de soro de leite ao combinar hidrólise com alcalase e polimerização com TG, sugerindo que esta associação seria uma alternativa para obtenção de produtos com baixa atividade antigênica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A proteína utilizada foi a Bio Pure β -Lg variantes A e B (93,6% de pureza) doada pela Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, MN, EUA). A enzima transglutaminase Activa WM (atividade declarada de aproximadamente 100 U g^{-1}), doada pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), foi utilizada na sua forma original, sem purificação. A enzima foi produzida por *Streptoverticillium sp.* (Ca^{2+} independente), e apresenta atividade ótima na faixa de pH de 5,0 a 8,0; e temperatura de 50 a 55 °C.

As enzimas neutrase® e alcalase® foram fornecidas pela Novozymes (Araucária, PR, Brasil) e a bromelina pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). As enzimas pepsina (172 U mg^{-1} proteína), tripsina (tipo I, 10100 U mg^{-1} proteína), α -quimotripsina (tipo I-S, $58,3 \text{ U mg}^{-1}$ proteína), lipase pancreática (Tipo VI-S, 11000 U mg^{-1} proteína), colipase (EC 259-490/1), pronase obtida de *Streptomyces griseus*, carboxipeptidase A de pâncreas bovino, leucina aminopeptidase microsomal de rim suíno e prolidase obtida de rim suíno, o padrão para determinação da ligação isopeptídica ϵ -(- γ -glutamil)lisil, e a Fosfatidilcolina (FC, *L*- α -phosphatidylcoline), foram provenientes da Sigma Co. (St. Louis, EUA).

Os reagentes utilizados foram: aminoácido L-cisteína 97% (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA), ácido trifluoroacético para síntese (TFA) (Merck, Hohenbrunn, Alemanha), ácido tricloroacético (TCA), β -mercaptoetanol (Merck), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma), tetrahydrocloroeto de diaminobenzidina (DAB) (*Sigma-Aldrich Chemie*, Steinheim, Alemanha); 2.5% tiopental sódico (Cristália, São Paulo, SP, Brasil); Tween 20 (Merck, Darmstald, Alemanha).

Os anticorpos utilizados foram: *Purified Mouse IgE antibody*, *Purified Rat Anti-mouse IgE monoclonal antibody* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), Anti-Rat IgG Whole molecule, peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

Para o ensaio biológico, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica –

Unicamp). O Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEEA), protocolo nº1586-1 (Anexo 1).

A Figura 5 ilustra o fluxograma geral do experimento. Todos os materiais hidrolisados ou polimerizados pré ou pós hidrólise, foram liofilizados para proceder-se as análises de caracterização e simulação da digestão *in vitro*. As amostras foram caracterizadas por eletroforese (SDS-PAGE), cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) e espectrometria de massas. A antigenicidade foi determinada por meio de ensaios imunológicos. As numerações nas caixas correspondem às respectivas seções descritas na metodologia.

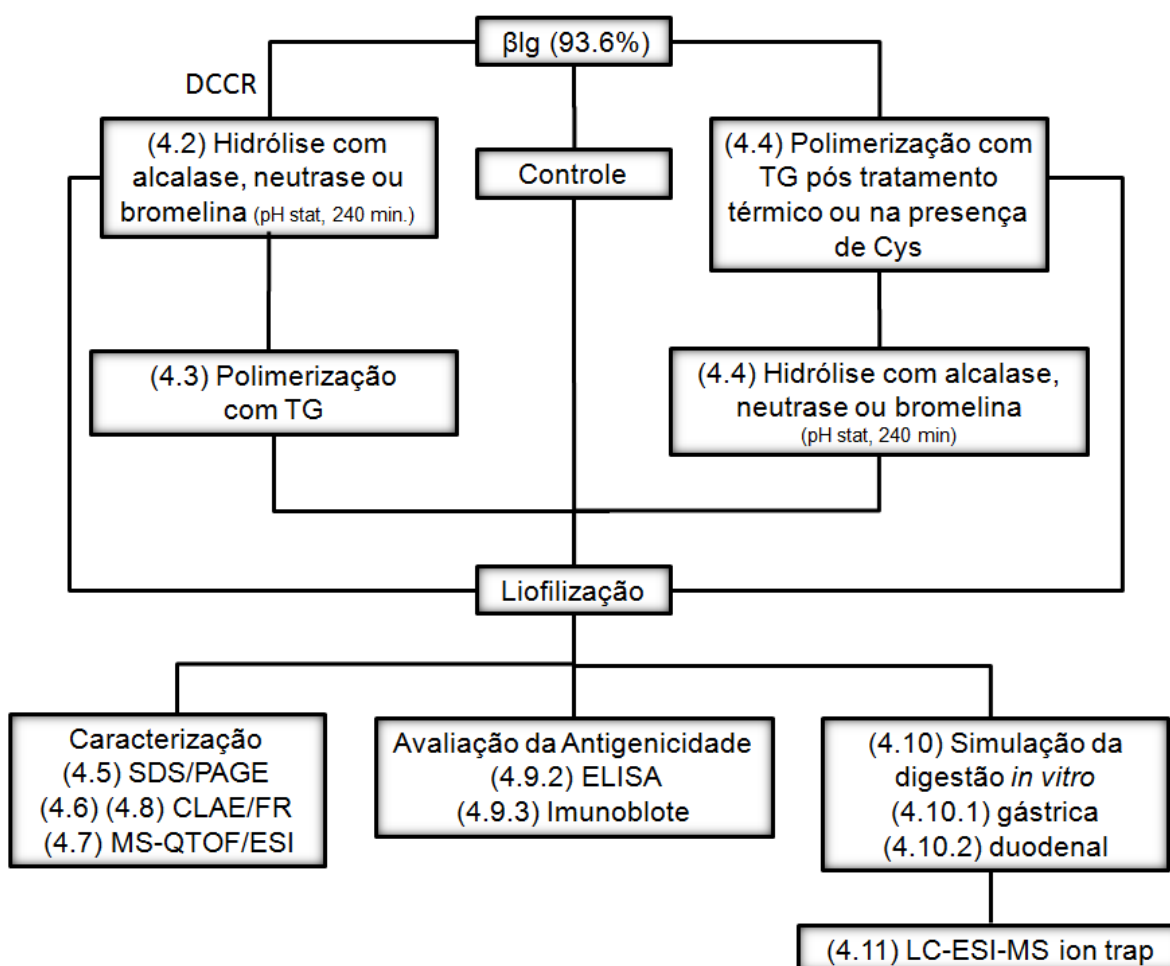


Figura 5. Fluxograma geral do experimento.

4.1 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática de cada enzima foi realizada para padronizar, em unidades ($U\ mg^{-1}$), a relação enzima:substrato a ser utilizada em cada experimento.

A atividade proteolítica das enzimas foi determinada utilizando-se solução 1,2% caseína (m/v; Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) em tampão fosfato ($0,1\ mol\ L^{-1}$), pH 7,5 e foi conduzida a 50, 55 e 60 °C, respectivamente para neutrase, bromelina e alcalase, por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução 30% de TCA, com concentração final de 15% (m/v). O material foi filtrado em papel Wathman 42 (*Schleicher & Schüll*, Dassel, Alemanha) e a absorbância do sobrenadante foi determinada em Espectrofotômetro UV-Vis (DU® - 70 Beckman, Fullerton, CA, EUA) a 275 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 et al., 1976). Foi utilizada uma curva de calibração (Figura 6) com 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu g\ ml^{-1}$ de L-tirosina (Sigma).

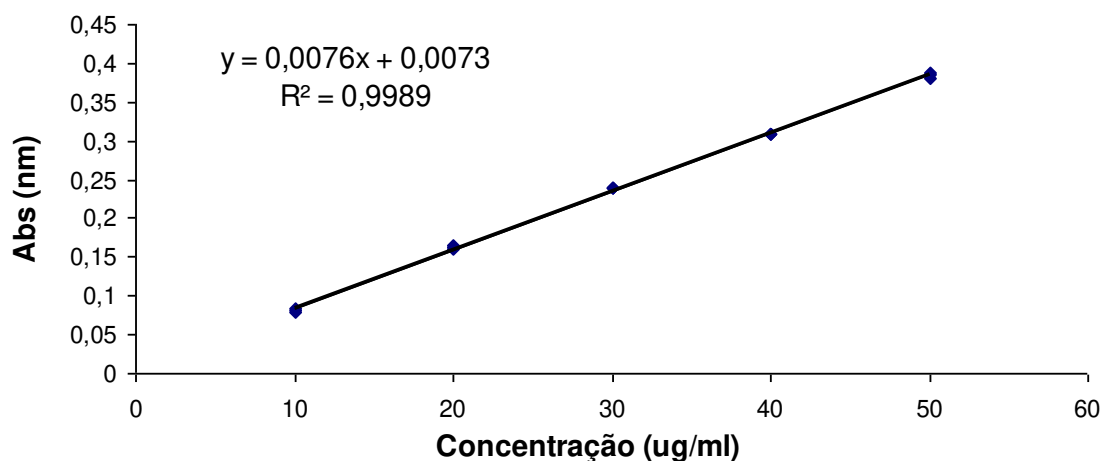


Figura 6. Curva padrão de tirosina para determinação da atividade enzimática da alcalase, neutrase e bromelina.

As atividades das enzimas alcalase, neutrase e bromelina, expressas em unidades por miligrama de enzima, foram 2,63; 1,38 e 0,32 U mg⁻¹, respectivamente.

4.2 Hidrólise da β -Lg

Para os procedimentos de hidrólise da β -Lg, as enzimas alcalase, neutrase e bromelina foram utilizadas separadamente. Estabeleceu-se as condições de hidrólise por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR), 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 dependentes: concentração de substrato e E:S no grau de hidrólise (GH) da β -Lg (variável dependente). Os níveis utilizados no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 2. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Tabela 2. Valores utilizados no DCCR para hidrólise da β -Lactoglobulina com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina.

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração de substrato (%) – [S]	2,2	3	5	7	7,8
Enzima:substrato – E:S	6,9	10	17,5	25	28

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

$$Y = \varphi(S, E:S) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{1,2} x_1 x_2$$

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.

Durante a hidrólise, utilizou-se o pH 7,5 para todas as reações enzimáticas e temperatura ótima para cada uma das enzimas, 50, 55 e 60 °C, respectivamente, para a neutrase, bromelina e alcalase, de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes. No procedimento, β -Lg foi dispersa em água, o pH foi ajustado em 7,5 com 0,5 mol L⁻¹ NaOH e equilibrada a temperatura adequada à enzima utilizada. A enzima previamente dissolvida em água e adicionada à suspensão. 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. A reação foi interrompida após 240 min por aquecimento a 90 °C por 10 min para a inativação da enzima. O GH foi definido pela equação (ADLER-NISSEN, 1979):

$$\text{GH (\%)} = \text{BN}_b(1/\alpha)(1/\text{MP})(1/h_{\text{tot}}) \times 100$$

onde: B = consumo de base em mL; N_b = normalidade da base; 1/α = média de grau de dissociação do grupo α-NH₂; MP = massa da proteína em g; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato protéico, cujo valor é de 8,8 mMol/g de proteína para a β-Lg (STĂNCIUC et al., 2008).

Para cada enzima, a condição ([S] e E:S) que promoveu o maior GH da proteína foi aquela utilizada para a reação de hidrólise antes ou após a polimerização com TG.

4.3 Polimerização pós hidrólise

Os hidrolisados obtidos de acordo com a condição selecionada no item 4.2 foram liofilizados para posterior utilização. A polimerização dos hidrolisados foi realizada nas condições definidas por Villas-Boas et al. (2010): 7% (p/v) de substrato 10 ou 25 U TG g⁻¹, em pH 8 (VILLAS-BOAS et al., 2010), 50 °C, por 180 min e interrompida por resfriamento das amostras a 4 °C e liofilizados. Os hidrolisados e os polimerizados pós hidrólise foram avaliados por eletroforese

SDS-PAGE/tricina e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), de acordo com o descrito nos itens 4.5 e 4.6, respectivamente.

4.4 Polimerização pré hidrólise

A β -Lg polimerizada foi obtida de duas maneiras: **(1)** β -Lg dispersa em água destilada (7% p/v) foi tratada termicamente a 80 °C por 60 min em banho termostaticado, resfriada a 50 °C e a enzima TG foi adicionada na concentração de 10 U g⁻¹ proteína; e **(2)** β -Lg foi dispersa (7% p/v) em solução 0,1 mol L⁻¹ de cisteína (Cys), utilizada como agente redutor, e a TG foi então adicionada (10U TG g⁻¹) (VILLAS-BOAS et al., 2010). A reação de polimerização nos dois experimentos foi conduzida a 50 °C por 180 min em banho termostaticado e resfriada a 4 °C em banho de gelo. A TG-WM utilizada nos experimentos perde completamente a atividade após 12 horas (EISSA et al., 2006).

Os polimerizados obtidos foram hidrolisados com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina nas condições estipuladas no item 4.2. A hidrólise foi conduzida por 240 min, monitorada pelo método de pH-stat. A inativação da hidrólise foi feita elevando-se a temperatura da suspensão à 90 °C por 10 min.

O teor de nitrogênio total nas amostras estudadas foi obtido pelo método de micro-Kjeldahl, usando o fator de conversão de 6,38 para o cálculo da proteína total (AOAC, 1995). Todo material tratado passou por liofilização previamente às análises de caracterização e antigenicidade.

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

O perfil eletroforético das amostras foi obtido em sistema SDS-PAGE/Tricina (SCHAGGER & VON JAGOW, 1987) em cuba vertical (Mini Protein II System, BioRad, EUA) e espaçadores de 1,5 mm. Utilizou-se um sistema descontínuo composto de gel de separação, gel espaçador e gel de empilhamento com 15,5, 10 e 4% de acrilamida, respectivamente. As amostras foram diluídas em tampão redutor (0,0625 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 2% SDS, 20% glicerol, 5% β -

mercaptoetanol, Coomassie Blue G-250, pH 6,8) e aquecidas a 95 °C / 2 min. Aplicou-se alíquotas de 10 µL da solução 0,5% de proteína (50 µg de proteína/poço) e após o tempo de corrida os géis foram mantidos por 12 h em solução fixadora metanol : ácido acético : água (4 : 1 : 5) e então corados por 48 h em solução Coomassie Blue G-250 0,025% (Sigma-Aldrich) em 10% ácido acético. Posteriormente os géis foram descorados em solução de 10% ácido acético. A MM dos peptídeos foi estimada utilizando padrão de baixa MM (Sigma) contendo as seguintes frações protéicas: bradiquinina (1,06 kDa); cadeia β da insulina bovina oxidada (3,49 kDa); aprotinina de pulmão bovino (6,50 kDa); α-La de leite bovino (14,20 kDa); mioglobina de coração de cavalo (17,00 kDa); isomerase triosefosfato de músculo de coelho (26,60 kDa).

4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE/FR)

A análise cromatográfica foi realizada em sistema CLAE-FR, consistindo de uma bomba Varian 9012 (Varian, Walnut Creek, CA, EUA - série 04824), detector de absorvância de duplo comprimento de onda Varian 9050, série 02570, coluna C18 Microsorb-MV™ (250 mm x 4,6 mm DI, 5 µm - *Raenin Instrument Inc Company* – Woburn, MA, EUA).

A composição dos solventes foi: (A) 0,03% de ácido trifluoracético (TFA) (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) em água Milli-Q e solvente (B) 0,03% TFA em metanol grau cromatográfico (Merck). As amostras (0,5% de proteína) foram solubilizadas no solvente B e filtradas em membranas de acetato de celulose 22 µm. A coluna, mantida em temperatura ambiente, foi equilibrada com 80% do solvente A e 20% do solvente B. Alíquotas de 20 µL/amostra foram injetadas, com eluição em fluxo constante de 1 mL min⁻¹ em gradiente linear até 80% do solvente B em 30 min, detecção à 214 nm. Após término da corrida, a coluna foi mantida em condição isocrática por 10 min e reequilibrada nas condições iniciais durante 20 min.

Para obtenção e análise dos dados, foi utilizado o software *Star Chromatography Workstation* (Varian). Os cromatogramas dos hidrolisados e polimerizados pré ou pós hidrólise foram divididos em 3 zonas: (I) alta

hidrofilicidade, até 8 min, com solução B na concentração entre 10% e 30%; (II) media hidrofilicidade, entre 8 e 18 min, com solução B entre 30% e 40% e (III) baixa hidrofilicidade, a partir de 18 min, com concentração de solução B acima de 40%.

4.7 Avaliação da massa intacta por espectrometria de massas

As amostras foram avaliadas por espectrometria de massas (MS) quanto à massa molecular (MM) intacta (Da). Solubilizou-se as amostras (0,1 % p/v) em 0,1% de ácido fórmico em 0,1% ácido fórmico (seguido de centrifugação a 12000 x g /5 min. Alíquota de 4,5 µL do sobrenadante da solução de cada amostra foi injetada e separada em coluna C18 (100 µm x 100 mm), sistema de cromatografia de ultraperformance (*nanoAcquity UPLC, Waters Corporation, MA, EUA*) acoplado com espectrômetro de massa *nano-eletrospray/Q-TOF (MicroMass, Waters)*, operado com fluxo de 600 nl min⁻¹. O gradiente utilizado na separação foi 0 - 50% Acetonitrila em ácido fórmico a 0.1%, por 45 min. O instrumento foi mantido em modo contínuo de aquisição de massas (*m/z*) 100–3.000, com scan de 1 s e tempo entre leituras de 0,1 s. Os espectros foram acumulados a partir de 300 scans e os dados de cargas múltiplas carregadas gerados pelo espectrômetro de massa na escala de *m/z* foram convertidos para escala de massa (MM) utilizando o *software MassLynx 4.1* baseado em Entropia Máxima (FERRIGE et al., 1992). Os parâmetros de processamento dos dados foram: resolução de 0,1 Da/canal, espectro de parâmetro de largura ajustada para 0,2 Da; razão de intensidade mínima entre picos sucessivos foram de 20% (esquerdo e direito), com deconvolução e suavização dos picos (2 × 3 canais, *Savitzky Golay*). Osvalores centróide de massa (MM) obtida foi determinada a partir de 80% do topo de pico e uma largura mínima de pico a meia altura de 4 canais. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (CPNEM – ABTLus, Campinas, SP).

4.8 Avaliação do cross-link - determinação do dipeptídeo (- ϵ -(γ -Glu)Lys)

Hidrólise exhaustiva

A avaliação da ligação (- ϵ -(γ -Glu)Lys) foi realizada segundo o método descrito por Sakamoto et al. (1995). As amostras polimerizadas com TG foram hidrolisadas exhaustivamente utilizando seqüencialmente as proteases Pronase (0,4 U mg⁻¹ de proteína) à 37 °C / 24 h por duas vezes consecutivas; leucina aminopeptidase (0,4 U mg⁻¹ de proteína) e prolidase (0,45 U mg⁻¹ de proteína) à 37 °C / 24 h; leucina aminopeptidase (0,4 U mg⁻¹ de proteína) à 37 °C / 24 h e, finalmente carboxipeptidase A (0,2 U mg⁻¹ de proteína) à 37 °C / 24 h. A digestão proteolítica exhaustiva, utilizando várias enzimas específicas, é fundamental para a identificação do *cross-link* na proteína, pois a hidrólise incompleta resultaria em subestimação do conteúdo do dipeptídeo ou não identificação do mesmo (SCHAFER et al., 1995).

Fracionamento

Para interrupção da hidrólise, houve o aquecimento das amostras (100 °C/10 min). Alíquotas de cada amostra (1% p/v) foram então separadas por sistema CLAE (Agilent série 1200, CA, EUA) para realização do fracionamento e isolamento da fração correspondente ao ϵ -(γ -Gln)Lys. Nesta etapa utilizou-se uma coluna semi preparativa ODS (SB-C18, 9.4 x 250 mm, 5 μ m), mantida a 25 °C e como fase móvel solução aquosa com 0,1% TFA, eluição com fluxo de 1 mL min⁻¹. O tempo de eluição do dipeptídeo foi estabelecido por meio do padrão sintético de ϵ -(γ -Gln)Lys (1mM) detectado a 210 nm.

Identificação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys nas amostras

As frações coletadas por fracionamento foram derivatizadas com o-ftalaldeído (OPA) e então analisadas por CLAE-FR com coluna C 8 (SB-C8 4.6 x 150 mm). Os solventes utilizados para eluição das amostras foram: solução (A) 20 mM de acetato de potássio (pH 5,5) com 0,1% tetraidrofurano (THF) e solução (B) metanol com 0,1 % THF. A separação foi realizada com gradiente linear de 20% (A) a 95% (B), com fluxo de 1,2 mL min⁻¹, por 20 min. A coluna foi mantida a 40 °C e, utilizou-se detector de fluorescência (Agilent série 1200), excitação a 334 nm e

emissão a 440 nm. O dipéptido sintético ϵ -(γ -Gln)Lys foi utilizado como padrão de referência para a estimativa do tempo de eluição do mesmo. Para quantificação do dipeptídeo nas amostras, fez-se uma curva padrão a partir de diferentes concentrações do padrão ϵ -(γ -Gln)Lys.

4.9 Avaliação da Antigenicidade

As análises foram conduzidas em colaboração com o Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – FCM, da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

4.9.1 Obtenção do anticorpo (IgE anti- β Lg)

Anticorpos policlonais (IgE anti- β Lg) foram obtidos pela imunização intraperitoneal de fêmeas camundongos da linhagem BALB/c, de acordo com a metodologia descrita por Villas-Boas et al. (2010). Foram utilizados 20 animais obtidos do CEMIB da Unicamp, com quatro semanas de vida e mantidos em gaiolas sob condições livre de patógenos específicos (SPF), com umidade e temperatura controladas. Os animais receberam, *ad libitum*, água autoclavada e ração isenta de β -Lg (padrão- Nuvilab CR-1) proveniente da Nuvital Nutrients Ltda (Colombo, PR, Brasil).

Os animais foram divididos em três grupos. O grupo 1 (N=10) foi sensibilizado com β -Lg nativa e os outros dois grupos foram os controles: grupo 2 (N=5) sensibilizado com adjuvante alúmen (3% $Al(OH)_3$) e grupo 3 (N=5) com solução salina estéril (0,9% NaCl). Na primeira etapa de sensibilização (tempo 0), os camundongos do grupo 1 foram sensibilizados via intraperitoneal e subcutânea com um total de 50 μ g de amostra adsorvida em 0,2 mL de alúmen por animal. Nos dias 14^o (tempo 1) e 21^o (tempo 2) os animais receberam individualmente dose reforço de 20 e 50 μ g de amostra adsorvida em 0,1 mL de solução salina e alúmen, respectivamente. Os grupos controle foram sensibilizados da mesma forma, porém apenas com 3% alúmen, sem β -Lg (grupo 2), ou somente com solução salina, sem β -Lg (grupo 3).

Após 30 dias (tempo 3) da sensibilização inicial, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 200 μL de tiopental sódico 2.5% (Cristália, SP, Brasil) para realização da punção cardíaca e coleta de sangue. Depois de coletado, o sangue foi centrifugado a temperatura ambiente a $380 \times g / 5 \text{ min}$ para obtenção do soro contendo o anticorpo. Todos os soros foram armazenados à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. A Figura 7 representa o protocolo de sensibilização dos animais.

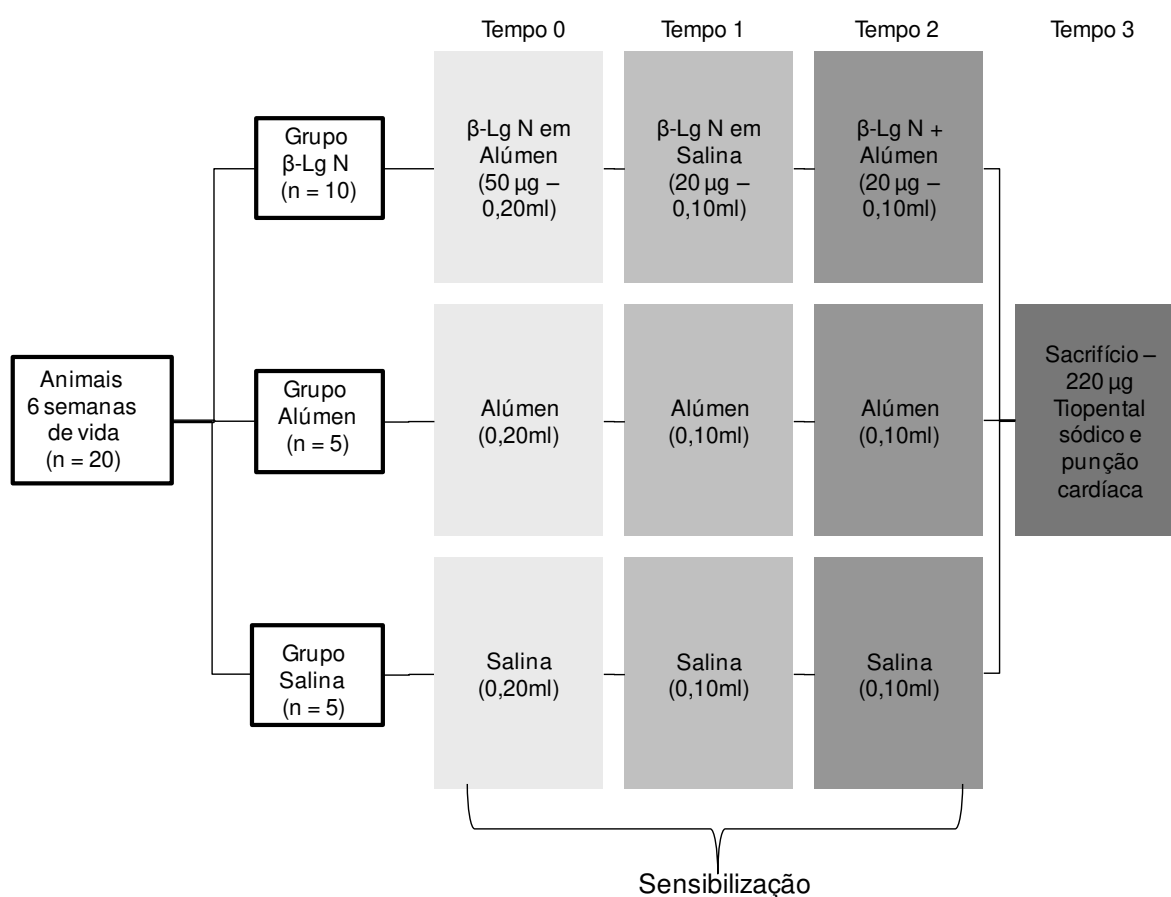


Figura 7. Fluxograma do protocolo de sensibilização dos animais.

4.9.2 Ensaio de ELISA – Atividade de ligação de IgE

Placas de polietileno de alta afinidade (*Corning, Cambridge, MA, EUA*) contendo 96 poços foram adsorvidas com 100 μL de suspensão da β -Lg nativa ou das amostras hidrolisadas ou polimerizadas ($0,1 \text{ mg prote\u00edna mL}^{-1}$) preparadas em

0,05 M de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Após lavagem (0,05% Tween 20 em PBS pH 7,4), os sítios inespecíficos foram bloqueados (soro bovino fetal 5% em PBS) e, na placa foram adicionados (100 μ L/poço) amostras de soro dos animais sensibilizados (1:250 em PBS). Após período de incubação (16h /4 °C), foi adicionado 100 μ L de anticorpo secundário 1:1000 em PBS (Rat Anti-mouse IgE) por 1 hora/25 °C , seguido por lavagem e adição de 100 μ L do anticorpo conjugado com peroxidase 1:60.000 em PBS (*HRP-conjugated*) por 2 h/25 °C. Os poços destinados à realização da curva padrão foram adsorvidos com IgE (*Purified Mouse IgE*) com concentração inicial de 12800 ng mL⁻¹, seguida por diluições seriadas (1:2) em 0,05 M de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) até concentração final de 25 ng mL⁻¹.

Os valores de absorvância foram medidos com filtro de 450 nm em espectrofotômetro *Spectra Max 190 (Molecular Devices, TO, Canada)*. Os cálculos foram feitos com auxílio do programa *SOFT Max PRO 3.0 (Molecular Devices)*.

4.9.3 Resposta de IgE avaliada por Imunoblote

As análises por Imunoblote foram realizadas de acordo com método descrito por Villas-Boas et al. (2010). As amostras β -Lg nativa, hidrolisadas e polimerizadas foram preparadas em tampão de solubilização com agente redutor e separados por eletroforese SDS-PAGE/tricina (SCHAGGER e VON JAGOW, 1987). Após o término da corrida, os géis foram embebidos por 30 min em tampão de transferência (20 mM Tris-HCl, 150 mM de glicina, 20% (v/v) de metanol, pH 8,0). Para montagem do sistema sanduíche utilizou-se membrana de nitrocelulose e folhas de papel de filtro Whatman®. A transferência das amostras dos géis para a membrana foi realizada a 250 mA (amperagem constante) por 20 minutos. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, foi utilizada solução de albumina sérica bovina – BSA (3% p/v) em PBS (solução salina fosfatada tamponada, pH 7,4) por 120 h.

Para a análise de IgE, as membranas foram incubadas com 10 mL de anticorpo primário (soro) correspondentes a cada grupo de animais, na proporção 1:250 em PBS por 16 h sob refrigeração em agitador de plataforma (Roquer, E.U.A.), seguida de incubação com 10 mL de anticorpo secundário (*Purified Rat*

Anti-mouse IgE monoclonal antibody) na proporção 1:1000 em PBS durante 60 min. Em seguida as membranas foram incubadas por 120 min com o anticorpo conjugado com peroxidase (*Anti-rat IgG whole molecule*) na proporção 1:50.000 em PBS, seguida por incubação de 15 min com tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) na concentração 0,05% em PBS e então com solução reveladora ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{NiSO}_4$) e peróxido de hidrogênio para se verificar os sítios de ligação da enzima.

4.10 Digestão *in vitro*

Os ensaios de digestão *in vitro* foram realizados com as amostras β -Lg nativa, os hidrolisados com alcalase ou bromelina e também os polimerizados pré ou pós hidrólise com estas enzimas. A digestão *in vitro* das amostras foi realizada em duas etapas distintas, simulando a digestão gástrica e duodenal. Esta etapa e a seguinte (4.11) foram desenvolvidas durante o período de doutorado sanduíche (CNPq) no Instituto de Investigação em Ciências de Alimentos (CIAL, CSIC, UAM, Madri, Espanha).

4.10.1 Simulação da digestão gástrica

A metodologia foi executada de acordo com Martos et al. (2010), adaptada de Moreno et al. (2005). As amostras ($5,9 \text{ mg mL}^{-1}$) foram solubilizadas em um preparado de Fosfatidilcolina (FC) elaborado a partir da solubilização completa da FC ($9,58 \text{ mg mL}^{-1}$) em fluido gástrico (SGF, 35 mM NaCl, pH 2,0). As amostras foram aquecidas por 15 min à 37 °C e então submetidas a digestão com pepsina, relação E:S 1:20 (p/p). Alíquotas foram coletadas nos tempos 0 e 60 min e a reação interrompida com adição de 1M NaHCO_3 até pH 7,0, obtendo a concentração final de proteína equivalente a 5 mg mL^{-1} .

4.10.2 Simulação da digestão duodenal

A digestão duodenal foi realizada em seguida à digestão gástrica. Após ajuste do pH em 7,0, foi adicionada a mistura contendo 20,3 mM Bis-Tris, 7,6 mM CaCl_2 , e em seguida 0,125 M de sais biliares, que corresponde a mistura

equimolar de taurocolato de sódio e ácido glicodeoxicolato, e então as enzimas tripsina de pâncreas bovino, E:S 1:238 (p/p); α -quimotripsina de pâncreas bovino E:S 1:115 (p/p); lipase pancreática de suíno, E:S 1:3895 (p/p); e colipase de pâncreas suíno, E:S 1:895 (p/p). O tempo de reação foi de 30 min a 37 °C, interrompida pela adição de inibidor de protease.

Os digeridos gástricos e gastrointestinais foram avaliados por CLAE-FR, em um sistema Waters 600 (*Waters Corporation*, MA, EUA), de acordo com a metodologia descrita por Martos et al. (2010), com adaptações. Alíquotas de 50 μ L dos digeridos (3,0 mg mL⁻¹) foram separados em coluna Hi-Pore RP-318 (250 mm x 4,6 mm), com fase móvel 0,37% (v/v) ácido trifluoracético em água Milli-q (solvente A) e 0,27% (v/v) ácido trifluoracético em acetonitrila como solvente B. O gradiente utilizado na separação foi de 100% do solvente A passando a 60% do solvente B em 60 min, sendo mantido de forma isocrática por 10 min e reequilibrada às condições iniciais por 10 min. O fluxo foi de 1 mL min⁻¹ e a detecção à 220 nm. Os dados foram processados com auxílio do *software Empower Pro* (*Waters*). Nas análises dos cromatogramas, considerou-se: região de alta hidrofiliicidade (entre 0 e 40 minutos), com maior porcentagem de solução A; média hidrofiliicidade (entre 30 e 50 minutos), com solução B entre 30% e 50%; e baixa hidrofiliicidade (a partir de 50 minutos de análise), com solução B acima de 50%.

4.11 Análise dos digeridos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS ion trap)

As amostras submetidas à digestão *in vitro* (4.10) foram avaliadas por cromatografia líquida com detecção no ultravioleta acoplada a espectrometria de massas (MS) de acordo com a metodologia descrita por Chicón et al. (2006). Para separação cromatográfica, foram utilizadas as condições de análise descritas no tópico anterior, em equipamento Agilent, Série 1100 (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Alemanha), conectado com um *Esquire 3000 quadrupolo ion Trap* (*Bruker Daltonik GmbH*, Bremen, Alemanha), com ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS ion trap).

Os parâmetros de análise foram: pressão do nebulizados 60 psi, fluxo contínuo de gás N₂ (12 L min⁻¹), temperatura 350 °C, capilar mantido a 4 kV. A faixa de *m/z* obtida foi 200–2500. A partir da análise de MS, os 5 picos mais intensos foram analisados por MS/MS. O sinal de *threshold* utilizado para a análise de MS/MS foi 10.000 Da e os íons precursores foram isolados dentro de uma faixa de 4 *m/z*, fragmentados com uma rampa de tensão variando de 0,3 a 2V. Utilizando o *software* Data Analysis™ (versão 3.0, Bruker Daltonik) os dados espectrais de *m/z* foram processados e transformados em espectros representando valores de massas. O *software* Biotools (versão 3.2, Bruker Daltonik) foi utilizado para processar os dados obtidos dos espectros de MS/MS e identificação das sequências peptídicas. O modo de seqüenciamento foi automático, no entanto as sequências identificadas foram validadas manualmente no espectro de massas correspondentes.

4.12 Análise *in silico* do grau de antigenicidade versus peptídeos da β-Ig

Para ilustração do grau de antigenicidade das sequências aminoacídicas da β-Ig, fez-se uma simulação da clivagem da proteína com quimotripsina, com auxílio do programa CLC-bio *Main Workbench*®, versão 6.1 (Science Park Aarhus, Dinamarca).

4.13 Análise Estatística

Para o DCCR, a análise de variância (ANOVA), foi feita pelo programa *Statistica* 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA). Apenas as variáveis com nível de confiança ≥ 95% ($P \leq 0,05$) foram consideradas significativas.

A análise estatística da resposta de IgE, obtida por ensaio ELISA, foi realizada utilizando o *software* SPSS *Statistics* 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), com testes não paramétricos (pós-teste *Kruskall-Wallis*, ou *Mann-Whitney*), e nível de confiança ≥ 95% ($P \leq 0,05$).

5. NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS

- **β -Lg:** β -Lactoglobulina;
- **β -Lg TT TG:** 7% β -Lg tratada termicamente (80 °C / 60 min) e polimerizada com TG (10U TG g⁻¹);
- **β -Lg Cys TG:** 7% β -Lg polimerizada com TG (10U TG g⁻¹) na presença de 0,1 mol L⁻¹ Cys;
- **β -Lg alcalase:** 3% β -Lg hidrolisada com alcalase (25U TG g⁻¹);
- **β -Lg TT TG/alcalase:** 7% β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG (10U TG g⁻¹) e hidrolisada com alcalase (25 U g⁻¹);
- **β -Lg Cys TG/alcalase:** 7% β -Lg polimerizada com TG (10U TG g⁻¹) na presença de 0,1 mol L⁻¹ Cys e hidrolisada com alcalase (25U g⁻¹);
- **β -Lg alcalase/10TG:** 3% β -Lg hidrolisada com alcalase (25U TG g⁻¹) e polimerizada com TG (10U TG g⁻¹);
- **β -Lg alcalase/25TG:** 3% β -Lg hidrolisada com alcalase (25U TG g⁻¹) e polimerizada com TG (25U TG g⁻¹);
- **β -Lg TT TG/neutrase:** 7% β -Lg tratada termicamente, polimerizada com TG (10U TG g⁻¹) e hidrolisada com neutrase (25U g⁻¹);
- **β -Lg Cys TG/neutrase:** 7% β -Lg polimerizada com TG (10U TG g⁻¹) na presença de 0,1 mol L⁻¹ Cys e hidrolisada com neutrase (25U g⁻¹);
- **β -Lg alcalase/10TG:** 3% β -Lg hidrolisada com neutrase (25U TG g⁻¹) e polimerizada com TG (10U TG g⁻¹);
- **β -Lg alcalase/25TG:** 3% β -Lg hidrolisada com neutrase (25U g⁻¹) e polimerizada com TG (25U TG g⁻¹);
- **β -Lg TT TG/bromelina:** 7% β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG (10U TG g⁻¹) e hidrolisada com bromelina (25U g⁻¹);
- **β -Lg Cys TG/bromelina:** 7% β -Lg polimerizada com TG (10U TG g⁻¹) na presença de 0,1 mol L⁻¹ Cys e hidrolisada com bromelina (25U g⁻¹);
- **β -Lg bromelina/10TG:** 3% β -Lg hidrolisada com bromelina (25 U g⁻¹) e polimerizada com TG (10U TG g⁻¹);
- **β -Lg bromelina/25TG:** 3% β -Lg hidrolisada com bromelina (25 U g⁻¹) e polimerizada com TG (25U TG g⁻¹).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção e Caracterização dos Hidrolisados

Para determinação das melhores condições de hidrólise da β -Lg, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes, concentração de substrato e E:S. A matriz com os ensaios experimentais e os resultados de GH para cada enzima estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Matriz do delineamento e resposta grau de hidrólise (GH %) da β -Lg.

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente – GH(%)*		
	Concentração substrato (%)	E/S (U g ⁻¹ proteína)	alcalase	neutrase	bromelina
1	3,0	10,0	9,8	3,0	2,5
2	3,0	25,0	12,7	3,9	4,1
3	7,0	10,0	8,0	2,8	1,7
4	7,0	25,0	10,9	2,5	2,9
5	2,2	17,5	10,7	3,4	3,7
6	7,8	17,5	8,8	2,6	2,0
7	5,0	6,9	8,7	1,5	1,7
8	5,0	28,0	11,7	3,2	3,0
9	5,0	17,5	10,9	1,9	2,0
10	5,0	17,5	11,2	1,8	1,9
11	5,0	17,5	11,8	1,9	2,0

* determinado pelo método do pH-stat; U: unidade de enzima; E:S- relação enzima:substrato

O GH variou de 8,0 a 12,5% quando utilizada a alcalase; 1,5 a 3,9% para a neutrase e 1,7 a 4,1 para a bromelina. Para análise dos resultados foram utilizados os valores reais das variáveis independentes, mostrados na Tabela 3.

Foram considerados significativos os parâmetros com p -valores menores que 5% ($P < 0,05$) (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4. Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com a enzima alcalase

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de conf. - 95 %	Lim. de conf. + 95 %
Média	3,595259	2,237865	1,60656	0,169061	-2,15735	9,347873
x1 (L)	1,323950	0,582317	2,27359	0,072114	-0,17294	2,820843
x1 (Q)	-0,171915	0,050559	-3,40028	0,019245	-0,30188	-0,041949
x2 (L)	0,446989	0,149236	2,99518	0,030267	0,06336	0,830612
x2 (Q)	-0,007984	0,003567	-2,23806	0,075398	-0,01715	0,001186
1Lx2L	-0,000000	0,015793	-0,00000	1,000000	-0,04060	0,040597

Tabela 5. Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com a enzima neutrase.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de conf. - 95 %	Lim. de conf. + 95 %
Média	6,11537	1,774517	3,44622	0,018312	1,55383	10,67692
x1 (L)	-1,50075	0,461749	-3,25014	0,022692	-2,68771	-0,31378
x1 (Q)	0,16790	0,040091	4,18805	0,008588	0,06485	0,27096
x2 (L)	-0,05837	0,118337	-0,49322	0,642754	-0,36256	0,24583
x2 (Q)	0,00597	0,002829	2,10914	0,088718	-0,00131	0,01324
1Lx2L	-0,02000	0,012523	-1,59705	0,171144	-0,05219	0,01219

Tabela 6. Coeficientes de regressão para a resposta GH (%) obtida com a enzima bromelina.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de conf. - 95 %	Lim. de conf. + 95 %
Média	5,85852	0,962801	6,08487	0,001734	3,38356	8,333476
x1 (L)	-1,40956	0,250531	-5,62630	0,002457	-2,05357	-0,765553
x1 (Q)	0,12497	0,021752	5,74525	0,002240	0,06906	0,180887
x2 (L)	-0,04118	0,064206	-0,64134	0,549539	-0,20623	0,123869
x2 (Q)	0,00435	0,001535	2,83521	0,036451	0,00041	0,008297
1Lx2L	-0,00667	0,006795	-0,98116	0,371571	-0,02413	0,010800

Os cálculos da ANOVA para o GH obtido com cada enzima estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9. Como F_{calc} para a regressão, 18,3, 7,11 e 31,73 respectivamente para as enzimas alcalase, neutrase e bromelina foram significativos e a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi alta, aproximadamente 95% para a alcalase e bromelina e aproximadamente 87% para a neutrase. Pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, principalmente por se tratar da grande variabilidade inerente aos processos enzimáticos.

Com as superfícies de respostas geradas pelo modelo (Figura 8, página 63), foi possível determinar as condições de concentração de substrato e relação E:S em que se obtém maior ou menor grau de hidrólise da β -Lg. Nas condições do estudo, quando utilizada a enzima alcalase (Figura 8a), a faixa ótima de concentração de substrato é de 2 e 6% e para a relação E:S entre 12 e 28 U g^{-1} de proteína. Para a neutrase e bromelina (Figuras 8b e 8c, respectivamente), a faixa ótima de concentração de substrato é de 2 e 3% e para a relação E/S entre 18 e 28 U g^{-1} de proteína.

Tabela 7. Análise de ANOVA para o grau de hidrólise da β -Lactoglobulina obtido com alcalase.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	P-valor
Regressão	20,559	5	4,111888	18,31772	0,05
Resíduo	1,122	5	0,224476		
F.ajuste	0,702380	3	0,234127		
E. puro	0,420000	2	0,210000		
TOTAL	21,681820	10			

% variação explicada (R^2)= 94,8%; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Tabela 8. Análise de ANOVA para o grau de hidrólise da β -Lactoglobulina obtido com neutrase.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	P-valor
Regressão	5,023	5	1,004674	7,118056	0,05
Resíduo	0,706	5	0,141144		
F.ajuste	0,699055	3	0,233018		
E. puro	0,006667	2	0,003334		
TOTAL	5,729091	10			

% variação explicada (R^2)= 87,6%; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Tabela 9. Análise de ANOVA para o grau de hidrólise da β -Lactoglobulina obtido com Bromelina.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	P-valor
Regressão	6,592	5	1,318449	31,73118	0,05
Resíduo	0,208	5	0,041551		
F.ajuste	0,201086	3	0,067029		
E. puro	0,006667	2	0,003334		
TOTAL	6,800000	10			

% variação explicada (R^2)= 96,9%; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

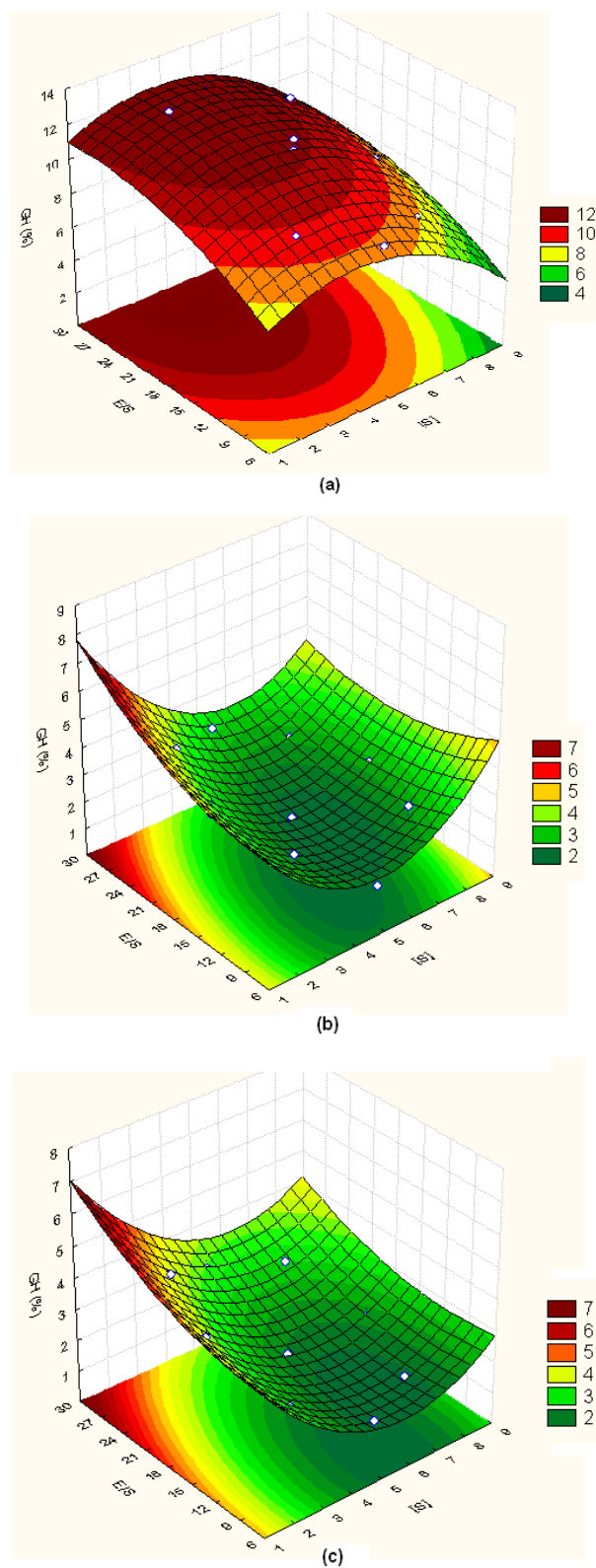


Figura 8. Superfície de resposta para a resposta GH da β -Lg em função da concentração de Substrato ($[S]$) e relação enzima-substrato (E/S). **(a)** hidrólise com alcalase; **(b)** hidrólise com neutrase; **(c)** hidrólise com bromelina.

Para o estudo da polimerização pré ou pós hidrólise, foram selecionadas as condições de hidrólise com a quais se obteve maior GH da β -Lg. Foi verificado que para as três enzimas a concentração de substrato 3% (p/v) e E:S 25 U g⁻¹ resultaram em maior GH da proteína: 12,7% quando utilizado alcalase, 4,1 utilizando bromelina e 3,9% com neutrase, correspondente ao ensaio 2 (Tabela 3, página 59).

6.2 Obtenção e caracterização dos hidrolisados e polimerizados pós hidrólise

Os hidrolisados obtidos foram tratados com a TG, sendo que as condições utilizadas na polimerização foram: 7% de substrato e 10 ou 25 U TG g⁻¹ de proteína. Os perfis eletroforéticos da β -Lg hidrolisada e β -Lg polimerizada pós hidrólise estão apresentados na Figura 9.

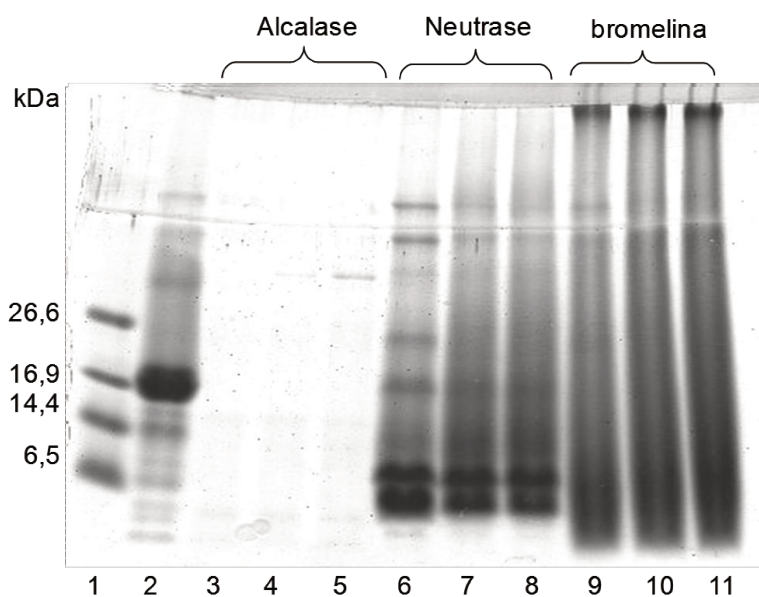


Figura 9. Perfil eletroforético (SDS-PAGE/tricina) em meio redutor da β -Lg nativa, β -Lg hidrolisada com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina e hidrolisados polimerizados com a TG (10 ou 25 U g⁻¹ de proteína). Colunas: (1) Padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg; (3) β -Lg /alcalase; (4) β -Lg alcalase/10 TG; (5) β -Lg alcalase/25TG; (6) β -Lg/neutrase; (7) β -Lg neutrase /10 TG; (8) β -Lg neutrase /25 TG; (9) β -Lg/bromelina; (10) β -Lg bromelina/10 TG; (11) β -Lg bromelina /25 TG.

Comparando-se os perfis dos hidrolisados obtidos com alcalase ou com bromelina tratados ou não com a TG, não foi verificado aumento da MM aparente (Figura 9, colunas 3 – 5 e 9 –11). Apenas o hidrolisado obtido com neutrase tratado com TG apresentou diminuição da intensidade das bandas correspondentes ao monômero da β -Lg, sugerindo que com o processo de polimerização, produtos com diferentes massas moleculares, acima de 18 kDa, foram formados (Figura 9, colunas 7 e 8).

A não detecção do aumento da MM pela técnica de eletroforese SDS-PAGE dos materiais tratados com TG pós hidrólise não significa, necessariamente, que não houve *cross-link* e/ou aumento da MM da proteína, já que uma concentração baixa de material na região superior e em toda extensão do gel de separação pode dificultar a determinação da MM por esta técnica, conforme também relatado por Flanagan & Fitzgerald (2002) e Lorenzen et al. (1998), para hidrolisados do caseinato tratados com TG. Segundo estes autores, não houve aumento da MM após tratamento com TG, porém houve diminuição do número de grupamentos amínicos livres, indicando polimerização. Em concordância com este estudo, Sabadin (2010) verificou que a polimerização da β -Lg pós hidrólise resultou em menor GH da amostra (determinado pelo método de trinitrobenzenosulfônico - TNBS) em comparação ao controle não tratado com a TG, sugerindo que houve polimerização (SABADIN, 2010).

Os perfis cromatográficos (CLAE-FR) das amostras polimerizadas pós hidrólise com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina estão apresentados na Figura 10, página 67. No cromatograma do hidrolisado obtido com alcalase (Figura 10 - A) observa-se grande número de picos distribuídos nas regiões do cromatograma de alta, média e baixa hidrofiliidade. Este perfil sugere que, devido à ampla especificidade da alcalase, pequenos peptídeos hidrofílicos foram formados. Os cromatogramas da amostra polimerizada (10U TG g⁻¹) pós hidrólise com alcalase (Figura 10 - B) ou 25 U TG g⁻¹ (Figura 10 - C) apresentam-se semelhantes ao da amostra somente hidrolisada (Figura 10 - A). O hidrolisado com a neutrase (Figura 10 - D) apresentou caráter menos hidrofílico do que o obtido com alcalase (Figura 10 - A). Estes resultados devem-se possivelmente à

maior especificidade da neutrase, com sítios de clivagem que abrangem preferencialmente ligações envolvendo aminoácidos hidrofóbicos (PENÃS et al., 2006). Após a reação de polimerização, houve diminuição da intensidade dos picos da região II e aumento na região III dos cromatogramas (Figura 10 -E e F) em relação à amostra somente hidrolisada (Figura 10 - D), sugerindo que frações mais hidrofóbicas e/ou peptídeos de maior MM foram formados após o tratamento com a TG.

O hidrolisado com bromelina apresentou picos predominantemente na região de hidrofobicidade baixa (Figura 10 - G), indicando a presença de peptídeos de maior MM e/ou mais hidrofóbicos que os obtidos com alcalase ou neutrase. Não foram observadas diferenças quanto ao perfil do hidrolisado com bromelina (Figura 10 - G) em relação aos perfis dos polímeros obtidos pós hidrólise com esta enzima (Figura 10, H - I).

Nos cromatogramas dos hidrolisados com neutrase tratados ou não com TG (Figura 10, D - F), não foi observado pico referente à β -Lg, ao contrário do que foi observado no perfil eletroforético (Figura 9), que mostrou a presença de β -Lg na forma monomérica, no perfil do hidrolisado com neutrase (Figura 9, coluna 6). Possivelmente, na preparação destas amostras para a análise cromatográfica, a β -Lg residual não foi solubilizada ou então formou agregado, não sendo detectada em seu tempo de eluição.

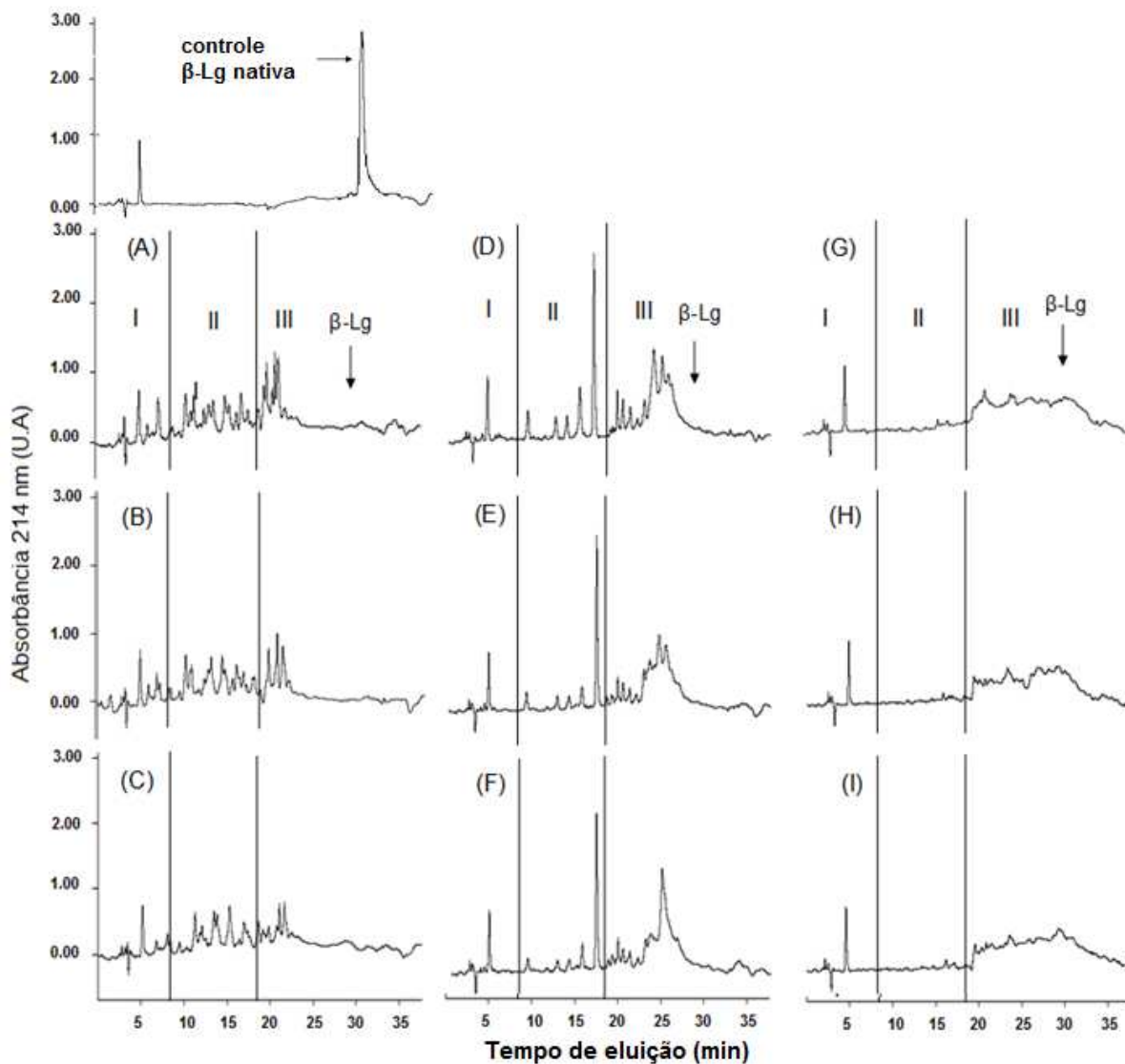
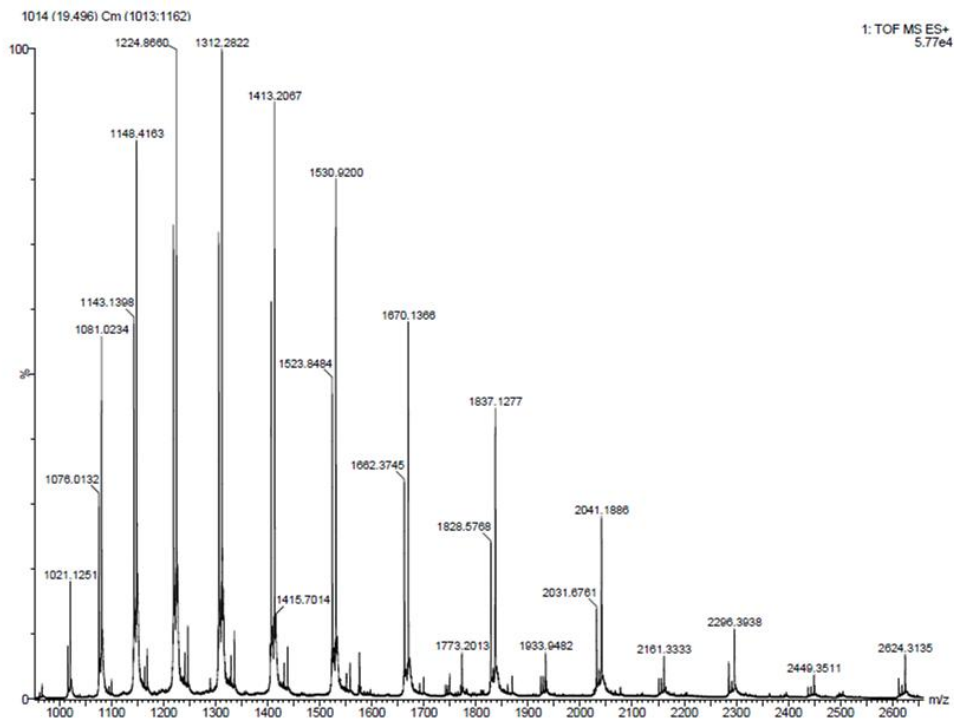


Figura 10. Cromatogramas de CLAE-FR com detecção UV a 214 nm de hidrolisados da β -Lg nativa, hidrolisados com alcalase, neutrase ou bromelina e hidrolisados submetidos à polimerização com TG (polimerização pós hidrólise). (A) β -Lg/alcalase; (B) β -Lg alcalase/10TG; (C) β -Lg alcalase/ 25 TG; (D) β -Lg/neutrase; (E) β -Lg neutrase/10 TG; (F) β -Lg neutrase/25TG; (G) β -Lg/bromelina; (H) β -Lg bromelina/10TG; (I) β -Lg bromelina/25TG. Região I: alta hidrofiliicidade, região II: média hidrofiliicidade, região III: baixa hidrofiliicidade.

A β -Lg nativa e as amostras polimerizadas pós hidrólise foram caracterizadas por MS, quanto às massas intactas (Da) correspondentes. A análise de massa intacta tem sido utilizada devido à capacidade de detecção, identificação e caracterização de uma determinada proteína presente na forma isolada, modificada ou como parte de uma mistura (DURBIN et al., 2010). Há estudos sobre a determinação da MM, por exemplo, da melitina (2.846,4 Da), oligonucleotídeos sintéticos (4.262,8 Da), mioglobina (16.950,4 Da) e de subunidades de β -Lg (18.277,1 Da) (FENN et al., 1989), ou ainda a análise de biopolímeros (oligonucleotídeos e proteínas), com MM média de 130.000 Da, podendo ser superior (COVEY et al., 1988). Para se obter a precisão de 1,0 Da na determinação da MM, necessita-se apenas 1 μ mol do material a ser analisado (COVEY et al., 1988).

Na Figura 11 está apresentado o espectro de massas (m/z) obtido para a β -Lg nativa (Figura 11 - A), correspondente a MM de 18.362,08 Da (β -Lg variante A) e 18.274,64 Da (β -Lg variante B), identificados como sendo os picos de maior intensidade após tratamento dos dados do espectro por entropia máxima (Figura 11 - B). A diferença de massas entre as variantes A e B da β -Lg é atribuída às substituições dos aminoácidos nas posições 64 (Asp por Gly) e 118 (Val por Ala) (SAKURAI & GOTO, 2002). Além disso, a β -Lg-A exibiu maior intensidade do que a β -Lg-B, indicando maior proporção de primeira variante na amostra utilizada no presente estudo. Estes resultados são consistentes com os obtidos por Quin et al. (1999) e Hemung et al. (2009), que relataram que 60% da β -Lg corresponde à variante A e o restante (40%) à variante B.

(A)



(B)

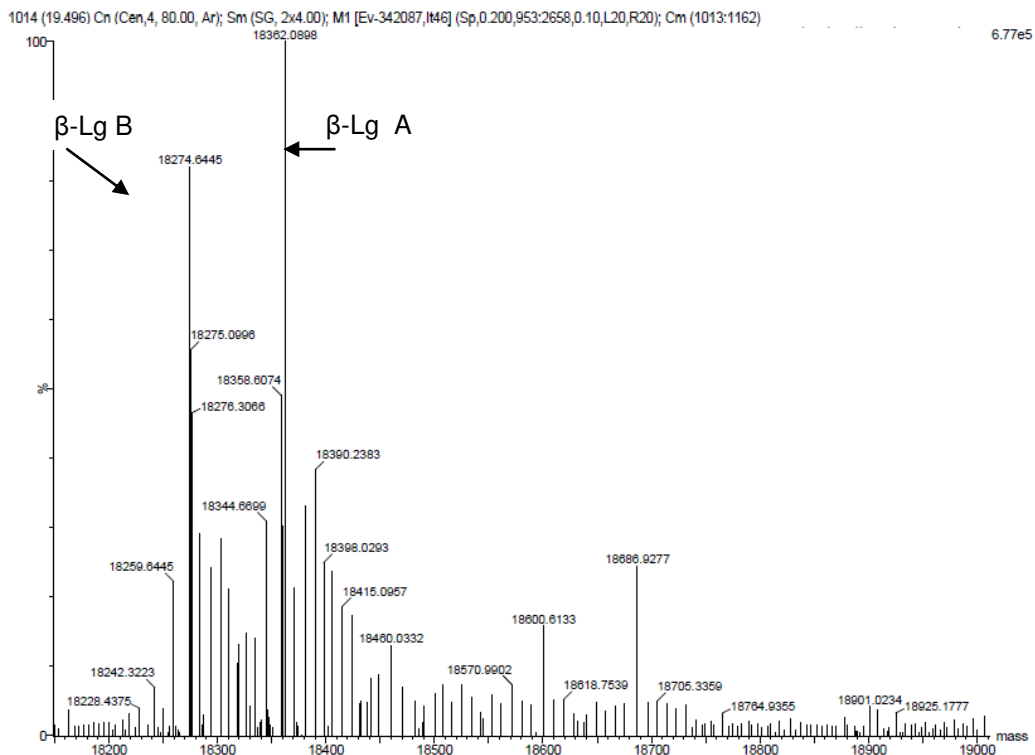


Figura 11. (A) Espectro de massas da β -Lg nativa detectado por MS-QTOF/ESI; **(B)** Deconvolução do espectro de massas **(A)** com identificação da massa molecular da β -Lg variantes A e B.

A análise de massa intacta dos hidrolisados da β -Lg polimerizados com TG mostrou que, dependendo do tipo de tratamento utilizado, diferentes MM são detectadas (Tabela 10).

Tabela 10. Análise da massa intacta (MM), por espectrometria de massas (MS-QTOF/ESI), das amostras polimerizadas pós hidrólise com alcalase, bromelina ou neutrase.

Amostras avaliadas	MM1 (Da)*	MM2 (Da)*
β-Lg alcalase/10TG	9.181,82	30.602,88
β-Lg alcalase/25TG	9.181,38	30.632,05
β-Lg bromelina/10TG	61.052,94	69.757,84
β-Lg bromelina/25TG	45.654,72	61.803,37
β-Lg neutrase/10TG	54.808,46	69.664,02
β-Lg neutrase/25TG	49.571,46	68.942,48

* MM= massas moleculares com maiores intensidades detectadas nos espectros de massas.

A amostra de β -Lg tratada com TG (10 ou 25 Ug^{-1}) pós-hidrólise com alcalase apresentou peptídeos de MM menor em comparação às outras amostras, 9.181,82 Da, e outras de MM média, de aproximadamente 30.600 Da.

A amostra β -Lg bromelina/10TG apresentou polímeros com $\text{MM} \geq 61.052,94$ Da. Para a amostra β -Lg bromelina/25 TG, além dessa faixa de MM, também houve detecção de outros produtos, com MM 45.654,72 Da. Nos polimerizados pós hidrólise com neutrase foram detectadas frações com MM de 54.808,46 Da e 49.571,46 Da na amostra β -Lg neutrase/10TG e β -Lg neutrase/25TG,

respectivamente; além da presença de produtos com MM de aproximadamente 69.000 Da para ambas as amostras. As diferenças de MM intacta dos polímeros foi dependente da protease utilizada, a polimerização pós-hidrólise com neutrase ou bromelina levou à formação de polímeros de MM mais elevada, comparados aos polímeros obtidos pós hidrólise com alcalase. Em concordância com estes resultados, a análise por CLAE-FR mostrou que a hidrólise com bromelina ou neutrase seguida de polimerização com TG resultou na formação de produtos com carácter mais hidrofóbico (Figura 10, página 67), comparados aos obtidos pós hidrólise com alcalase, indicativo de MM mais elevada.

Quanto à concentração de TG, os resultados indicaram que não houve diferença importante em relação a MM detectada quando utilizado maior ou menor concentração de TG (10 ou 25 U TG g⁻¹). Alguns autores relataram que a polimerização da α -La e β -Lg atinge uma taxa limite quando a concentração de TG chega a 10 U g⁻¹ (GAUCHE et al., 2008; EISSA et al., 2004).

6.3 Obtenção e caracterização dos polimerizados pré-hidrólise

Os perfis eletroforéticos da β -Lg polimerizada com TG e das amostras polimerizadas com TG e hidrolisadas com alcalase, neutrase ou bromelina estão apresentados na Figura 12.

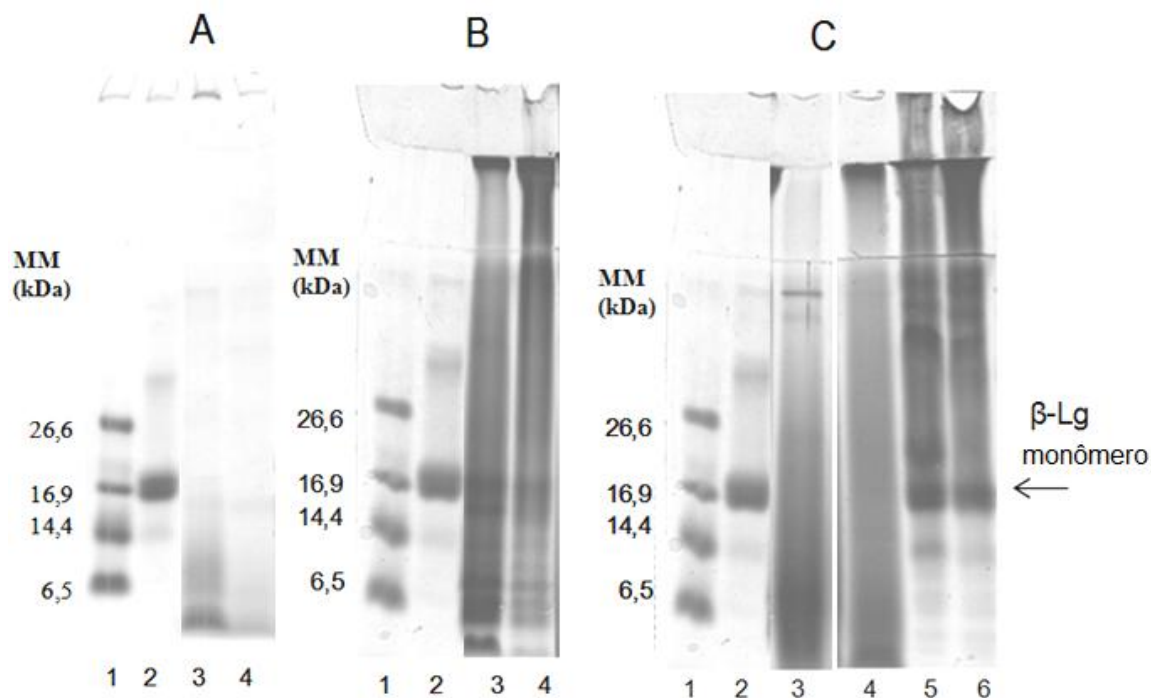


Figura 12. Perfil eletroforético SDS-PAGE/tricina, em meio redutor da β -Lg nativa, β -Lg polimerizada com TG (β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG) e polímeros hidrolisados com as diferentes proteases (polimerização pré hidrólise). Colunas (1) padrão de MM (6,5 a 26,6 kDa); (2) β -Lg nativa; **A** – (3) β -Lg TT TG/alcalase; (4) β -Lg Cys TG /alcalase; **B** - (3) β -Lg TT TG/neutrase; (4) β -Lg Cys TG/neutrase; **C** - (3) β -Lg TT TG/ bromelina; (4) β -Lg Cys TG/bromelina; polimerizados não hidrolisados (5) β -Lg TT TG e (6) β -Lg Cys TG.

As amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG (Figura 12 C, colunas 5 e 6) apresentaram diminuição da intensidade da banda referente ao monômero da β -Lg e o aparecimento de material que não conseguiu penetrar no gel de empilhamento, além de outras bandas localizadas no início do gel de separação, o que indica a formação de polímeros de MM alta. As bandas largas e difusas em toda a extensão do gel de separação sugerem a formação de polímeros de MM distintas.

Após a hidrólise dos polimerizados β -Lg TT TG ou β -Lg Cys TG com alcalase, houve o quase completo desaparecimento dos produtos de MM alta (Figura 12 - A, colunas 3 e 4), resultando na prevalência de peptídeos menores que 6,5 kDa. Estas mesmas amostras polimerizadas submetidas à hidrólise com bromelina ou neutrase apresentaram produtos de distribuição de MM ampla. A

permanência de bandas na parte superior do gel sugere que alguns de alta MM foram resistentes à proteólise. (Figuras 12 - B e 12 - C, colunas 3 e 4).

Na Figura 13 estão apresentados os perfis dos cromatográficos (CLAE-FR) das amostras polimerizadas com TG pré-hidrólise com as enzimas alcalase, neutrase ou bromelina. Os cromatogramas dos polimerizados hidrolisados com a alcalase (Figura 13 - A e B) apresentaram vários picos nas regiões de hidrofobicidade alta e média, confirmando o observado por SDS-PAGE, que houve hidrólise dos polímeros β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG (Figura 12 - A, colunas 4 e 5, página 72). Não foi observado nos cromatogramas pico referente à β -Lg, assim como no cromatograma da amostra somente hidrolisada pela alcalase (Figura 10 - A, página 67).

Os polímeros hidrolisados com neutrase apresentaram pico correspondente a β -Lg em seus perfis cromatográficos (Figura 13 - C e D), e menor quantidade de picos nas regiões I e II, comparado ao perfil dos polimerizados hidrolisados com alcalase, indicando hidrólise menos eficiente.

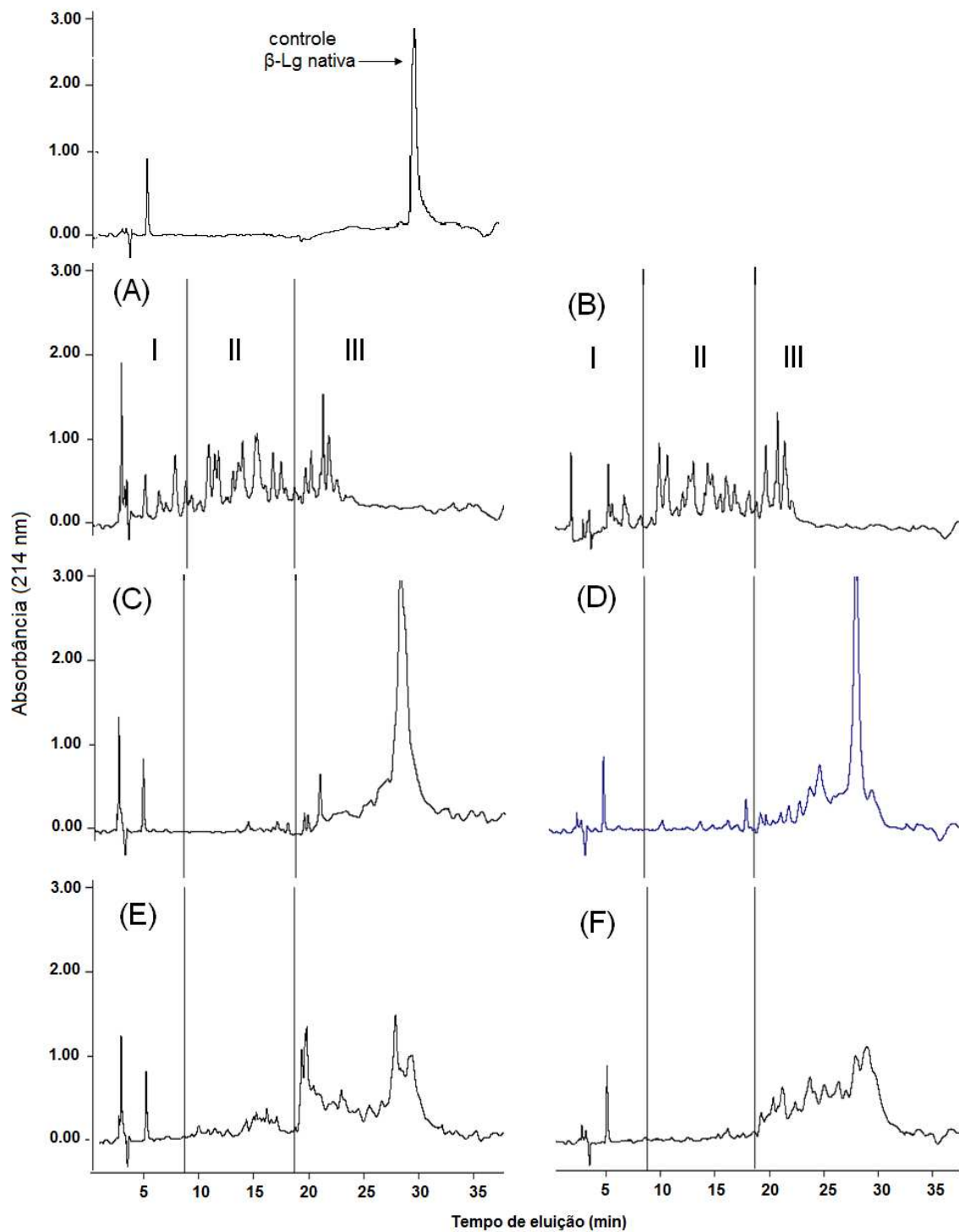


Figura 13. Cromatogramas de CLAE-FR com detecção UV a 214 nm de polimerizados da β -Lg submetidos à hidrólise com alcalase, neutrase ou bromelina (polimerização pré hidrólise). (A) β -Lg TT TG/alcalase; (B) β -Lg Cys TG/alcalase; (C) β -Lg TT TG/neutrase; (D) β -Lg Cys TG/neutrase; (E) β -Lg TT TG/bromelina; (F) β -Lg Cys TG/bromelina. Região I: alta hidrofiliçidade, região II: média hidrofiliçidade, região III: baixa hidrofiliçidade.

Os cromatogramas dos polímeros hidrolisados com bromelina (Figura 13 E - F) apresentaram pico referente à β -Lg e maior número e intensidade de picos na região hidrofóbica do cromatograma do que o perfil obtido para a amostra somente hidrolisada com esta enzima (Figura 10 - G, página 67).

As amostras somente polimerizadas e aquelas polimerizadas e hidrolisadas foram caracterizadas por espectrometria de massas quanto às MM correspondentes. Na Figura 14 estão apresentados os espectros de massas para as amostras polimerizadas β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG.

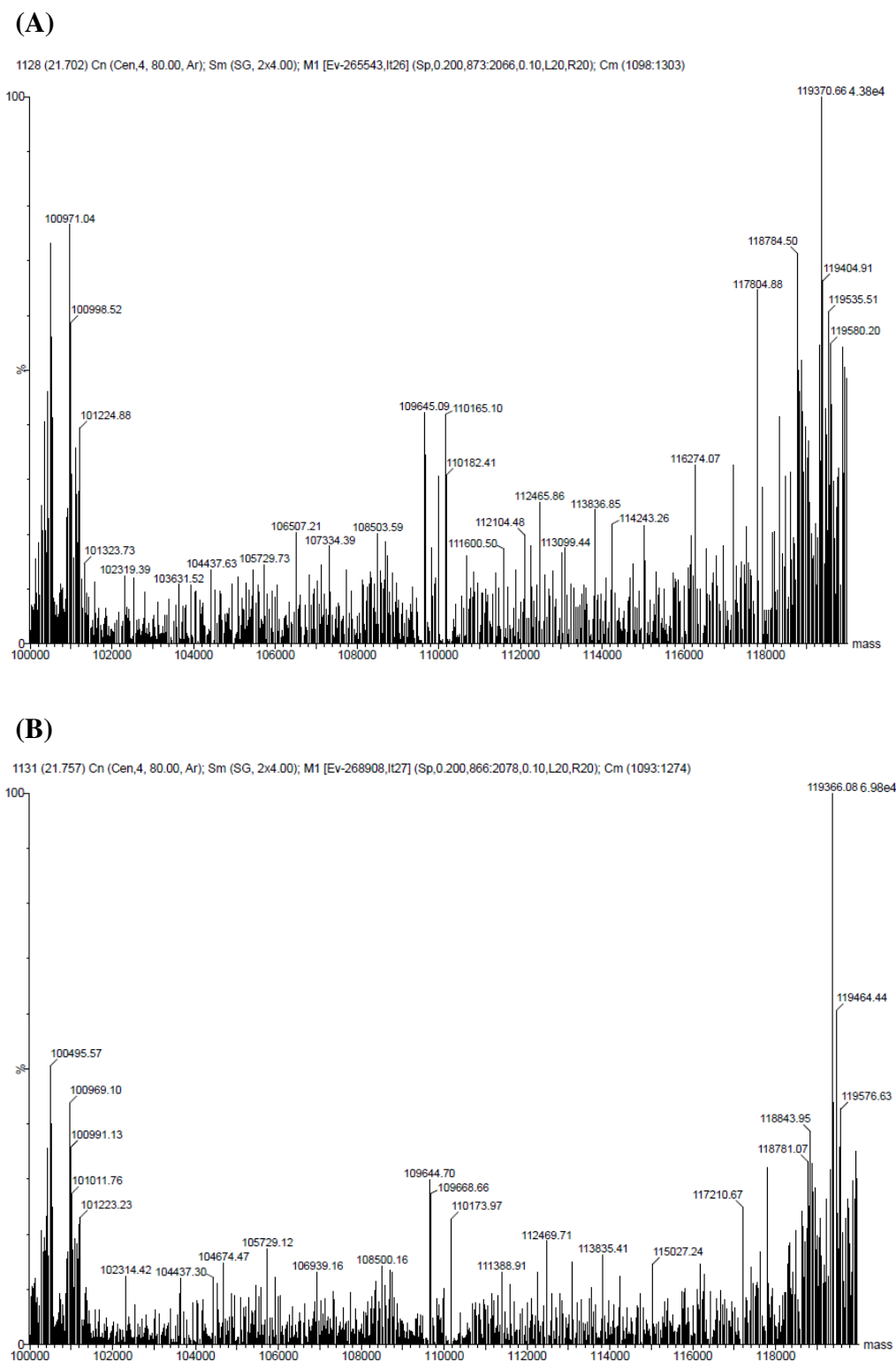


Figura 14. Identificação da massa molecular das amostras **(A)** β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG (β -Lg TT TG) e **(B)** β -Lg polimerizada com TG na presença de Cys (β -Lg Cys TG) obtidas após deconvolução dos espectros de massas correspondentes, por MS-QTOF/ESI.

As amostras polimerizadas β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG, apresentaram materiais de MM alta, com picos de maiores intensidades correspondentes à MM de aproximadamente 119.000 Da, corroborando os resultados de eletroforese SDS-PAGE (Figura 12, colunas 6 e 7, página 72) que mostrou a presença de polímeros na região superior do gel de separação.

No tratamento térmico (80 °C / 60 min) as pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura da β -Lg são rompidas, reduzindo a estrutura de α -hélices e folhas β (EISSA et al., 2006) e expondo sítios ativos da proteína para a ação da TG (SHARMA et al., 2002). No caso da Cys, a sua utilização como agente redutor, também promoveu maior exposição de resíduos de Lys e Gln e aumento da polimerização em proteínas globulares, incluindo a β -Lg (Villas-Boas et al., 2010) e as do plasma (FORT et al., 2007), levando à formação de polímeros de MM alta. Hemung et al. (2009) observaram que para a β -Lg, após 4 h de reação com TG na presença agente redutor DTT, houve formação de polímeros com MM em torno de 116 kDa. Tang & Ma (2007) verificaram formação de polímeros de MM alta, >200 kDa, após 6 h de tratamento com TG.

A Tabela 11 mostra os valores de massa intacta das amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG antes e após hidrólise com alcalase, neutrase ou bromelina. Os polímeros hidrolisados com a alcalase apresentaram produtos de MM baixa, com presença de peptídeos menores que 3.000 Da para a amostra β -Lg TT TG/alcalase.

Para o tratamento com TG pré hidrólise com bromelina, a β -Lg TT TG/bromelina apresentou produtos com MM de 9.432,25 Da, e outros de MM superior (aproximadamente 40.000 Da), enquanto que para a β -Lg CysTG/bromelina, houve detecção de materiais com 29.711,98 e 52.949,44 Da. Para o tratamento com neutrase, as amostras β -Lg TT TG/neutrase e β -Lg TT TG/neutrase apresentaram produtos de MM 9.131,33 e 14.065,19 Da, respectivamente, e outros com MM mais elevada, de aproximadamente 27.000 Da.

Tabela 11. Análise da massa intacta (MM), obtida por espectrometria de massas (MS-QTOF/ESI), das amostras polimerizadas pré hidrólise e aquelas somente polimerizadas.

Amostras avaliadas	MM1(Da)*	MM2(Da)*
β-Lg TT TG/alcalase	2.623,36	9.181,50
β-Lg CysTG/alcalase	6.121,20	9.121,80
β-Lg TT TG/bromelina	9.432,25	39.673,36
β-Lg CysTG/bromelina	29.711,98	52.949,44
β-Lg TT TG/neutrased	9.131,33	27.398,00
β-Lg CysTG/neutrased	14.065,19	27.754,80
β-Lg TT TG	119.370,66	91.391,96
β-Lg CysTG	119.366,08	108.860,76

* MM = massas intactas de maiores intensidades detectadas no espectro de massas.

Os resultados obtidos por análise de massa intacta confirmaram os verificados por SDS-PAGE (Figura 12, página 72) e CLAE-FR (Figura 13, página 74). A utilização da alcalase pós polimerização resultou na formação de peptídeos de MM baixa, indicando que a polimerização não impede o acesso da enzima aos sítios específicos de clivagem na proteína. A hidrólise pós polimerização com a neutrased e principalmente com a bromelina revelou a presença de frações com MM média, entre 27.000 Da e 52.000 Da, respectivamente, confirmando que a hidrólise dos polímeros foi parcial. Sharma et al. (2002) observaram diminuição de 20-30% no número de grupamento amínico livre após o tratamento do leite com TG seguido de hidrólise, em comparação à amostra somente hidrolisada.

Lorenzen et al. (1998) demonstraram que o caseinato de sódio somente hidrolisado com tripsina apresentou peptídeos com MM abaixo de 15 kDa, já a fração polimerizada pré hidrólise apresentou materiais que foram parcialmente hidrolisados e outros resistentes à hidrólise com tripsina.

6.4 Avaliação do cross-link

A Figura 15-A mostra o cromatograma correspondente ao padrão do dipetídeo ϵ -(γ -Gln)Lys, utilizado como referência para identificação da ligação isopetídica nas demais amostras. Na Figura 15-B e 15-C estão apresentados os cromatogramas obtidos para as amostras polimerizadas pós tratamento térmico ou na presença de Cys, as quais apresentam pico referente ao dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys, eluído no tempo de retenção de 11,8 minutos. O dipetídeo também foi identificado nas amostras polimerizadas pré ou pós hidrólise, conforme apresentado na Figura 16.

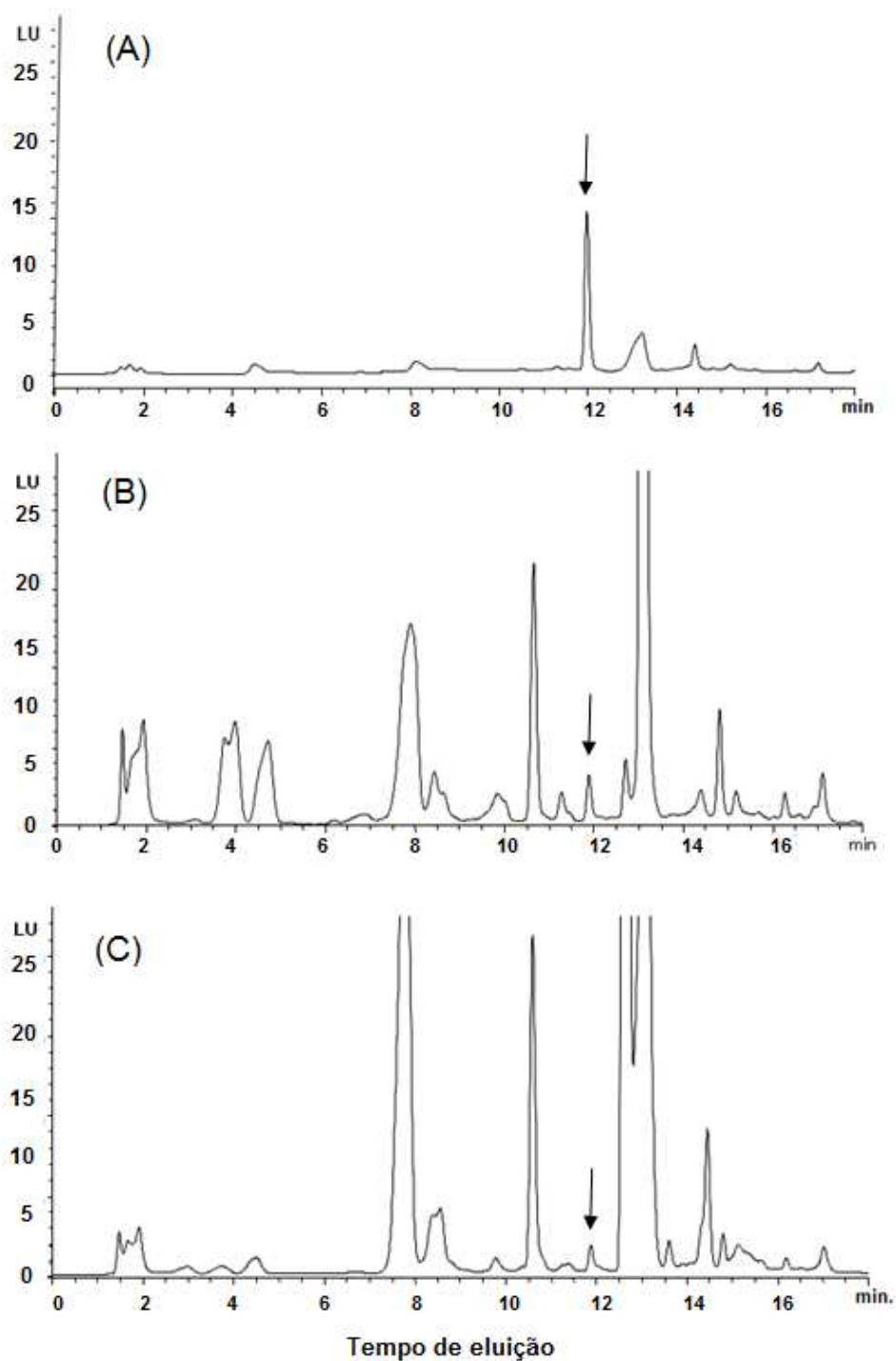


Figura 15. Cromatograma de CLAE-FR com detecção por fluorescência (excitação a 334 nm e emissão a 440 nm). Padrão de referência para o dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys (**A**) e identificação da ligação ϵ -(γ -Gln)Lys nas amostras polymerizadas com TG: Blg TT TG (**B**) e Blg Cys TG (**C**). A flecha indica o pico correspondente ao dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys.

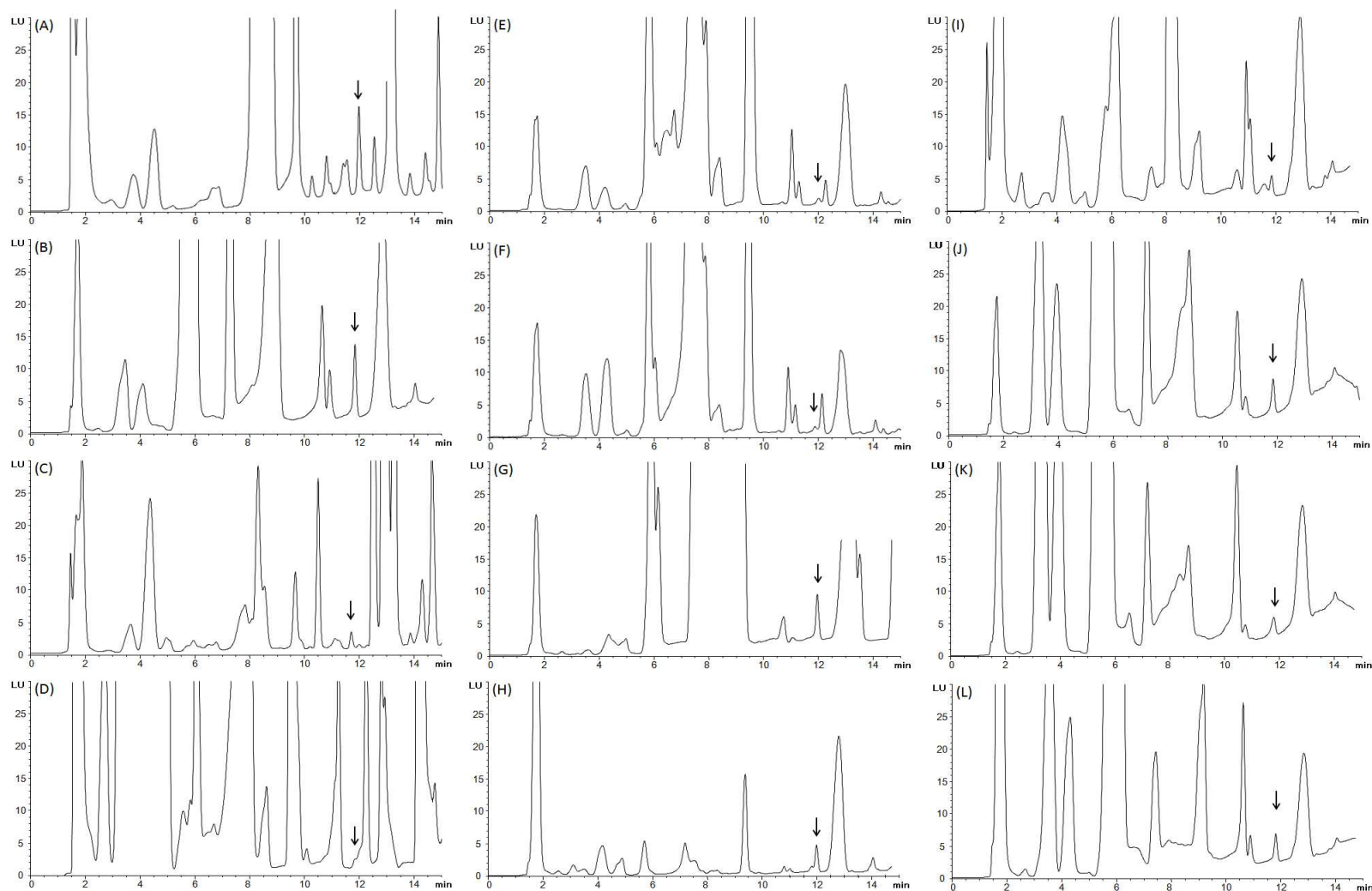


Figura 16. Cromatograma de CLAE (detecção por fluorescência, Ex 334 nm / Em 440 nm). Identificação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys nas amostras tratadas com TG. (A) β -Lg alcalase /10 TG; (B) β -Lg alcalase /25 TG; (C) β -Lg TT TG/alcalase; (D) β -Lg Cys TG/alcalase; (E) β -Lg bromelina/10 TG (F) β -Lg bromelina/25 TG; (G) β -Lg TT TG/bromelina; (H) β -Lg Cys TG/bromelina; (I) β -Lg neutrase/10TG (J) β -Lg neutrase/25 TG; (K) β -Lg TT TG/neutrase; (L) β -Lg Cys TG/neutrase. A flecha indica o pico correspondente ao dipeptídeo.

Dependendo do tratamento realizado, o pico correspondente ao dipeptídeo apresentou diferente intensidade. A Tabela 12 mostra a concentração do dipeptídeo nestas amostras, calculada a partir de equação da reta ($R^2 = 0,99$) obtida com diferentes concentrações do padrão do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys.

Tabela 12. Quantificação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys nas amostras polimerizadas com transglutaminase pré ou pós hidrólise com as enzima alcalase, neutrase ou bromelina.

Amostra	ϵ-(γ-Glu)Lys ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de proteína)*
β -Lg alcalase /10TG	1,034
β -Lg alcalase /25TG	0,778
β -Lg bromelina/10TG	0,151
β -Lg bromelina/25TG	0,146
β -Lg neutrase/10TG	0,254
β -Lg neutrase/25TG	0,268
β -Lg TT TG	0,277
β -Lg Cys TG	0,476
β -Lg TT TG/alcalase	0,232
β -Lg Cys TG/alcalase	0,173
β -Lg TT TG/bromelina	0,291
β -Lg Cys TG/bromelina	0,417
β -Lg TT TG/neutrase	0,254
β -Lg Cys TG/neutrase	0,405

* Os valores são médias de duas determinações do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys /amostra.

Para os tratamentos de polimerização pós-hidrólise, a alcalase foi a enzima que mais favoreceu a formação do dipeptídeo, 0,778 e 1,034 $\mu\text{mol g}^{-1}$ quando utilizado 10 U e 25 U TG g^{-1} , respectivamente, indicando que tratamento prévio de hidrólise com esta enzima aumentou a exposição de grupos reativos na proteína, facilitando a ação da TG. Na β -Lg, os resíduos Gln₅ e Gln₅₉ normalmente não estão disponíveis para ação da TG, isto porque próximo ao C-terminal estão os resíduos Lys₈ e Lys₆₀ carregados positivamente, que causam repulsão eletrostática, impedindo a ação da TG (COUSSONS et al., 1992). No entanto, a alcalase ao clivar a sequência linear da β -Lg na posição Thr₄, pode disponibilizar o resíduo Gln₅ e, conseqüentemente, facilitar a formação de *cross-link* a partir deste sítio.

Os polimerizados obtidos pós-hidrólise com neutrase, apresentaram concentrações do dipeptídeo 0,254 e 0,268 $\mu\text{mol g}^{-1}$ quando utilizado 10 e 25U TG g^{-1} , respectivamente. A polimerização pós-hidrólise com bromelina foi o tratamento que promoveu a menor formação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys, com concentração aproximada de 0,150 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de proteína, independente da concentração de TG utilizada. A menor concentração do dipeptídeo sugere algumas hipóteses: a hidrólise com bromelina expôs poucos sítios específicos para ação da TG; o *cross-link* foi formado e parte das ligações posteriormente hidrolisadas em glutamato e Lys; ocorrência da reação de deaminação em alguns resíduos de Gln (MOTOKI & SEGURO, 1998) ou então que alguns resíduos de Gln foram hidrolisados diretamente em glutamato (BIN MD YASIR et al., 2007). Além disso, os resultados indicaram que maior concentração da TG não implicou necessariamente em maior formação da ligação isopeptídica na proteína. Em concordância, os dados obtidos por eletroforese SDS-PAGE (Figura 9, página 64) e MS (Tabela 10, página 70) mostraram que não houve diferença importante em relação ao perfil e MM dos polímeros quando utilizado menor ou maior concentração de TG.

A polimerização com TG na presença de Cys promoveu quase o dobro da formação da ligação isopeptídica ϵ -(γ -Gln)Lys comparado ao tratamento com TG pós tratamento térmico. A Cys ao romper as ligações dissulfeto (Cys₆₆-Cys₁₆₀ e Cys₁₀₆-Cys₁₀₉) promove a abertura da molécula e maior exposição dos sítios

catalíticos à ação da TG (PAPIZ et al., 1986; FAERGEMAND et al., 1997). Além disso, pode haver a formação de cistina, que ao evitar o intercâmbio tiol-dissulfeto e reagregação via pontes dissulfeto, aumenta a exposição dos resíduos de Lys e Gln e, conseqüentemente, a formação do *cross-link* na proteína (VILLAS-BOAS et al., 2012).

Para os polímeros que foram hidrolisados, espera-se que a concentração do dipeptídeo não se altere já que as proteases utilizadas no presente estudo não são capazes de quebrar a ligação isopeptídica. Por se tratar de uma ligação cruzada covalente, inter ou intramolecular, além de estável é irreversível (MOTOKI & SEGURO, 1998; JONG & KOPPELMAN, 2002; FORT et al., 2007).

Os polimerizados hidrolisados com neutrase ou bromelina apresentaram concentração do dipeptídeo próxima à obtida para as amostras somente polimerizadas, β -Lg TT TG ou β -Lg Cys TG, comportamento também verificado para a amostra β -Lg TT TG/alcalase, para a qual a concentração do dipeptídeo, $0,219 \mu\text{mol g}^{-1}$, foi próxima ao observado para o polimerizado de origem (β -Lg TT TG). No entanto, a concentração do dipeptídeo na amostra β -Lg Cys TG/alcalase, foi quase 3 vezes inferior ao da amostra β -Lg Cys TG, o que pode estar associado a coeluição dos picos entre 11,7 - 12,0 min, impossibilitando a exata identificação e/ou quantificação da ligação isopeptídica.

Em uma variedade de 96 diferentes alimentos, Sakamoto et al. (1995) verificaram que o dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys estava presente na concentração de 0,002 a $1,35 \mu\text{mol g}^{-1}$ proteína, dependendo da amostra analisada. Níveis mais elevados de ϵ -(γ -Gln)Lys foram relacionados aos alimentos com atividade endógena da transglutaminase. Nas amostras analisadas, maior concentração de ϵ -(γ -Gln)Lys foi encontrado em tecido proveniente do cólon de ruminates, e dentre as fontes alimentares analisadas, observou-se concentração mais elevada na farinha de soja torrada, $0,503 \mu\text{mol g}^{-1}$ de proteína (SAKAMOTO et al., 1995) Para proteínas tratadas com a TG, não foram encontrados dados na literatura sobre a quantificação do *cross-link* especificamente para a β -Lg. Schafer et al. (2005) verificaram a concentração de 2,2; 3,3 e 2,9 μmol de ϵ -(γ -Gln)Lys por grama do

isolado proteico de soja, ervilha ou de tremoço, respectivamente, tratados com a transglutaminase por 120 minutos.

6.5 Avaliação da antigenicidade

6.5.1 Ensaio de ELISA – Atividade de ligação de IgE

As amostras β -Lg nativa (controle positivo), os polímeros β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG, e os polimerizados pós ou pré-hidrólise foram avaliados por ELISA quanto à resposta de IgE específica anti- β -Lg (IgE anti- β -Lg). Os soros dos animais sensibilizados com alúmen (adjuvante) ou solução salina estéreis foram utilizados como controle negativo da reação.

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da análise de IgE anti- β -Lg frente às amostras β -Lg nativa, β -Lg hidrolisada com alcalase, neutrase ou bromelina, e β -Lg polimerizada pós hidrolise com as diferentes proteases.

Tabela 13. Resposta de IgE anti- β -Lg ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para da β -Lg nativa, β -Lg hidrolisada com alcalase, bromelina ou neutrase e polimerizados com TG pós hidrólise.

Tratamento	IgE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	controle [0 U TGg ⁻¹]	[TG 10 U g ⁻¹]	[TG 25 U g ⁻¹]
β -Lg nativa	216,20 \pm 27,58*	nd	nd
β -Lg /alcalase	8,99 \pm 2,33 ^{a; A}	35,75 \pm 4,49 ^{a;B}	25,61 \pm 5,29 ^{a;A;B}
β -Lg /bromelina	22,82 \pm 6,56 ^{a;A}	48,75 \pm 11,12 ^{a;b;B}	39,99 \pm 7,70 ^{a;b; A;B}
β -Lg /neutrase	55,73 \pm 7,84 ^{b;A}	50,06 \pm 6,73 ^{b;A}	48,84 \pm 11,64 ^{b; A}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$ - Kruskal-Wallis). *Mann-Whitney como pós-teste ($P < 0,05$). Os valores são médias de 6 determinações/amostra. nd: não determinado.

A resposta de IgE específica frente à β -Lg nativa, $216,20 \pm 27,58 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi significativamente maior comparada a verificada frente às amostras hidrolisadas com alcalase, neutrase ou bromelina e também frente aos polimerizados pós hidrólise com estas enzimas ($P \leq 0,05$).

Entre os hidrolisados, a resposta de IgE anti β -Lg foi praticamente nula ($\text{IgE} < 9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente à amostra β -Lg/alcalase, já que não houve diferença estatística em relação à resposta observada para esta mesma amostra analisada frente aos soros controles, procedentes dos animais sensibilizados apenas com alumen ou salina (dados não mostrados). A atividade de IgE frente a este hidrolisado (β -Lg/alcalase) foi significativamente reduzida em comparação ao hidrolisado com neutrase ($\text{IgE } 55,73 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 7,84$) ($P \leq 0,05$).

A associação dos tratamentos de hidrólise com a neutrase e polimerização com a TG foi menos efetiva na redução da antigenicidade em comparação aos tratamentos com alcalase ou bromelina, seguido da TG. Para as amostras β -Lg alcalase/25TG ou β -Lg bromelina/25TG não foram observadas diferenças significativas quanto à resposta de IgE anti- β -Lg quando comparadas aos seus respectivos hidrolisados. No entanto, quando a polimerização foi realizada com 10 U TG g^{-1} houve diferença da resposta de IgE anti- β -Lg, aumentada em comparação aos respectivos hidrolisados ($P \leq 0,05$).

Os resultados da análise de IgE anti- β -Lg frente aos polimerizados β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG e aos polímeros hidrolisados com a alcalase, bromelina ou neutrase, estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resposta de IgE anti- β -Lg ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente aos polímeros β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG e polymerizados hidrolisados com alcalase, bromelina ou neutrase.

Amostras	IgE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	/alcalase	/bromelina	/neutrase	
β-Lg nativa	216,20 \pm 27,58*	nd	nd	nd
β-Lg TT TG	65,07 \pm 4,52 ^{a:A}	22,33 \pm 2,81 ^{a:B}	19,65 \pm 2,45 ^{a:B}	45,81 \pm 6,25 ^{a:A;B}
β-Lg Cys TG	76,46 \pm 7,53 ^{b:A}	23,86 \pm 3,94 ^{a:B}	25,26 \pm 1,88 ^{b:B}	36,68 \pm 9,12 ^{b:A;B}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$ - Kruskal-Wallis). * Mann-Whitney como pós-teste ($P < 0,05$). Os valores são médias de 6 determinações/amostra. nd: não determinado.

A resposta de IgE frente à β -Lg nativa, 216,20 \pm 27,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi significativamente superior que a observada frente às amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG ou frente aos polymerizados hidrolisados com alcalase, bromelina ou neutrase ($P \leq 0,05$) (Tabela 14). Os polymerizados β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG submetidos à hidrólise com alcalase ou bromelina apresentaram redução significativa da resposta de ligação com IgE comparados aos respectivos polímeros não hidrolisados ($P \leq 0,05$).

6.5.2. Análise de IgE por Imunoblote

As amostras também foram avaliadas por Imunoblote (Figura 17) quanto à resposta de IgE anti- β -Lg. Dentre os polymerizados pós-hidrólise, foram selecionados os tratados com 10 U TG g^{-1} , pois apresentaram diferença estatística (por teste ELISA) em relação aos materiais somente hidrolisados (Tabela 14).

Assim como observado por ELISA, as amostras estudadas não reagiram frente aos soros dos grupos controles, sensibilizados com solução alumen ou salina (dados não mostrados).

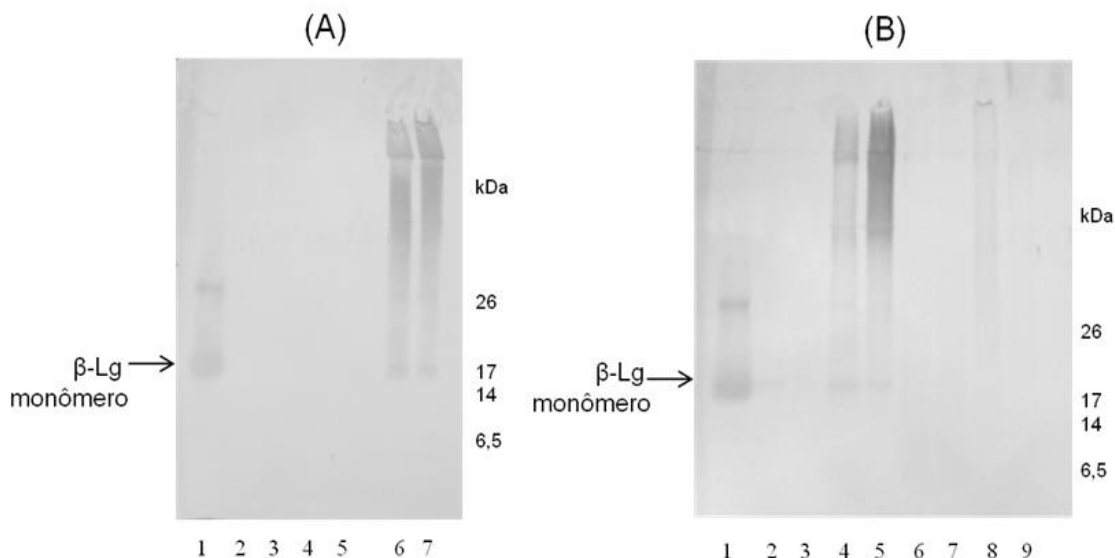


Figura 17. Reatividade de IgE específica de pool dos soros dos animais sensibilizados com β -Lg nativa frente às amostras hidrolisadas com alcalase, neutrase ou bromelina pré e pós polimerização com TG. **A** - (1) β -Lg; (2) β -Lg/alcalase; (3) β -Lg alcalase/ 10TG; (4) β -Lg TT TG/alcalase; (5) β -Lg Cys TG/alcalase, (6) β -Lg TT TG; (7) β -Lg Cys TG. **B** - (1) β -Lg; (2) β -Lg/neutrase; (3) β -Lg neutrase/10TG; (4) β -Lg TT TG/neutrase; (5) β -Lg Cys TG/neutrase; (6) β -Lg/bromelina; (7) β -Lg bromelina/10TG; (8) β -Lg TT TG/bromelina; (9) β -Lg Cys TG/bromelina.

Para a β -Lg hidrolisada com alcalase (Figura 17-A, coluna 2) não foi observada reação antígeno-anticorpo na membrana, confirmando os resultados obtidos por ELISA. O hidrolisado com bromelina também não apresentou reação para IgE anti- β -Lg ao longo de toda a extensão da membrana (Figura 17-B, coluna 6). Essa amostra, assim como o hidrolisado com neutrase, apresentaram peptídeos de MM alta (> 18.3 kDa) e outros com MM $\leq 6,5$ kDa (Figura 9, colunas 6 e 9, página 64) que também não foram reconhecidos como antígenos. Quantitativamente, a análise por ELISA também mostrou que a β -Lg hidrolisada com bromelina apresentou baixa antigenicidade. Isso sugere que essas enzimas, mesmo não clivando extensivamente a proteína, modificaram algumas regiões correspondentes aos epítomos. Embora alguns estudos indiquem que peptídeos com MM < 5 kDa sejam menos antigênicos (VAN BERESTEIJN et al., 1994; SVENNING et al, 2000), outros fatores estão envolvidos na resposta como estrutura molecular, seqüência aminoacídica e rearranjo molecular decorrente de

algum processo de modificação da molécula (CHICÓN et al., 2008a; CHICÓN et al., 2008b). Peñas et al. (2006) observaram baixa antigenicidade para proteínas da soja submetidas a tratamento combinado de alta pressão e hidrólise com neutrase ou alcalase, apesar da presença de peptídeos com ampla e alta MM, 14 a 66 kDa.

Para o hidrolisado com neutrase, foi verificado por Imunoblote que a banda na posição referente ao monômero da β -Lg foi marcada na membrana (Figura 17-B, coluna 2). Os valores de ELISA para esta amostra mostraram que a resposta antigênica foi quantitativamente superior à do hidrolisado com alcalase. Estes resultados sugerem que a antigenicidade nesta amostra se deve, principalmente, à fração intacta remanescente da β -Lg. Svenning et al. (2000) observaram que quanto maior a quantidade de β -Lg residual presente no soro de leite hidrolisado com Corolase PP, maior a resposta antigênica do produto.

Os hidrolisados com alcalase ou bromelina submetidos à polimerização com a TG (Figuras 17-A, coluna 3; Figura 17-B, coluna 7) não apresentaram diferenças em relação às amostras somente hidrolisadas quanto à reatividade frente à IgE anti- β -Lg, ou seja, sem reação antígeno-anticorpo na membrana. No entanto, a análise por ELISA mostrou diferenças entre as amostras quanto à resposta antigênica.

A amostra hidrolisada com neutrase e polimerizada com TG (Figura 17-B, coluna 3) teve a intensidade de reação antígeno anticorpo diminuída na fração correspondente à β -Lg quando comparada à amostra somente hidrolisada (Figura 17-B, coluna 2). Neste caso, a polimerização pós hidrólise parece resultar em menor concentração residual de β -Lg (18,3 kDa) e os produtos oriundos da reação não foram reconhecidos como antígenos.

Wróblewska et al. (2008) verificaram que enquanto a hidrólise do isolado protéico do soro de leite resultou em redução parcial da imunoreatividade das proteínas desta fração, após o tratamento dos hidrolisados com a TG a redução da imunoreatividade foi maior, avaliada quanto à resposta de IgE-anti- α -La e anti β -Lg. No entanto, para caseinato de sódio, O'Sullivan & FitzGerald (2012)

verificaram que não houve diferença quanto à antigenicidade dos materiais somente hidrolisados e dos hidrolisados tratados com a TG.

As amostras polimerizadas pós tratamento térmico ou na presença de Cys (Figura 17-A, colunas 6 e 7) apresentaram reatividade para IgE na região de MM > 26 kDa, onde se observa marcação de banda. É importante ressaltar que a resposta de IgE anti- β -Lg determinada pelo teste ELISA para ambas as amostras foi significativamente menor que para a β -Lg nativa, o que sugere que as frações marcadas na membrana, que reagiram frente à IgE, podem apresentar alguns sítios de ligações inespecíficas. Em trabalhos anteriores foi verificado que a polimerização da β -Lg na presença de agente redutor Cys reduziu a antigenicidade da proteína (VILLAS-BOAS et al., 2010), porém quando a β -Lg foi tratada termicamente e polimerizada com TG (25 U g^{-1}) houve aumento da resposta antigênica, associada à mudanças estruturais e exposição de epítomos na proteína (VILLAS-BOAS et al., 2010). Babiker et al. (1998) verificaram que a modificação das proteínas de soja pela reação com TG resultou no mascaramento de determinantes antigênicos e redução da antigenicidade da amostra. Resultados similares foram observados por Watanabe et al. (1994) para as frações protéicas solúveis e insolúveis do trigo tratadas com a TG. Para proteínas do amendoim tratadas termicamente e polimerizadas com TG, não foi verificado redução da antigenicidade (CLARE et al., 2007).

A β -Lg polimerizada e hidrolisada com alcalase não apresentou reação frente à IgE anti- β -Lg (Figura 17-A, colunas 4 e 5), indicando que esta protease clivou as sequências correspondentes aos epítomos presentes na proteína polimerizada. Os polimerizados hidrolisados com neutrase (Figura 17-B, colunas 4 e 5) apresentaram reatividade à IgE anti- β -Lg principalmente nas frações com MM > 26 kDa. No entanto, a marcação foi menos intensa para a β Lg TT TG/neutrase do que para a β -Lg Cys TG. Como os polímeros hidrolisados com a neutrase apresentarem perfis eletroforéticos semelhantes (Figura 12-B, colunas 4 e 5, página 72) e MM próximas, identificadas por MS (Tabela 11, página 78), possivelmente foram clivados de maneira distinta por essa enzima, o que leva à maior ou menor exposição de epítomos capazes de se ligar à IgE.

O polimerizado β -Lg Cys TG hidrolisado com bromelina (Figura 17-B, coluna 9) não reagiu frente à IgE anti- β -Lg, nem mesmo as frações de maior MM, mostradas na região superior do gel na eletroforese (Figura 12-C, coluna 5, página 72), cuja massa intacta avaliada por EM foi $\sim 52,9$ kDa (Tabela 11, página 78). Para a β -Lg TT TG hidrolisada com bromelina (Figura 17-B, coluna 8), a leve marcação na membrana decorrente da reação antígeno-anticorpo pode ser em parte decorrente de ligações inespecíficas, já que por teste ELISA a resposta de IgE frente a esta amostra apresentou-se significativamente reduzida (Tabela 14, página 87).

6.6 Simulação da digestão gastrointestinal

A digestão *in vitro* foi realizada para as amostras β -Lg, β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG e também foram avaliados os hidrolisados com alcalase ou com bromelina, e os polimerizados pré ou pós hidrólise com estas enzimas. A alcalase e bromelina, por apresentarem diferentes especificidades, quando associadas à TG originaram produtos com características bastante distintas e, principalmente, com menor concentração de β -Lg na forma intacta. Além disso, essas amostras apresentaram atividade antigênica reduzida quando comparadas aos hidrolisados e polimerizados pré ou pós-hidrólise com neutrase.

As proteínas de soro de leite apresentam alta digestibilidade (WAITZBERG, 2000), exceto a β -Lg, que é resistente à pepsina e parcialmente resistente às enzimas pancreáticas (KIM et al., 2007). O perfil por CLAE-FR dos digeridos gástricos e gastrointestinais das amostras β -Lg nativa e β -Lg polimerizada pós tratamento térmico ou na presença de Cys, estão apresentados da Figura 18.

O pico referente à β -Lg nativa, no controle pré-digestão, eluiu em aproximadamente 63 min (Figura 18-A). Os controles pré-digestão das amostras polimerizadas β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG apresentaram baixa solubilidade nos condições de análise cromatográfica, sem identificação de picos nas escalas utilizadas nos cromatogramas.

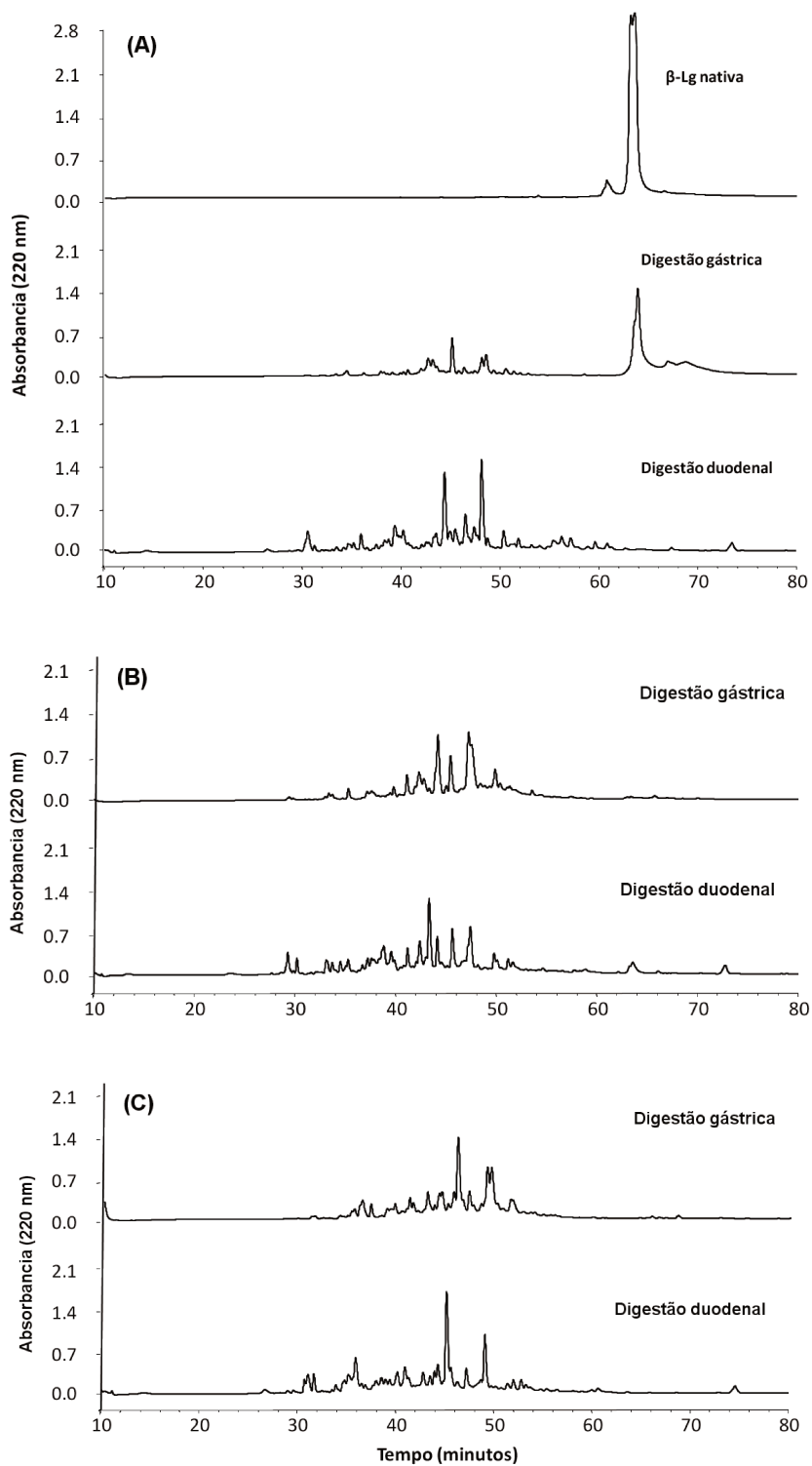


Figura 18. Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 220 nm dos digeridos gástricos e duodenais da **(A)** β -Lg nativa; **(B)** β -Lg TT TG; **(C)** β -Lg Cys TG. Região de hidrofiliidade alta: 0 – 40 min; Região de hidrofiliidade média: 40 – 50 min; Região de hidrofiliidade baixa: após 50 minutos.

Após digestão gástrica, a β -Lg apresentou pico no mesmo tempo de eluição que o controle não digerido, indicando a presença de proteína intacta, resistente à ação da pepsina. Os sítios de clivagem para a pepsina, correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos, formam um núcleo de difícil acesso no interior da estrutura da β -Lg (DALGALARRONDO et al., 1995), tornando-a altamente resistente à digestão gástrica em pH baixo (GUO et al., 1995; DALGALARRONDO et al., 1995). Em concordância com estudos anteriores, após digestão gastrointestinal, a β -Lg foi quase que totalmente hidrolisada (PICARIELLO et al., 2010; CHICÓN et al., 2008b).

A digestão *in vitro* com pepsina aumentou a solubilidade dos polimerizados β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG (Figura 18 - B e C). A distribuição dos picos nos cromatogramas indicou a presença predominante de peptídeos de hidrofiliidade média, eluídos entre 35 - 45 minutos. Além disso, não foi detectado pico referente à β -Lg intacta. Após digestão gastrointestinal, os polimerizados apresentaram aumento no número e intensidade dos picos que eluíram em até 40 minutos, de maior hidrofiliidade, indicando susceptibilidade destas amostras à digestão gastrointestinal e formação de peptídeos menores e/ou mais hidrofílicos.

Os perfis por CLAE-FR dos controles pré digestão e dos digeridos gástricos e duodenais das amostras β -Lg hidrolisada com alcalase e β -Lg polimerizada pré ou pós hidrólise com esta enzima, estão apresentados na Figura 19.

O digerido gástrico da β -Lg hidrolisada com alcalase (Figura 19-A), não apresentou diferenças em relação ao controle pré digestão, quanto ao perfil dos peptídeos, sugerindo que a pepsina pouco degradou os peptídeos já pré-formados na hidrólise. Resultados semelhantes foram observados para a β -Lg TT TG/alcalase (Figura 19-B), não sendo observadas diferenças importantes quanto ao perfil do controle pré digestão e do digerido gástrico.

Comparada à amostra β -Lg TT TG/alcalase, a amostra β -Lg Cys TG/alcalase (Figura 19-C) mostrou maior susceptibilidade à ação da pepsina, evidenciada principalmente pela redução do pico de alta intensidade eluído em aproximadamente 53 min.

Para a amostra β -Lg alcalase/10TG (Figura 19-D), após digestão gástrica houve diminuição na intensidade dos picos detectados em aproximadamente 50 minutos e o concomitante aumento da intensidade de picos na região de hidrofobicidade média, indicando ação da pepsina que liberou peptídeos menores e/ou mais hidrofílicos. Após digestão gastrointestinal, tanto a proteína somente hidrolisada como os polimerizados pré ou pós hidrólise com alcalase, apresentaram aumento na intensidade dos picos na região mais hidrofílica (30 minutos de euluição), indicativo de digestão enzimática e formação de peptídeos menores.

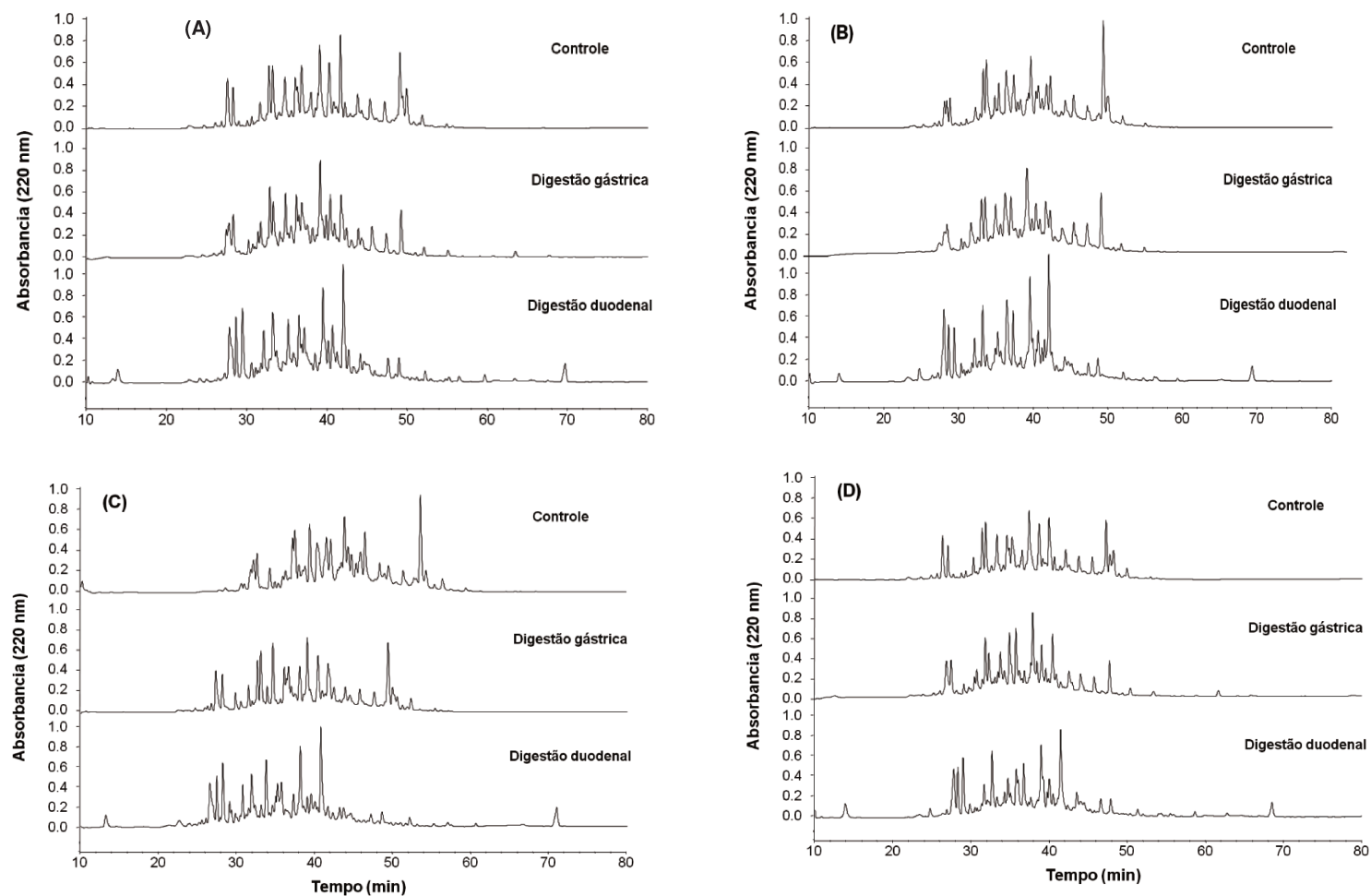


Figura 19. Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 220 nm dos digeridos gástricos e duodenais da **(A)** β -Lg/alcalase; **(B)** β -Lg TT TG/alcalase; **(C)** β -Lg Cys TG/alcalase; **(D)** β -Lg alcalase/10TG. Região de hidrofiliicidade alta: 0 – 40 min; Região de hidrofiliicidade média: 40 – 50 min; Região de hidrofiliicidade baixa: após 50 minutos.

Os perfis cromatográficos dos controles pré-digestão e dos digeridos gástricos e gastrointestinais das amostras β -Lg/bromelina e β -Lg polimerizada pré ou pós hidrólise com esta enzima, estão apresentados na Figura 20. Como característica comum a estas amostras, foi detectado, embora com baixa intensidade, o pico correspondente à β -Lg na forma intacta (eluída aos 63 min).

A β -Lg hidrolisada com bromelina (Figura 20-A) apresentou picos eluídos entre 30 – 65 min, indicando a formação de peptídeos com características distintas. Pico de maior intensidade foi detectado em aproximadamente 37 min de eluição, que teve sua intensidade diminuída após digestão gástrica. A digestão com pepsina também levou ao aumento do número e intensidade de picos que eluíram até 40 minutos, indicando a presença de peptídeos de hidrofiliidade alta. Após digestão gastrointestinal, houve um aumento no número de picos correspondentes aos peptídeos altamente hidrofílicos, eluídos em até 32 minutos.

O controle pré-digestão da amostra β -Lg TT TG/bromelina (Figura 20-B), apresentou picos eluídos entre 30 – 70 min, com pico de alta intensidade eluído aos 50 minutos. Após digestão gástrica e principalmente após a gastrointestinal, houve redução da intensidade deste pico, além do aumento da intensidade dos picos eluídos na região mais hidrofílica, indicativo de proteólise.

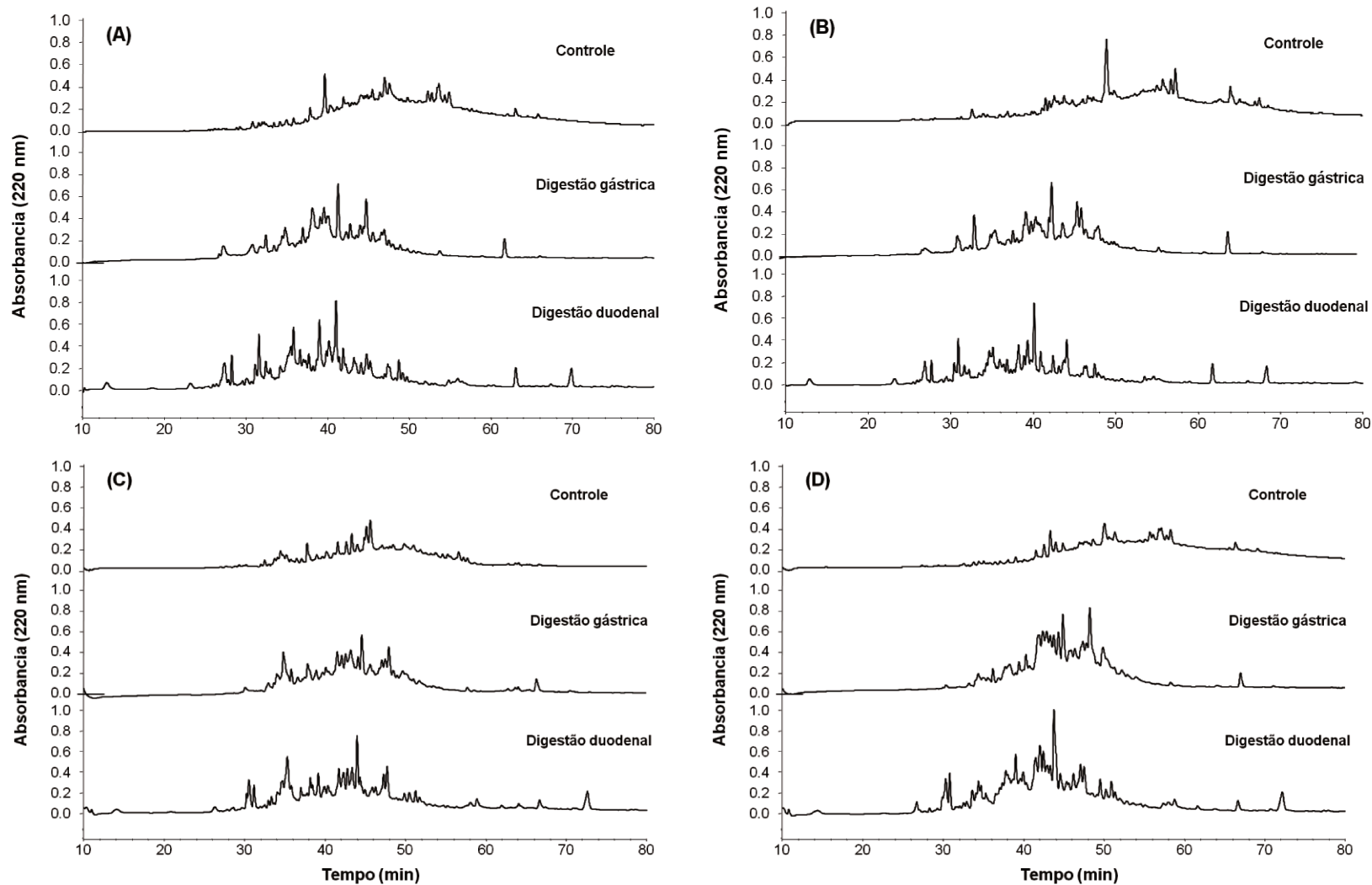


Figura 20. Cromatograma de CLAE-FR com detecção a 220 nm dos digeridos gástricos e duodenais da (A) β -Lg/bromelina; (B) β -Lg TT TG; (C) β -Lg Cys TG/bromelina; (D) β -Lg bromelina/10TG. Região de hidrofiliicidade alta: 0 – 40 min; Região de hidrofiliicidade média: 40 – 50 min; Região de hidrofiliicidade baixa: após 50 minutos.

A β -Lg Cys TG/bromelina (Figura 20-C) apresentou perfil cromatográfico distinto do obtido para a β -Lg TT TG/bromelina (Figura 20-B). No perfil cromatográfico da β -Lg CysTG/bromelina os picos se concentraram na região entre 30-50 minutos, indicando produtos mais hidrofílicos que os obtidos com o tratamento β -Lg TT TG/ bromelina. Após digestão gástrica e principalmente, gastrointestinal, houve aumento no número e intensidade de picos na região mais hidrofílica, 30-40 minutos, indicando susceptibilidade da amostra β -Lg CysTG/bromelina à ação das enzimas digestivas.

A amostra β -Lg bromelina/10TG (Figura 20-D) apresentou picos distribuídos entre 30 – 70 min. Após digestão gástrica, houve aumento no número de picos eluídos na região de média e alta hidrofiliidade e após digestão gastrointestinal, houve o aumento no número de picos eluídos até 30 minutos, altamente hidrofílicos.

Conforme descrito anteriormente, a β -Lg nativa é resistente à digestão gástrica. A hidrólise, ao quebrar ligações específicas na proteína, e a polimerização, ao induzir rearranjo estrutural na molécula, aumentaram a exposição dos sítios de clivagem da proteína para a ação das enzimas digestivas, conforme mostrado nas análises anteriores de caracterização.

Apesar do crescente uso da TG, existem poucos estudos sobre a qualidade nutricional de proteínas polimerizadas. A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado, sendo considerado um determinante na avaliação da qualidade nutricional de uma mistura protéica (PIRES et al., 2006) . Estudos realizados com caseína e caseinato de sódio mostraram que a polimerização não afetou a digestibilidade destas proteínas (SEGURO et al., 1996; ROOS et al., 2003). Tang, Li & Yang (2006) avaliaram o efeito da TG na digestibilidade *in vitro* do isolado protéico de soja (IPS) utilizando pepsina e tripsina e verificaram diminuição da digestibilidade das proteínas após polimerização. Marinello et al. (2007) observaram que a faseolina, principal proteína de estocagem do feijão, foi

parcialmente resistente à digestão com pepsina e tripsina após ser tratada com TG. No entanto, em concordância com o presente estudo, Tang et al. (2008) observaram aumento da digestibilidade da vicilina, proteína também extraída do feijão, após polimerização com a TG. Para a β -Lg, estudo recente (VILLAS-BOAS et al., 2012) verificou o aumento da digestibilidade utilizando a pepsina e pancreatina da proteína polimerizada com TG (10 ou 25 U g⁻¹) na presença de Cys (0,1 e 0,2 mol L⁻¹), sugerindo que os tratamentos atuaram no desdobramento e rearranjo estrutural da proteína, expondo sítios específicos para a ação das enzimas digestivas.

6.7 Análise dos peptídeos e identificação de epítomos nos digeridos gástricos e gastrointestinais

A digestão *in vitro*, além de ser utilizado para avaliar a qualidade nutricional de proteínas alimentares é um método de avaliação do potencial alergênico que uma determinada proteína pode apresentar (CLEMENTE, 2000). Embora os mecanismos pelos quais os indivíduos sejam sensibilizados por produtos alergênicos são estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a maioria destes mecanismos ocorre no trato gastrointestinal, quando determinantes antigênicos e/ou a proteína na forma intacta, estáveis à digestão, são absorvidos e então distribuídos no organismo, causando reação alérgica (ASTWOOD et al., 1996; MILLS et al., 2003; BANNON, 2004; SCHNELL & HERMAN, 2009).

A Figura 21 ilustra a análise *in silico* do grau de antigenicidade dos peptídeos liberados após simulação da hidrólise da β -Lg com quimotripsina (CLC-bio software).

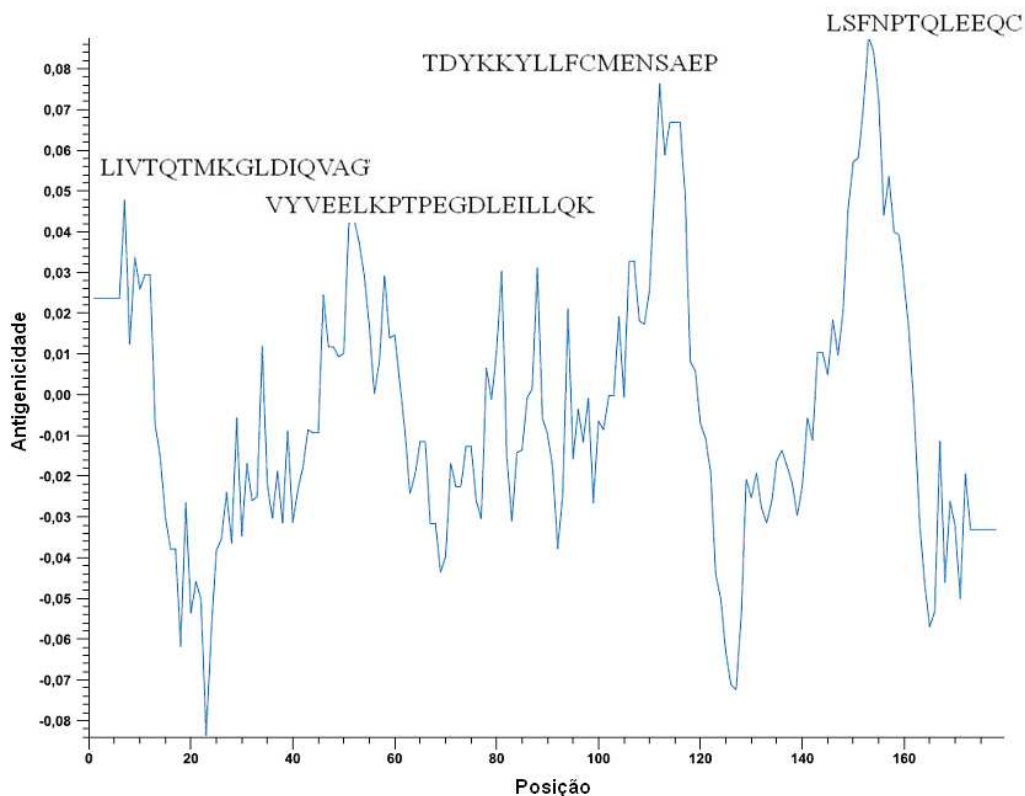
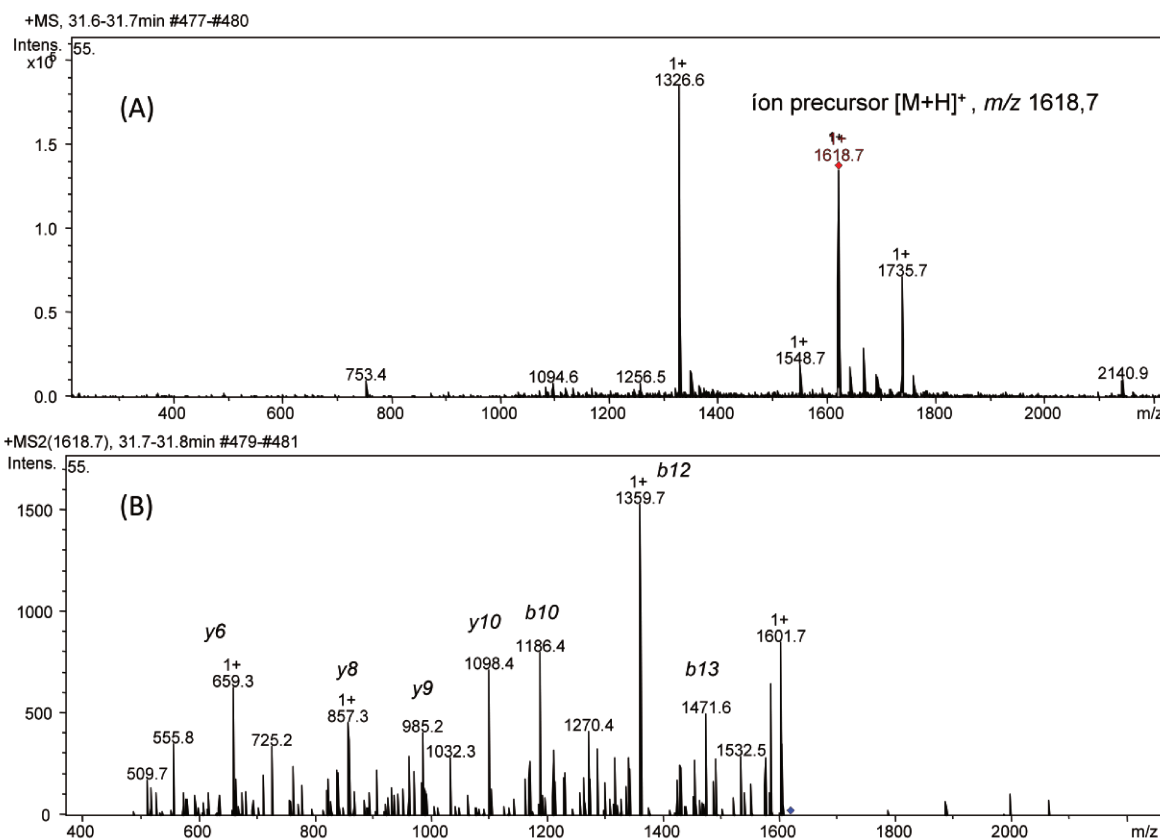


Figura 21. Análise *in silico* referente ao grau de antigenicidade dos peptídeos liberados após hidrólise da β -Lg (CLC-bio software).

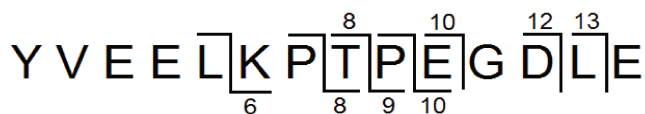
Diferentes trabalhos analisaram por testes *in vivo* e *in vitro* os principais epítomos lineares encontrados na β -Lg. De acordo com Adams et al. (1991), o principal epítomo corresponde ao peptídeo Arg₁₂₄-Ala₁₃₄. Ball et al. (1994) apontaram a sequência peptídica Thr₉₇-Glu₁₀₈ como sendo o principal fragmento de união com a IgE. Os fragmentos Val₄₁-Lys₆₀, Tyr₁₀₂-Arg₁₂₄, Leu₁₄₉-Ile₁₆₂ e Leu₉₅-Pro₁₁₃, foram posteriormente classificados como epítomos da β -Lg por Heinzmann et al. (1999). As sequências Leu₉₅-Leu₁₀₄ e Asp₉₆-Phe₁₀₅ que fazem parte do peptídeo Leu₉₅-Pro₁₁₃ e Thr₉₇-Glu₁₀₈, também foram caracterizados como determinantes antigênicos (BALL et al., 1994; HEINZMANN et al., 1999; CHICÓN et al., 2008b). No estudo conduzido por Sélo et al. (1999) foram confirmados os resultados observados por Heinzmann et al. (1999) para os fragmentos Val₄₁-Lys₆₀ e Lys₁₄₉-Ile₁₆₂, além da identificação de outros epítomos Leu₁-Lys₈, Ala₂₅-Arg₄₀, Ile₂₉-Val₄₁ e Tyr₄₂-Leu₅₄, sendo que todas as sequências avaliadas reagiram, no mínimo, com 72% dos soros dos pacientes alérgicos. Jarvinen et al. (2001)

encontraram sete epítomos na β -Lg, apresentados em ordem crescente de reatividade frente à IgE: Leu₁-Ala₁₆, Leu₃₁-Pro₄₈, Ala₆₇-Ile₇₈, Lys₄₇-Lys₆₀, Lys₁₄₁-Asn₁₅₂, Glu₁₂₇-Pro₁₄₄ e Lys₇₅-Ala₈₆.

Na Figura 22 está exemplificado a detecção do íon molecular com m/z 1618,7 (Figura 22-A) e o seu espectro de MS/MS (Figura 22-B), detectado no digerido gástrico da β -Lg nativa. Com estes dados obteve-se a sequência Tyr₄₂-Glu₅₅, também verificada em outras amostras, conforme os dados que serão apresentados abaixo.



Íons da série *b*



Íons da série *y*

Figura 22. Espectro de MS (A) e MS/MS (B) correspondente ao peptídeo Tyr₄₂-Leu₅₄ identificado após digestão péptica da β -Lg nativa.

As Tabelas 15 a 25 trazem as informações referentes à massa experimental, massa teórica e os peptídeos obtidos após digestão gástrica das amostras β -Lg, β -Lg TT TG, β -Lg Cys TG, hidrolisados com alcalase ou bromelina, e polimerizados pré ou pós hidrólise com estas enzimas. A Figura 23 ilustra a sequência primária da β -Lg proveniente do *software* utilizado para identificação dos peptídeos após digestão. As sequências identificadas pelo software foram validadas manualmente nos espectros de massas correspondentes.

	10		20		30		40		50		60
LIUTQ	TMKGL	DIQKU	AGTWY	SLAMA	ASDIS	LLDAQ	SAPLR	UYVEE	LKPTP	EGDLE	ILLQK
	70		80		90		100		110		120
WENDE	CAQKK	IIAEK	TRIPA	UFRID	ALNEN	KULUL	DTDYK	KYLLF	CMENS	AEPEQ	SLUCQ
	130		140		150		160				
CLURT	PEUDD	EALEK	FDRAL	KALPM	HIRLS	FNPTQ	LEEQC	HI			

Figura 23. Sequência primária da β -Lg variante A. A substituição do aminoácido Asp por Gly (posição 54) e Val por Ala (posição 118) caracteriza a β -Lg variante B. (Fonte Biotools *software*, versão 3.2, Bruker Daltonik).

Os peptídeos destacados em cinza nas tabelas correspondem ou contêm epítomos em suas sequências. Dependendo do tipo de tratamento utilizado para modificação da β -Lg, diferentes peptídeos foram liberados após digestão gástrica, corroborando com os resultados anteriores de caracterização dos digeridos por CLAE-FR (Figuras 18-20).

Os digeridos gástricos da β -Lg (Tabela 15) apresentaram peptídeos contendo 6 aminoácidos e outros contendo até 33 aminoácidos, correspondente à MM de aproximadamente 3,5 kDa. Foram identificados os fragmentos Leu₁-Asp₁₁, que contém o epítomo Leu₁-Gly₈; além dos epítomos Leu₉₅-Leu₁₀₄ e Asp₉₆-Phe₁₀₅, Ile₂₉-Val₄₁ e Tyr₄₂-Leu₅₄. Os peptídeos Phe₁₂₆-Asp₁₃₇, Leu₃₉-Lys₆₉, Trp₆₁-Val₉₂, Glu₁₁₂-Pro₁₄₄ também são prováveis sítios antigênicos já que contêm, respectivamente, os epítomos Pro₁₂₆-Glu₁₃₄, Val₄₁-Gln₆₀, Ala₆₇-Gln₇₈, Glu₁₂₇-Pro₁₄₄, identificados respectivamente por Ball et al. (1994), Sélo et al. (1999) e Jarvinen et al. (2001).

Tabela 15. LC-ESI-MSⁿ – Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β-Lg.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
684,47	684,45	35,26	90 - 95	NKVLVL
769,43	769,45	29,61	35 - 41	QSAPLRV
801,39	801,42	27,16	83 - 89	KIDALNE
805,40	805,40	34,26	150 - 156	SFNPTQL
878,47	878,52	37,10	143 - 149	LPMHIRL
901,48	901,50	31,19	12 - 19	IQKVAGTW
902,51	902,56	34,93	75 - 82	KTKIPAVF
919,50	919,55	26,23	135 - 142	KFDKALKA
929,44	929,45	24,85	123 - 130	VRTPEVDD
931,44	931,43	22,81	96 - 102	DTDYKKY
955,54	955,51	30,03	33 - 41	DAQSAPLRV
968,52	968,52	29,35	46 - 54	LKPTPEGDL
1031,61	1031,60	35,07	74 - 82	EKTKIPAVF
1048,57	1048,59	26,99	134 - 142	EKFDKALKA
1058,47	1058,49	25,25	123 - 131	VRTPEVDDE
1068,60	1068,59	32,42	32 - 41	LDAQSAPLRV
1097,56	1097,56	27,84	46 - 55	LKPTPEGDL
1104,56	1104,59	30,05	2 - 11	IVTQTMKGLD
1120,57	1120,43	25,48	107 - 116	MENSAEPEQS
1129,48	1129,53	25,98	123 - 132	VRTPEVDDEA
1157,57	1157,60	34,82	96 - 104	DTDYKKYLL
1217,61	1217,67	34,74	1 - 11	LIVTQTMKGLD
1270,56	1270,68	36,44	95 - 104	LTDYKKYLL
1304,64	1304,67	40,41	96 - 105	DTDYKKYLLF
1323,56	1323,69	28,34	48 - 59	PTPEGDLLEILLQ
1325,62	1325,67	31,52	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1381,75	1381,79	39,03	29 - 41	ISLLDAQSAPLRV
1405,70	1405,63	31,13	126 - 137	PEVDDEALEKFD
1467,79	1467,87	38,36	83 - 95	KIDALNENKVLVL
1488,67	1488,74	33,08	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1502,77	1502,85	36,68	133 - 145	LEKFDKALKALPM
1513,68	1513,85	38,02	37 - 49	APLRVYVEELKPT
1526,76	1526,83	32,21	134 - 146	EKFDKALKALPMH
1573,84	1573,81	37,77	147 - 159	IRLSFNPTQLEEQ
1617,69	1617,78	31,69	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
2620,26	2620,24	37,29	93 - 114	LVLDTDYKKYLLFCMENSAEPE
3684,71	3684,87	35,68	39 - 69	LRVYVEELKPTPEGDLLEILLQKWENDECAQK
3626,73	3626,95	35,58	61 - 92	WENG ^b ECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKV
3684,71	3684,84	35,68	112 - 144	EPEQSLA ^b CQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALP

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
βLg: βLg na forma nativa.

Após digestão gástrica, as amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG (Tabelas 16 e 17) apresentaram peptídeos contendo 5 aminoácidos e outros com 24 a 29 aminoácidos (MM entre 2,1 a 3,4 kDa aproximadamente). Na β -Lg TT TG foram identificados os epítomos Leu₁-Asp₁₁, Leu₉₅-Leu₁₀₄, Asp₉₆-Phe₁₀₅ e Tyr₄₂-Leu₅₄, os quais também foram identificados nos digeridos gástricos da β -Lg (Tabela 15). Os digeridos da β -Lg TT TG também apresentaram os peptídeos Ser₂₁-Val₄₁, Leu₁-Leu₃₁ e Glu₁₁₄-Ser₁₄₃, que contêm epítomos nas suas sequências. Os digeridos gástricos do polimerizado β -Lg Cys TG (Tabela 16) apresentaram cinco fragmentos caracterizados como epítomos, sendo que quatro deles também foram identificados nos digeridos gástricos da β -Lg nativa (Tabela 15) e o peptídeo Glu₁₁₄-Ser₁₄₃, que contém o epítomo Leu₁₂₄-Ala₁₃₄ em sua sequência.

Tabela 16. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β-Lg TT TG.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
665,35	665,34	20,72	134 - 138	EKFDK
684,41	684,45	35,08	90 - 95	NKVLVL
769,44	769,45	29,68	35 - 41	QSAPLRV
801,39	801,42	27,25	83 - 89	KIDALNE
805,34	805,40	34,17	150 - 156	SFNPTQL
819,38	819,45	24,26	2 - 8	IVTQTMK
855,36	855,43	26,74	47 - 54	KPTPEGDL
876,42	876,47	24,60	2 - 9	IVTQTMKG
878,52	878,52	37,08	143 - 149	LPMHIRL
901,47	901,50	31,27	12 - 19	IQKVAGTW
902,52	902,56	34,76	75 - 82	KTKIPAVF
929,44	929,45	24,94	123 - 130	VRTPEVDD
931,41	931,43	23,07	96 - 102	DTDYKKY
968,46	968,52	29,26	46 - 54	LKPTPEGDL
977,55	977,56	25,52	134 - 141	EKFDKALK
1031,57	1031,60	35,23	74 - 82	EKTKIPAVF
1040,40	1040,49	19,34	20 - 29	YSLAMAASDI
1058,47	1058,49	25,29	123 - 131	VRTPEVDDE
1090,61	1090,64	28,27	133 - 141	LEKFDKALK
1097,52	1097,56	27,83	46 - 55	LKPTPEGDL
1097,53	1097,56	30,29	47 - 56	KPTPEGDL
1104,53	1104,59	30,04	2 - 11	IVTQTMKGLD
1129,47	1129,53	26,08	123 - 132	VRTPEVDDEA
1142,55	1142,63	28,17	83 - 92	KIDALNENKV
1157,57	1157,60	34,92	96 - 104	DTDYKKYLL
1161,62	1161,68	29,43	132 - 141	ALEKFDKALK
1187,60	1187,67	39,96	147 - 156	IRLSFNPTQL
1217,64	1217,67	34,74	1 - 11	LIVTQTMKGLD
1226,55	1226,60	28,67	45 - 55	ELKPTPEGDL
1232,63	1232,71	30,44	132 - 142	ALEKFDKALKA
1242,58	1242,61	31,37	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1255,68	1255,71	32,57	83 - 93	KIDALNENKVL
1260,70	1260,73	34,42	135 - 145	KFDKALKALPM
1290,64	1290,72	31,04	131 - 141	EALEKFDKALK
1304,63	1304,67	40,44	96 - 105	DTDYKKYLLF
1311,47	1311,68	23,69	144 - 154	PMHIRLSFNPT
1325,62	1325,67	31,61	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1328,73	1328,81	37,14	71 - 82	IIAEKTKIPAVF
1375,54	1375,65	28,17	42 - 53	YVEELKPTPEGD
1389,68	1389,77	34,98	134 - 145	EKFDKALKALPM
1456,84	1456,90	36,15	70 - 82	KIIAEKTKIPAVF
1458,66	1458,85	53,49	73 - 85	AEKTKIPAVFKID
1467,80	1467,87	38,12	83 - 95	KIDALNENKVLVL
1488,66	1488,74	33,02	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1502,76	1502,85	36,65	133 - 145	LEKFDKALKALPM
1516,75	1516,82	41,90	94 - 105	VLDTDYKKYLLF
1526,71	1526,83	32,08	134 - 146	EKFDKALKALPMH
1573,80	1573,89	37,64	132 - 145	ALEKFDKALKALPM
1617,68	1617,78	31,75	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
1702,86	1702,93	39,27	131 - 145	EALEKFDKALKALPM
1843,84	1843,95	40,21	42 - 57	YVEELKPTPEGDL
2127,89	2128,12	42,99	21 - 41	SLAMAASDISLLDAQSAPLRV
2782,94	2782,48	39,12	25 - 50	AASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTP
3323,84	3323,75	52,33	1 - 31	LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISL
3361,69	3361,69	50,80	114 - 143	EQSLA ^b CQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKAL

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;

βLg TT TG: βLg tratada termicamente e polimerizada com TG (10 U g⁻¹).

Tabela 17. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β-Lg CysTG.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
769,41	769,45	29,59	35 - 41	QSAPLRV
801,37	801,42	27,17	83 - 89	KIDALNE
805,36	805,40	34,18	150 - 156	SFNPTQL
855,40	855,43	26,65	47 - 54	KPTPEGDL
876,30	876,47	21,60	03 - 10	VTQTMKGL
876,46	876,47	24,57	02 - 09	IVTQTMKG
878,51	878,52	37,00	143 - 149	LPMHIRL
901,49	901,50	31,19	12 - 19	IQKVAGTW
902,53	902,56	34,59	75 - 82	KTKIPAVF
929,44	929,45	24,90	123 - 130	VRTPEVDD
931,40	931,43	22,87	96 - 102	DTDYKKY
955,51	955,51	29,93	33 - 41	DAQSAPLRV
968,47	968,52	29,23	46 - 54	LKPTPEGDL
973,38	973,44	26,42	109 - 117	NSAEPEQSL
1016,48	1016,53	32,71	11 - 19	DIQKVAGTW
1048,54	1048,59	26,90	134 - 142	EKFDKALKKA
1058,47	1058,49	25,23	123 - 131	VRTPEVDDE
1060,41	1060,48	26,48	58 - 65	LQKWEND ^a E
1068,57	1068,59	32,33	32 - 41	LDAQSAPLRV
1077,60	1077,65	35,39	141 - 149	KALPMHIRL
1097,52	1097,56	27,92	46 - 55	LKPTPEGDL
1104,55	1104,59	30,01	02 - 11	IVTQTMKGLD
1129,49	1129,53	25,98	123 - 132	VRTPEVDDEA
1157,58	1157,60	34,66	96 - 104	DTDYKKYLL
1171,52	1171,57	27,40	122 - 131	LVRTPEVDDE
1190,68	1190,73	37,83	140 - 149	LKALPMHIRL
1226,56	1226,60	28,56	45 - 55	ELKPTPEGDL
1231,60	1231,66	33,32	34 - 44	AQSAPLRVYVE
1232,67	1232,71	30,56	132 - 142	ALEKFDKALKKA
1233,43	1233,52	27,90	107 - 117	MENSAEPEQSL
1242,57	1242,61	31,25	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1270,65	1270,68	36,42	95 - 104	LDTDYKKYLL
1289,55	1289,61	23,55	57 - 67	LLQKWENG ^a ECA
1304,63	1304,67	40,46	96 - 105	DTDYKKYLLF
1324,74	1324,73	38,45	146 - 156	HIRLSFNPTQL
1325,62	1325,67	31,67	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1341,66	1341,71	44,33	85 - 96	DALNENKVLVLD
1369,62	1369,75	32,47	93 - 103	LVLDTDYKKYL
1375,58	1375,65	28,15	42 - 53	YVEELKPTPEGD
1381,75	1381,79	38,87	29 - 41	ISLLDAQSAPLRV
1389,72	1389,77	34,90	134 - 145	EKFDKALKALPM
1455,43	1455,77	27,65	145 - 156	MHIRLSFNPTQL
1454,58	1454,71	30,17	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1467,79	1467,87	38,45	83 - 95	KIDALNENKVLV
1454,58	1454,71	30,17	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1488,65	1488,74	33,03	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1502,78	1502,85	36,69	133 - 145	LEKFDKALKALPM
1573,82	1573,89	37,66	132 - 145	ALEKFDKALKALPM
1617,68	1617,78	31,63	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
1639,83	1639,91	33,82	133 - 146	LEKFDKALKALPMH
1702,87	1702,93	39,20	131 - 145	EALEKFDKALKALPM
1710,88	1710,95	35,16	132 - 146	ALEKFDKALKALPMH
1909,02	1909,10	38,00	134 - 149	EKFDKALKALPMHIRL
2093,04	2093,22	40,19	132 - 149	ALEKFDKALKALPMHIRL
3010,47	3010,55	47,40	01 - 28	LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASD
3474,72	3474,70	53,30	112 - 142	EPEQSLA ^b CQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKKA

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
βLg Cys TG: βLg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) na presença de agente redutor Cys (0,1 mol L⁻¹).

Os peptídeos provenientes da digestão gástrica da amostra β -Lg/ alcalase (Tabela 18) e das amostras polimerizadas pós ou pré hidrólise com esta enzima (Tabelas 19 - 21), apresentaram-se menores (média de 2 a 10 aminoácidos) que os obtidos após digestão gástrica da proteína nativa ou das amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG. Quanto à presença de epítomos, para a amostra β -Lg/alcalase (Tabela 18), apenas o epítomo Ile₂₉-Val₄₁, inserido na sequência Ser₂₇-Tyr₄₂, foi identificado.

Tabela 18. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg / alcalase.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
424,06	424,26	17,26	146 - 148	HIR
436,09	436,24	21,95	40 - 42	RVY
459,17	459,27	19,66	72 - 75	IAEK
558,18	558,32	28,55	141 - 145	KALPM
558,27	558,34	29,56	83 - 87	KIDAL
573,33	573,35	18,11	137 - 141	DKALK
640,23	640,27	17,77	96 - 100	DTDYK
645,24	645,30	19,92	155 - 159	QLEEQ
656,34	656,42	23,22	75 - 80	KTKIPA
672,37	672,38	23,48	11 - 16	DIQKVA
715,33	715,39	26,09	88 - 93	NENKVL
902,56	902,56	34,83	75 - 82	KTKIPAVF
929,40	929,45	24,81	123 - 130	VRTPEVDD
931,38	931,43	22,86	96 - 102	DTDYKKY
959,42	959,42	22,69	124 - 131	RTPEVDDE
968,52	968,52	29,31	46 - 54	LKPTPEGDL
1031,61	1031,60	35,25	74 - 82	EKTKIPAVF
1042,51	1042,53	27,10	122 - 130	LVRTPEVDD
1058,49	1058,49	25,23	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,52	1097,56	30,17	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,54	1097,56	27,88	45 - 54	ELKPTPEGDL
1102,44	1102,48	26,66	108 - 117	ENSAEPEQSL
1171,56	1171,57	27,32	122 - 131	LVRTPEVDDE
1212,53	1212,59	25,91	43 - 53	VEELKPTPEGD
1226,55	1226,60	28,74	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1325,64	1325,67	31,59	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1343,57	1343,82	22,55	72 - 83	IAEKTIPAVFK
1346,68	1346,68	42,12	33 - 44	DAQSAPLRVYVE
1454,65	1454,71	30,24	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1472,73	1472,88	45,88	66 - 78	CAQKKIIAEKTKI
1514,61	1514,76	30,50	53 - 64	DLEILLQKWEND ^a
1522,55	1522,84	20,85	141 - 153	KALPMHIRLSFNP
1546,22	1545,86	86,15	64 - 77	G ^b ECAQKKIIAEKTK
1565,18	1564,83	83,02	08 - 21	KGLDIQKVAGTWYS
1572,76	1572,85	41,87	31 - 44	LLDAQSAPLRVYVE
1589,62	1589,81	31,09	63 - 76	ND ^a ECAQKKIIAEKT
1589,62	1589,85	31,09	04 - 18	TQTMKGLDIQKVAGT
1643,61	1643,93	18,45	29 - 43	ISLLDAQSAPLRVYV
1756,63	1757,01	24,05	73 - 88	AEKTKIPAVFKIDALN
1800,71	1800,84	33,66	100 - 114	KKYLLFCMENSAPPE

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
 As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 β Lg/alcalase: β Lg hidrolisada com alcalase (25U g⁻¹).

Os digeridos gástricos das amostras polimerizadas pré hidrólise com alcalase apresentaram apenas um peptídeo que contém epítipo em sua sequência (Ile₂₉-Val₄₁ e Glu₁₂₇-Pro₁₄₄), destacados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β-Lg TT TG/ alcalase.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
373,90	374,22	16,03	83 - 85	KID
424,05	424,26	16,82	146 - 148	HIR
436,04	436,24	21,66	40 - 42	RVY
445,12	445,25	21,11	137 - 140	DKAL
548,25	548,30	27,70	06 - 10	TMKGL
558,23	558,32	28,42	141 - 145	KALPM
573,29	573,35	17,82	137 - 141	DKALK
624,35	624,37	25,57	146 - 150	HIRLS
672,40	672,38	23,38	11 - 16	DIQKVA
673,39	673,42	36,26	77 - 82	KIPAVF
715,33	715,42	25,91	12 - 18	IQKVAGT
715,33	715,39	25,91	88 - 93	NENKVL
855,41	855,43	26,48	47 - 54	KPTPEGDL
860,30	860,35	17,27	109 - 116	NSAEPEQS
901,50	901,50	31,16	12 - 19	IQKVAGTW
901,50	901,51	31,16	91 - 98	KVLVLDTD
902,55	902,56	34,75	75 - 82	KTKIPAVF
929,40	929,45	24,71	123 - 130	VRTPEVDD
931,40	931,43	22,68	96 - 102	DTDYKKY
968,51	968,52	29,36	46 - 54	LKPTPEGDL
973,34	973,44	26,42	109 - 117	NSAEPEQSL
1031,58	1031,60	35,19	74 - 82	EKTIPAVF
1040,52	1040,54	26,14	43 - 51	VEELKPTPE
1042,52	1042,53	27,01	122 - 130	LVRTPEVDD
1044,50	1044,51	30,60	96 - 103	DTDYKKYL
1058,48	1058,49	25,15	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,53	1097,56	30,13	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,54	1097,56	27,74	46 - 55	LKPTPEGDLE
1104,55	1104,59	29,97	02 - 11	IVTQTMKGLD
1126,40	1126,62	28,16	29 - 39	ISLLDAQSAPL
1171,53	1171,57	27,41	122 - 131	LVRTPEVDDE
1171,53	1171,57	27,05	122 - 131	LVRTPEVDDE
1226,59	1226,60	28,58	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1325,63	1325,67	31,50	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1371,61	1371,65	29,60	123 - 134	VRTPEVDDEALE
1432,52	1432,68	20,70	58 - 69	LQKWENG ^b ECAQK
1432,52	1432,61	20,73	108 - 120	ENSAEPEQSLV ^a CQ
1454,63	1454,71	30,01	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1514,61	1514,76	30,26	53 - 64	DLEILLQKWEND ^a
1567,68	1567,80	32,21	43 - 56	VEELKPTPEGDLEI
1589,57	1589,81	30,95	63 - 76	ND ^a ECAQKKIIAEKT
1643,64	1643,80	30,37	53 - 65	DLEILLQKWEND ^a E
1746,67	1746,92	24,38	27 - 42	SDISLLDAQSAPLRVY
1800,68	1800,81	33,56	101 - 115	KYLLFCMENSAEPEQ

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A; As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítipos; βLg TT TG alcalase: βLg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) e hidrolisada com alcalase (25U g⁻¹).

Tabela 20. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β-Lg Cys TG/ alcalase.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
309,03	309,17	16,41	101 - 102	KY
374,08	374,22	15,78	83 - 85	KID
424,04	424,26	16,90	146 - 148	HIR
445,07	445,25	20,97	83 - 86	KIDA
445,07	445,25	20,97	137 - 140	DKAL
573,26	573,35	17,75	137 - 141	DKALK
607,22	607,33	20,78	135 - 139	KFDKA
624,33	624,37	25,59	146 - 150	HIRLS
640,21	640,27	17,58	96 - 100	DTDYK
645,18	645,30	19,61	155 - 159	QLEEQ
672,33	672,38	23,40	11 - 16	DIQKVA
673,38	673,42	36,12	77 - 82	KIPAVF
715,34	715,39	25,87	88 - 93	NENKVL
774,40	774,46	36,37	76 - 82	TKIPAVF
860,25	860,35	17,26	109 - 116	NSAEPEQS
902,52	902,56	34,68	75 - 82	KTKIPAVF
929,41	929,45	24,67	123 - 130	VRTPEVDD
931,37	931,43	22,73	96 - 102	DTDYKKY
968,49	968,52	29,31	46 - 54	LKPTPEGDL
973,39	973,56	26,46	99 - 105	YKKYLLF
1031,58	1031,60	34,94	74 - 82	EKTKIPAVF
1042,49	1042,53	26,95	122 - 130	LVRTPEVDD
1044,47	1044,51	30,79	96 - 103	DTDYKKYL
1058,44	1058,49	25,28	123 - 131	VRTPEVDDE
1058,47	1058,49	24,76	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,54	1097,56	27,78	46 - 55	LKPTPEGDLE
1097,54	1097,56	30,14	45 - 54	ELKPTPEGDL
1102,41	1102,56	26,61	117 - 126	LA ^b CQCLVRTP
1120,38	1120,43	20,10	107 - 116	MENSAEPEQS
1144,65	1144,60	36,63	89 - 98	ENKVLVLDTD
1161,66	1161,68	32,91	133 - 142	LEKFDKALK
1171,52	1171,57	27,20	122 - 131	LVRTPEVDDE
1210,56	1210,65	35,04	47 - 57	KPTPEGDLEIL
1226,53	1226,60	28,52	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1231,54	1231,66	35,21	32 - 42	LDAQSAPLRVY
1233,40	1233,52	27,84	107 - 117	MENSAEPEQSL
1259,66	1259,69	36,90	06 - 17	TMKGLDIQKVAG
1264,49	1264,51	28,07	110 - 121	SAEPEQSLA ^b CQC
1274,52	1274,76	40,09	133 - 143	LEKFDKALKAL
1325,61	1325,67	31,66	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1344,73	1344,74	36,73	31 - 42	LLDAQSAPLRVY
1371,54	1371,65	29,62	123 - 134	VRTPEVDDEALE
1454,63	1454,71	30,12	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1585,80	1585,80	38,82	53 - 65	DLEILLQKWENG ^b E
1589,59	1589,85	30,96	04 - 18	TQTMKGLDIQKVAGT
1704,52	1704,89	22,47	129 - 143	DDEALEKFDKALKAL
2652,17	2652,36	43,25	124 - 146	RTPEVDDEALEKFDKALKALPMH

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
βLg Cys TG alcalase: βLg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) na presença de Cys e hidrolisada com alcalase (25U g⁻¹).

Nos digeridos gástricos do material polimerizado pós hidrólise com alcalase (Tabela 21) foi identificado o peptídeo Ile₂₉-Tyr₄₂, que contém o epítipo Ile₂₉-Val₄₁.

Tabela 21. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β-Lg alcalase/10TG.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
374,03	374,22	16,01	83 - 85	KID
436,08	436,24	21,62	40 - 42	RVY
445,04	445,25	21,03	137 - 140	DKAL
459,14	459,27	19,53	02 - 05	IVTQ
558,12	558,32	28,25	141 - 145	KALPM
573,33	573,35	17,80	137 - 141	DKALK
607,27	607,33	20,71	135 - 139	KFDKA
640,18	640,27	17,46	96 - 100	DTDYK
645,27	645,30	19,70	155 - 159	QLEEQ
672,29	672,38	23,32	11 - 16	DIQKVA
673,41	673,42	36,20	77 - 82	KIPAVF
715,33	715,39	25,87	88 - 93	NENKVL
902,54	902,56	34,68	75 - 82	KTKIPAVF
929,37	929,45	24,68	123 - 130	VRTPEVDD
931,36	931,43	22,56	96 - 102	DTDYKKY
959,35	959,42	22,58	124 - 131	RTPEVDDE
968,49	968,52	29,17	46 - 54	LKPTPEGDL
973,42	973,44	26,38	109 - 117	NSAEPEQSL
1031,55	1031,60	35,02	74 - 82	EKTKIPAVF
1040,46	1040,54	26,10	43 - 51	VEELKPTPE
1042,49	1042,53	26,96	122 - 130	LVRTPEVDD
1042,49	1042,57	26,96	88 - 96	DIQKVA
1044,48	1044,55	30,60	100 - 107	KKYLLFCM
1058,47	1058,49	25,10	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,50	1097,56	27,74	46 - 55	LKPTPEGDL
1097,51	1097,56	30,04	45 - 54	ELKPTPEGDL
1171,52	1171,57	27,03	122 - 131	LVRTPEVDDE
1226,52	1226,60	28,58	45 - 55	ELKPTPEGDL
1274,63	1274,76	40,03	133 - 143	LEKFDKALKAL
1325,61	1325,67	31,52	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1346,66	1346,68	42,11	33 - 44	DAQSAPLRVYVE
1454,63	1454,71	30,02	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1460,63	1460,70	35,88	56 - 67	ILLQKWEND ^a ECA
1514,61	1514,76	30,28	53 - 64	DLEILLQKWEND ^a
1545,10	1544,86	85,63	29 - 42	ISLLDAQSAPLRVY
1589,57	1589,85	30,93	04 - 18	TQTMKGLDIQKVAGT
1671,80	1671,96	43,76	80 - 94	AVFKIDALNENKVLV

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A; As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítipos; βLg alcalase/10 TG: βLg hidrolisada com alcalase (25 U g⁻¹) e polimerizada com TG (10U g⁻¹).

A β -Lg hidrolisada com bromelina e submetida à digestão com pepsina (Tabela 22) apresentou os epítomos Tyr₄₂-Leu₅₄ e, Leu₁-Gly₈, este último inserido na sequência Leu₁-Asp₁₁. Os digeridos gástricos das amostras polimerizadas pré hidrólise com bromelina (Tabelas 23 e 24) apresentaram em comum o epítomo Tyr₄₂-Leu₅₄, que também foi identificado no digerido gástrico da β -Lg (Tabela 15). Além desse determinante, a amostra β -Lg TT TG/bromelina (Tabela 23) apresentou o peptídeo AA64-78, que contém o epítomo Ala₆₇-Ile₇₈ em sua sequência. A amostra β -Lg CysTG/bromelina (Tabela 24) apresentou o epítomo Leu₉₅-Leu₁₀₄ e o fragmento Asp₁-Ile₂₀, que contém o epítomo Leu₁-Ala₁₆ em sua sequência.

Tabela 22. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg/ bromelina.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
455,31	455,29	20,59	37 - 40	APLR
665,30	665,34	20,33	134 - 138	EKFDK
672,39	672,38	23,33	11 - 16	DIQKVA
673,38	673,42	36,19	77 - 82	KIPAVF
684,42	684,45	35,01	90 - 95	NKVLVL
801,40	801,42	26,97	83 - 89	KIDALNE
848,48	848,51	24,35	135 - 141	KFDKALK
849,50	849,46	25,70	132 - 138	ALEKFDK
855,46	855,43	26,55	46 - 53	LKPTPEGD
878,52	878,52	36,95	143 - 149	LPMHIRL
901,48	901,50	31,20	12 - 19	IQKVAGTW
927,52	927,42	35,52	17 - 24	GTWYSLAM
927,52	927,54	35,52	88 - 95	NENKVLVL
929,43	929,45	24,77	123 - 130	VRTPEVDD
931,42	931,43	22,73	96 - 102	DTDYKKY
968,51	968,52	29,26	46 - 54	LKPTPEGDL
977,59	977,56	25,22	134 - 141	EKFDKALK
1016,52	1016,53	32,74	11 - 19	DIQKVAGTW
1030,45	1030,46	23,67	124 - 132	RTPEVDDEA
1044,47	1044,51	26,21	95 - 102	LTDYKKY
1048,56	1048,59	26,72	134 - 142	EKFDKALK
1058,47	1058,49	25,11	123 - 131	VRTPEVDDE
1090,66	1090,64	28,07	133 - 141	LEKFDKALK
1097,56	1097,56	30,11	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,57	1097,56	27,82	46 - 55	LKPTPEGDLE
1129,51	1129,53	25,96	123 - 132	VRTPEVDDEA
1129,63	1129,61	36,97	10 - 19	LDIQKVAGTW
1157,60	1157,60	34,76	96 - 104	DTDYKKYLL
1171,56	1171,57	27,31	122 - 131	LVRTPEVDDE
1215,73	1215,65	35,77	79 - 89	PAVFKIDALNE
1217,69	1217,67	34,60	01 - 11	LIVTQTMKGLD
1226,58	1226,60	28,58	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1226,58	1226,60	30,34	44 - 54	EELKPTPEGDL
1232,77	1232,71	30,44	132 - 142	ALEKFDKALK
1325,66	1325,67	31,49	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1328,83	1328,81	37,12	71 - 82	IIAEKTKIPAVF
1355,60	1355,65	28,94	44 - 55	EELKPTPEGDLE
1436,69	1436,67	33,68	127 - 138	EVDDEALEKFDK
1454,67	1454,71	30,01	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1456,89	1456,90	35,94	70 - 82	KIIAEKTKIPAVF
1467,83	1467,87	37,97	83 - 95	KIDALNENKVLVL
1488,70	1488,74	32,99	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1573,87	1573,76	45,51	111 - 124	AEPEQSLV ^a CQCLVR
1573,87	1573,81	45,51	147 - 159	IRLSFNPTQLEEQ
1617,75	1617,78	31,66	42 - 55	YVEELKPTPEGDLE
1738,71	1738,99	31,03	137 - 151	DKALKALPMHIRLSF

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 β Lg / bromelina: β Lg hidrolisada com bromelina (25 U g⁻¹).

Tabela 23. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da β -Lg TT TG /bromelina.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
455,17	455,29	20,77	37 - 40	APLR
665,32	665,34	20,69	134 - 138	EKFDK
673,38	673,42	36,24	77 - 82	KIPAVF
674,14	674,35	21,74	93 - 98	LVLDTD
684,40	684,45	35,25	90 - 95	NKVLVL
736,35	736,38	22,25	134 - 139	EKFDKA
801,37	801,42	27,23	83 - 89	KIDALNE
805,31	805,40	34,24	150 - 156	SFNPTQL
848,46	848,51	24,62	135 - 141	KFDKALK
855,36	855,43	26,74	47 - 54	KPTPEGDL
878,49	878,52	37,00	143 - 149	LPMHIRL
901,45	901,50	31,33	12 - 19	IQKVAGTW
902,52	902,56	34,81	75 - 82	KTKIPAVF
927,29	927,54	35,67	88 - 95	NENKVLVL
929,41	929,45	24,97	123 - 130	VRTPEVDD
931,37	931,43	23,00	96 - 102	DTDYKKY
968,45	968,52	29,33	46 - 54	LKPTPEGDL
977,52	977,51	25,56	42 - 49	YVEELKPT
1044,48	1044,51	26,47	95 - 102	LTDYKKY
1048,53	1048,59	27,08	134 - 142	EKFDKALKA
1058,45	1058,49	25,20	123 - 131	VRTPEVDDE
1068,56	1068,59	32,38	32 - 41	LDAQSAPLRV
1090,58	1090,64	28,24	133 - 141	LEKFDKALK
1097,51	1097,56	30,27	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,51	1097,56	27,91	46 - 55	LKPTPEGDLE
1104,52	1104,59	30,02	02 - 11	IVTQTMKGLD
1129,45	1129,53	25,96	123 - 132	VRTPEVDDEA
1143,53	1143,58	28,01	94 - 102	VLDTDYKKY
1157,57	1157,60	34,98	96 - 104	DTDYKKYLL
1171,55	1171,57	27,48	122 - 131	LVRTPEVDDE
1215,66	1215,72	35,90	72 - 82	IAEKTIPAVF
1226,52	1226,60	30,60	44 - 54	EELKPTPEGDL
1226,54	1226,60	28,77	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1232,68	1232,64	30,66	03 - 13	VTQTMKGLDIQ
1232,68	1232,71	30,66	132 - 142	ALEKFDKALKA
1242,58	1242,61	31,16	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1325,62	1325,67	31,73	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1328,73	1328,81	37,17	71 - 82	IAEKTIPAVF
1328,73	1328,73	37,17	78 - 89	IPAVFKIDALNE
1375,51	1375,65	28,18	42 - 53	YVEELKPTPEGD
1454,61	1454,71	30,08	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1456,83	1456,90	22,25	134 - 139	EKFDKA
1467,81	1467,87	38,01	83 - 95	KIDALNENKVLVL
1468,76	1468,82	38,52	92 - 103	VLVLDTDYKKYL
1488,63	1488,74	33,13	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1510,57	1510,57	33,07	106 - 119	CMENSAEPEQSLA ^{b,c}
1587,71	1587,80	34,64	41 - 54	VYVEELKPTPEGDL
1605,77	1605,83	37,67	86 - 99	ALNENKVLVLDTDY
1617,66	1617,78	31,71	42 - 55	YVEELKPTPEGDLE
1716,71	1716,91	33,46	33 - 47	DAQSAPLRVYVEELK
1716,71	1716,94	33,46	64 - 78	D ^a ECAQKKIIAEKTKI

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A; As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos; β Lg TT TG/ bromelina: β Lg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) e hidrolisada com bromelina (25U g⁻¹).

Tabela 24. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β-Lg Cys TG /bromelina.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
384,04	384,25	19,24	38 - 40	PLR
386,04	386,26	19,65	122 - 124	LVR
673,33	673,42	36,31	79 - 84	PAVFKI
801,37	801,42	27,25	83 - 89	KIDALNE
805,33	805,40	34,22	150 - 156	SFNPTQL
830,25	830,38	22,24	124 - 130	RTPEVDD
855,36	855,43	26,76	47 - 54	KPTPEGDL
874,31	874,36	23,60	125 - 132	TPEVDDEA
876,26	876,41	21,82	63 - 70	NG ^b ECAQKK
876,40	876,47	24,63	02 - 09	IVTQTMKG
878,48	878,52	37,07	143 - 149	LPMHIRL
901,49	901,50	31,34	12 - 19	IQKVAGTW
902,50	902,56	34,90	75 - 82	KTKIPAVF
927,47	927,54	35,72	88 - 95	NENKVLVL
929,38	929,45	24,88	123 - 130	VRTPEVDD
931,35	931,43	23,01	96 - 102	DTDYKKY
949,49	949,55	37,74	142 - 149	ALPMHIRL
959,35	959,42	22,86	124 - 131	RTPEVDDE
968,46	968,52	29,37	46 - 54	LKPTPEGDL
977,53	977,56	25,47	134 - 141	EKFDKALK
989,34	989,56	25,05	02 - 10	IVTQTMKGL
1030,41	1030,46	23,94	124 - 132	RTPEVDDEA
1058,45	1058,49	25,22	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,51	1097,56	27,93	46 - 55	LKPTPEGDL
1097,54	1097,56	30,23	45 - 54	ELKPTPEGDL
1104,57	1104,59	30,07	02 - 11	IVTQTMKGLD
1120,38	1120,43	20,30	107 - 116	MENSAEPEQS
1129,45	1129,53	25,98	123 - 132	VRTPEVDDEA
1157,55	1157,60	34,96	96 - 104	DTDYKKYLL
1212,56	1212,59	42,73	43 - 53	VEELKPTPEGD
1217,58	1217,58	34,71	113 - 123	PEQSLV ^a CQCLV
1217,58	1217,67	34,71	01 - 11	LIVTQTMKGLD
1226,52	1226,60	28,80	45 - 55	ELKPTPEGDL
1226,54	1226,60	30,52	44 - 54	EELKPTPEGDL
1242,58	1242,61	31,36	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1270,61	1270,68	36,65	95 - 104	LDTDYKKYLL
1292,63	1292,68	36,58	10 - 20	LDIQKVAGTWY
1325,59	1325,67	31,70	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1328,75	1328,81	37,26	71 - 82	IIAEKTKIPAVF
1342,35	1342,59	20,81	16 - 28	AGTWYSLAMAASD
1355,57	1355,65	29,03	44 - 55	EELKPTPEGDL
1377,51	1377,60	29,14	59 - 69	QKWEND ^a ECAQK
1454,59	1454,71	30,13	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1456,81	1456,90	36,14	70 - 82	KIIAEKTKIPAVF
1467,70	1467,87	38,25	83 - 95	KIDALNENKVLVL
1488,66	1488,74	33,19	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1510,60	1510,57	33,13	106 - 119	CMENSAEPEQSLA ^b C
1547,11	1546,82	83,79	06 - 19	TMKGLDIQKVAGTW
1587,69	1587,80	34,73	41 - 54	YYVEELKPTPEGDL
1591,56	1591,78	39,46	21 - 36	SLAMAASDISLLDAQS
1617,68	1617,78	31,76	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
1709,85	1709,88	38,93	06 - 20	TMKGLDIQKVAGTWY
2028,87	2029,05	40,73	21 - 40	SLAMAASDISLLDAQSAPLR
2264,14	2264,22	41,99	01 - 20	LIVTQTMKGLDIQKVAGTWY

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
 As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 βLg Cys TG/ bromelina: βLg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) na presença de Cys (0,1 mol L⁻¹) e hidrolisada com bromelina (25U g⁻¹).

Nos digeridos gástricos do material polimerizado pós hidrólise com bromelina (Tabela 25) foi identificado o epítipo Tyr₄₂–Leu₅₄, e o peptídeo Leu₁-Asp₁₁, que contém o epítipo Leu₁-Gly₈.

Tabela 25. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β-Lg bromelina/10TG

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
665,30	665,34	20,74	134 - 138	EKFDK
672,34	672,38	23,59	11 - 16	DIQKVA
673,30	673,42	36,28	77 - 82	KIPAVF
684,42	684,45	35,03	90 - 95	NKVLVL
801,35	801,42	27,31	83 - 89	KIDALNE
855,37	855,43	26,89	47 - 54	KPTPEGDL
878,44	878,52	37,12	143 - 149	LPMHIRL
901,42	901,50	31,36	12 - 19	IQKVAGTW
927,44	927,54	35,60	88 - 95	NENKVLVL
929,35	929,45	24,95	123 - 130	VRTPEVDD
931,36	931,43	23,17	96 - 102	DTDYKKY
949,48	949,55	37,71	142 - 149	ALPMHIRL
959,32	959,42	22,91	124 - 131	RTPEVDDE
968,42	968,52	29,44	46 - 54	LKPTPEGDL
1016,43	1016,53	32,85	11 - 19	DIQKVAGTW
1030,36	1030,46	23,95	124 - 132	RTPEVDDEA
1058,42	1058,49	25,37	123 - 131	VRTPEVDDE
1068,49	1068,59	32,32	32 - 41	LDAQSAPLRV
1090,53	1090,64	28,33	133 - 141	LEKFDKALK
1097,46	1097,56	28,01	46 - 55	LKPTPEGDL
1097,49	1097,56	30,21	45 - 54	ELKPTPEGDL
1104,49	1104,59	30,04	02 - 11	IVTQTMKGLD
1129,47	1129,53	26,13	123 - 132	VRTPEVDDEA
1157,52	1157,60	35,01	96 - 104	DTDYKKYLL
1191,65	1191,54	41,53	150 - 159	SFNPTQLEEQ
1207,65	1207,52	37,64	151 - 160	FNPTQLEEQC
1212,52	1212,59	25,98	43 - 53	VEELKPTPEGD
1215,65	1215,72	35,85	72 - 82	IAEKTIPAVF
1217,60	1217,67	34,68	01 - 11	LIVTQTMKGLD
1226,50	1226,60	28,75	45 - 55	ELKPTPEGDL
1226,51	1226,60	30,52	44 - 54	EELKPTPEGDL
1232,60	1232,71	30,70	132 - 142	ALEKFDKALKA
1270,61	1270,68	39,18	95 - 104	LDTDYKKYLL
1325,58	1325,67	32,34	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1339,63	1339,77	32,83	84 - 95	IDALNENKVLVL
1344,50	1344,58	38,93	151 - 161	FNPTQLEEQCH
1355,53	1355,65	29,11	44 - 55	EELKPTPEGDL
1369,66	1369,75	37,46	94 - 104	VLDTDYKKYLL
1454,60	1454,71	30,10	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1488,62	1488,74	33,16	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1510,53	1510,57	33,01	106 - 119	CMENSAEPEQSLA ^b c
1617,64	1617,78	31,75	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
1704,67	1704,89	40,26	129 - 143	DDEALEKFDKALKAL

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A; As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítipos; βLg bromelina/ 10TG: βLg hirolisada com bromelina (25 U g⁻¹) e polimerizada com TG (10U g⁻¹).

Nas Tabelas 26 a 36 estão apresentados massa experimental, massa teórica e os peptídeos obtidos após digestão gastrointestinal das amostras. Os peptídeos obtidos após digestão gastrointestinal da β -Lg nativa (Tabela 26) apresentaram peptídeos com menor número de aminoácidos na sequência, ou seja, de MM menor, em comparação aos peptídeos do digerido gástrico. O resultado é indicativo de hidrólise dos peptídeos provenientes da pepsinólise, confirmando os dados obtidos por CLAE-FR (Figura 18, página 92). Quanto aos epítomos, verificou-se que o peptídeo Tyr₄₂-Leu₅₄ foi resistente à digestão gastrointestinal e outros três foram liberados após esta etapa de digestão.

Tabela 26. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β-Lg.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
424,00	424,20	17,29	98 - 100	DYK
424,00	424,26	17,29	146 - 148	HIR
461,10	461,23	43,12	60 - 62	KWE
461,10	461,23	43,12	120 - 123	QCLV
537,28	537,34	29,49	146 - 149	HIRL
572,22	572,35	27,19	01 - 05	LIVTQ
572,27	572,35	21,73	71 - 75	IIAEK
665,32	665,34	20,62	134 - 138	EKFDK
672,32	672,38	26,41	09 - 14	GLDIQK
672,32	672,38	26,41	07 - 14	GLDIQK
700,40	700,45	22,83	70 - 75	KIAEK
774,42	774,46	36,32	76 - 82	TKIPAVF
819,42	819,45	24,13	02 - 08	IVTQTMK
852,34	852,42	25,74	94 - 100	VLDTDYK
856,44	856,44	23,09	33 - 40	DAQSAPLR
929,43	929,45	24,79	123 - 130	VRTPEVDD
932,50	932,54	29,91	01 - 08	LIVTQTMK
968,46	968,52	29,24	46 - 54	LKPTPEGDL
980,46	980,52	24,28	94 - 101	VLDTDYKK
1030,52	1030,46	43,75	124 - 132	RTPEVDDEA
1040,40	1040,54	19,26	43 - 51	VEELKPTPE
1043,53	1043,56	25,20	83 - 91	KIDALNENK
1058,42	1058,49	25,24	123 - 131	VRTPEVDDE
1064,56	1064,58	33,72	92 - 100	VLVLDTDYK
1097,51	1097,56	27,80	46 - 55	LKPTPEGDL
1097,54	1097,56	30,16	45 - 54	ELKPTPEGDL
1127,57	1127,62	33,31	84 - 93	IDALNENKVL
1190,56	1190,62	43,36	21 - 32	SLAMAASDISLL
1192,64	1192,67	31,85	92 - 101	VLVLDTDYKK
1242,55	1242,61	31,25	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1244,52	1244,58	27,68	125 - 135	TPEVDDEALEK
1255,67	1255,71	32,44	83 - 93	KIDALNENKVL
1289,52	1289,66	23,60	35 - 45	QSAPLRVYVEE
1314,70	1314,73	37,34	08 - 19	KGLDIQKVAGTW
1318,66	1318,59	40,19	112 - 123	EPEQSLACQCLV
1325,62	1325,67	31,51	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1328,76	1328,81	38,25	71 - 82	IIAEKTKIPAVF
1332,38	1332,67	20,28	148 - 158	RLSFNPTQLEE
1346,68	1346,68	40,69	33 - 44	DAQSAPLRVYVE
1349,56	1349,70	39,96	09 - 20	GLDIQKVAGTWY
1353,67	1353,69	45,13	20 - 32	YSLAMAASDISLL
1369,60	1369,75	44,09	93 - 103	LVLDTDYKKYL
1375,61	1375,65	45,12	42 - 53	YVEELKPTPEGD
1391,56	1391,65	35,13	125 - 136	TPEVDDEALEKF
1424,76	1424,83	48,13	140 - 151	LKALPMHIRLSF
1450,75	1450,75	45,88	11 - 23	DIQKVAGTWYSLA
1477,70	1477,79	38,75	08 - 20	KGLDIQKVAGTWY
1488,64	1488,74	32,90	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1499,62	1499,75	28,83	123 - 135	VRTPEVDDEALEK
1546,70	1546,82	38,68	06 - 19	TMKGLDIQKVAGTW
1634,66	1634,77	32,52	125 - 138	TPEVDDEALEKFDK
1646,70	1646,82	35,15	123 - 136	VRTPEVDDEALEKF
1669,66	1669,94	39,49	79 - 93	PAVFKIDALNENKVL
1672,63	1672,79	22,32	113 - 127	PEQSLA ^b CQCLVRTPE
1680,81	1680,88	39,86	43 - 57	VEELKPTPEGDL
1680,82	1680,88	39,41	43 - 57	VEELKPTPEGDL
1709,78	1709,88	40,12	06 - 20	TMKGLDIQKVAGTWY
1889,81	1889,94	34,07	123 - 138	VRTPEVDDEALEKFDK
1889,81	1889,94	32,76	123 - 138	VRTPEVDDEALEKFDK
1921,95	1922,03	42,44	43 - 59	VEELKPTPEGDL
1942,93	1943,01	41,79	41 - 57	YVVEELKPTPEGDL
2049,95	2050,12	41,94	43 - 60	VEELKPTPEGDL
2055,93	2056,10	44,67	41 - 58	YVVEELKPTPEGDL
2236,09	2236,20	47,06	43 - 61	VEELKPTPEGDL
2312,19	2312,25	42,79	41 - 60	YVVEELKPTPEGDL
2373,89	2374,26	27,03	62 - 82	END ^b ECAQKKIAEKTIPAVF
2498,25	2498,33	47,54	41 - 61	YVVEELKPTPEGDL
2975,18	2975,62	35,80	74 - 99	EKTIPAVFKIDALNENKVLVLDTDY

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epitopos;
βLg: βLg na forma não tratada.

Os peptídeos liberados na digestão gastrointestinal das amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG (Tabela 27 e 28) apresentaram menor tamanho, em relação ao número de aminoácidos, que os resultantes da pepsinólise, confirmando os resultados obtidos por CLAE-FR (Figura 18, página 92). Os digeridos gastrointestinais de ambas as amostras apresentaram os epítomos Leu₁-Lys₈, proveniente da hidrólise do peptídeo Leu₁-Asp₁₁ presente nos digeridos gástricos (Tabelas 16 e 17) e Tyr₄₂-Leu₅₄, que foi resistente à ação das enzimas gastrointestinais.

Tabela 27. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β-Lg TT TG.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
424,09	424,26	17,45	146 - 148	HIR
537,26	537,34	29,54	146 - 149	HIRL
544,30	544,29	19,04	09 - 13	GLDIQ
545,13	545,32	37,00	78 - 82	IPAVF
572,30	572,35	21,81	71 - 75	IIAEK
640,25	640,27	17,77	96 - 100	DTDYK
665,32	665,34	20,70	134 - 138	EKFDK
700,46	700,45	22,94	70 - 75	KIIAEK
768,34	768,37	17,43	96 - 101	DTDYKK
778,39	778,42	24,62	133 - 138	LEKFDK
801,39	801,42	27,22	83 - 89	KIDALNE
803,23	803,32	22,41	125 - 131	TPEVDDE
805,34	805,40	34,24	150 - 156	SFNPTQL
819,43	819,45	24,19	02 - 08	IVTQTMK
836,43	836,47	30,64	142 - 148	ALPMHIR
849,49	849,46	25,89	132 - 138	ALEKFDK
929,42	929,45	24,87	123 - 130	VRTPEVDD
931,40	931,43	23,00	96 - 102	DTDYKKY
932,50	932,54	29,96	01 - 08	LIVTQTMK
965,52	965,51	34,99	93 - 100	LVLDTDYK
968,50	968,52	29,29	46 - 54	LKPTPEGDL
1043,53	1043,56	25,22	83 - 91	KIDALNENK
1058,47	1058,49	25,28	123 - 131	VRTPEVDDE
1064,58	1064,58	33,80	92 - 100	VLVLDTDYK
1097,54	1097,56	30,24	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,55	1097,56	27,90	46 - 55	LKPTPEGDL
1129,49	1129,53	26,04	123 - 132	VRTPEVDDEA
1142,58	1142,63	28,41	83 - 92	KIDALNENKV
1226,54	1226,60	30,47	44 - 54	EELKPTPEGDL
1226,58	1226,60	28,76	45 - 55	ELKPTPEGDL
1242,57	1242,61	31,42	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1244,54	1244,58	27,64	125 - 135	TPEVDDEALEK
1260,58	1260,62	28,39	42 - 52	YVEELKPTPEG
1283,60	1283,48	32,14	105 - 115	FCMENSAPPEQ
1289,54	1289,70	23,60	81 - 91	VFKIDALNENK
1307,63	1307,66	29,31	89 - 99	ENKVLVLDTDY
1325,64	1325,67	31,66	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1328,72	1328,81	38,09	71 - 82	IIAEKTIKIPAVF
1328,72	1328,73	38,09	78 - 89	IPAVFKIDALNE
1341,67	1341,71	44,40	85 - 96	DALNENKVLVLD
1360,55	1360,74	41,89	06 - 18	TMKGLDIQKVAGT
1375,57	1375,65	28,15	42 - 53	YVEELKPTPEGD
1391,60	1391,65	35,31	125 - 136	TPEVDDEALEKF
1397,55	1397,79	28,17	135 - 146	KFDKALKALPMH
1454,64	1454,71	30,13	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1467,70	1467,87	39,11	83 - 95	KIDALNENKVLVL
1477,71	1477,79	38,60	08 - 20	KGLDIQKVAGTWY
1488,64	1488,74	33,57	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1488,67	1488,71	33,01	24 - 38	MAASDISLLDAQSAP
1488,67	1488,74	33,01	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1530,65	1530,84	35,90	03 - 16	VTQTMKGLDIQKVA
1585,83	1585,80	40,03	53 - 65	DLEILLQKWENG ^b E
1601,75	1601,80	36,24	24 - 39	MAASDISLLDAQSAPL
1617,69	1617,78	32,16	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
1634,67	1634,77	32,65	125 - 138	TPEVDDEALEKFDK
1646,66	1646,82	35,06	123 - 136	VRTPEVDDEALEKF
1669,66	1669,94	39,55	79 - 93	PAVFKIDALNENKVL
1680,82	1680,88	39,36	43 - 57	VEELKPTPEGDL
1843,83	1843,95	40,62	42 - 57	YVEELKPTPEGDL
2236,17	2236,20	47,04	43 - 61	VEELKPTPEGDL

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
βLg TT TG: βLg tratada termicamente e polimerizada com TG (10 U g⁻¹).

Tabela 28. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β-Lg CysTG.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
272,96	273,18	14,42	40 - 41	RV
424,08	424,26	17,38	146 - 148	HIR
461,09	461,23	43,40	120 - 123	QCLV
545,27	545,32	37,15	78 - 82	IPAVF
573,24	573,35	18,26	137 - 141	DKALK
640,25	640,27	18,00	96 - 100	DTDYK
665,28	665,34	20,81	134 - 138	EKFDK
700,37	700,45	22,92	70 - 75	KIIAEK
736,36	736,38	22,43	134 - 139	EKFDKA
801,40	801,42	27,22	83 - 89	KIDALNE
805,38	805,40	34,29	150 - 156	SFNPTQL
819,42	819,45	24,19	02 - 08	IVTQTMK
849,44	849,46	25,95	132 - 138	ALEKFDK
876,26	876,47	21,98	03 - 10	VTQTMKGL
929,44	929,45	25,03	123 - 130	VRTPEVDD
932,51	932,54	30,01	01 - 08	LIVTQTMK
968,48	968,52	29,42	46 - 54	LKPTPEGDL
973,39	973,44	26,63	109 - 117	NSAEPEQSL
1031,56	1031,60	35,29	74 - 82	EKTKIPAVF
1043,55	1043,56	25,30	83 - 91	KIDALNENK
1058,45	1058,49	25,45	123 - 131	VRTPEVDDE
1064,55	1064,58	33,85	92 - 100	VLVLDTDYK
1097,52	1097,56	30,27	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,52	1097,56	27,98	46 - 55	LKPTPEGdle
1099,51	1099,50	38,65	18 - 27	TWYSLAMAAS
1129,48	1129,53	26,14	123 - 132	VRTPEVDDEA
1226,52	1226,60	30,60	44 - 54	EELKPTPEGDL
1226,55	1226,60	28,84	45 - 55	ELKPTPEGdle
1233,48	1233,52	28,24	107 - 117	MENSAEPEQSL
1242,59	1242,61	31,46	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1244,52	1244,58	27,72	125 - 135	TPEVDDEALEK
1255,68	1255,71	32,62	83 - 93	KIDALNENKVL
1260,57	1260,62	28,47	42 - 52	YVEELKPTPEG
1272,70	1272,58	34,87	124 - 134	RTPEVDDEALE
1289,53	1289,65	23,60	22 - 34	LAMAASDISLLDA
1310,45	1310,59	21,13	152 - 162	NPTQLEEQCHI
1325,63	1325,67	31,71	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1342,37	1342,59	20,88	16 - 28	AGTWYSLAMAASD
1349,63	1349,70	39,75	09 - 20	GLDIQKVAGTWY
1360,58	1360,74	41,69	06 - 18	TMKGLDIQKVAGT
1381,66	1381,59	39,16	103 - 114	LLFCMENSAPPE
1391,62	1391,65	35,36	125 - 136	TPEVDDEALEKF
1454,63	1454,71	30,29	43 - 55	VEELKPTPEGdle
1455,43	1455,77	27,91	145 - 156	MHIRLSFNPTQL
1455,89	1455,77	46,98	145 - 156	MHIRLSFNPTQL
1458,81	1458,85	40,11	73 - 85	AEKTKIPAVFKID
1470,69	1470,76	40,45	25 - 39	AASDISLLDAQSAPL
1477,72	1477,79	38,39	08 - 20	KGLDIQKVAGTWY
1488,67	1488,74	33,19	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1510,61	1510,57	33,12	106 - 119	CMENSAEPEQSLA ^b C
1530,64	1530,75	35,95	56 - 68	ILLQKWENG ^b ECAQ
1601,69	1601,80	37,30	24 - 39	MAASDISLLDAQSAPL
1634,68	1634,77	32,77	125 - 138	TPEVDDEALEKFDK
1646,74	1646,82	35,21	123 - 136	VRTPEVDDEALEKF
1680,85	1680,88	39,41	43 - 57	VEELKPTPEGdleIL
1737,72	1737,81	24,55	99 - 112	YKYLFCMENSAE
1776,73	1776,80	36,28	116 - 131	SLA ^b CQCLVRTPEVDDE
1872,88	1872,95	42,81	21 - 39	SLAMAASDISLLDAQSAPL
2049,97	2050,12	41,27	43 - 60	VEELKPTPEGdleILLQK

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
βLg Cys TG: βLg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) na presença de agente redutor Cys (0,1 mol L⁻¹).

Os peptídeos provenientes da simulação da digestão gastrointestinal da β -Lg/alcalase (Tabela 29) e dos polimerizados pré ou pós hidrólise com alcalase (Tabelas 30 - 32) apresentaram várias sequências peptídicas análogas às aquelas provenientes da digestão gástrica (Tabelas 18 – 21, respectivamente), enquanto outros, com menor número de aminoácidos e, portanto, de MM menor que aqueles procedentes da digestão gástrica, foram identificados. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por CLAE-FR (Figura 19, página 95), que mostrou aumento na intensidade dos picos na região mais hidrofílica após simulação da digestão gastrointestinal destas amostras, indicativo de que houve formação de peptídeos menores. Nestas amostras, os epítomos foram clivados após digestão gastrointestinal.

Tabela 29. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β -Lg /alcalase.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
378,03	378,19	14,05	06 - 08	TMK
386,17	386,26	19,55	122 - 124	LVR
424,04	424,26	17,07	146 - 148	HIR
436,04	436,24	21,85	40 - 42	RVY
444,11	444,26	23,82	71 - 74	IIAE
445,12	445,25	21,36	137 - 140	DKAL
463,09	463,28	48,53	80 - 83	AVFK
502,14	502,28	17,33	11 - 14	DIQK
545,23	545,32	37,12	78 - 82	IPAVF
572,21	572,35	27,19	01 -05	LIVTQ
572,21	572,35	27,19	71 - 75	IIAEK
573,24	573,35	18,01	137 - 141	DKALK
607,21	607,33	20,94	135 - 139	KFDKA
640,22	640,27	17,67	96 - 100	DTDYK
645,32	645,30	19,81	155 - 159	QLEEQ
673,41	673,42	36,28	77 - 82	KIPAVF
715,39	715,42	26,19	11 - 18	IQKVAGT
774,43	774,46	36,53	76 - 82	TKIPAVF
803,29	803,32	22,27	125 - 131	TPEVDDE
929,41	929,49	24,82	97 - 103	TDYKKYL
929,41	929,45	24,82	123 - 130	VRTPEVDD
959,39	959,42	22,78	124 - 131	RTPEVDDE
968,52	968,52	29,30	46 - 54	LKPTPEGDL
989,32	989,39	17,84	108 - 116	ENSAEPEQS
998,59	998,49	49,01	44 - 52	EELKPTPEG
1044,43	1044,47	25,74	109 - 118	NSAEPEQSLA ^a
1058,48	1058,49	25,24	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,52	1097,56	30,17	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,55	1097,56	27,86	46 - 55	LKPTPEGDLE
1103,55	1103,59	34,69	22 - 32	LAMAASDISLL
1126,43	1126,62	28,37	29 - 39	ISLLDAQSAPL
1210,61	1210,65	35,10	46 - 56	LKPTPEGDLEI
1226,57	1226,60	28,62	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1325,61	1325,67	31,95	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1343,57	1343,82	22,72	72 - 83	IAEKTKIPAVFK
1344,57	1344,58	39,42	151 - 161	FNPTQLEEQCH
1360,60	1360,74	41,63	65 - 76	ECAQKKIAEKT
1360,60	1360,65	41,63	118 - 129	V ^a CQCLVRTPEVD
1360,60	1360,74	41,63	06 - 18	TMKGLDIQKVAGT
1399,65	1399,74	29,63	53 - 63	DLEILLQKWEN
1432,52	1432,68	20,83	58 - 69	LQKWENG ^b ECAQK
1454,65	1454,71	30,23	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1460,66	1460,73	33,67	148 - 159	RLSFNPTQLEEQ
1567,71	1567,80	32,29	43 - 56	VEELKPTPEGDLEI
1572,76	1572,85	42,06	31 - 44	LLDAQSAPLRVYVE
1669,71	1669,94	39,35	78 - 92	IPAVFKIDALNENKV
1864,87	1865,04	34,41	140 - 155	LKALPMHIRLSFNPTQ

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A; As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos; β Lg/alcalase: β Lg hidrolisada com alcalase (25U g⁻¹).

Tabela 30. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β -Lg TT TG/ alcalase.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
445,11	445,25	21,19	137 - 140	DKAL
424,04	424,26	16,93	146 - 148	HIR
436,01	436,24	21,78	40 - 42	RVY
463,08	463,28	48,12	80 - 83	AVFK
463,10	463,21	48,72	150 - 153	SFNP
545,25	545,32	37,09	78 - 82	IPAVF
558,25	558,32	28,39	141 - 145	KALPM
573,28	573,35	17,87	137 - 141	DKALK
640,21	640,27	17,61	96 - 100	DTDYK
645,27	645,30	19,83	155 - 159	QLEEQ
673,35	673,42	36,24	77 - 82	KIPAVF
676,73	676,32	56,89	115 - 120	QSLV ^a CQ
715,35	715,39	26,04	88 - 93	NENKVL
803,26	803,42	22,29	07 - 13	MKGLDIQ
803,26	803,32	22,29	125 - 131	TPEVDDE
860,28	860,35	17,38	109 - 116	NSAEPEQS
929,40	929,59	24,75	69 - 76	KKIIAECT
929,40	929,45	24,75	123 - 130	VRTPEVDD
959,36	959,42	22,71	124 - 131	RTPEVDDE
968,48	968,52	29,23	46 - 54	LKPTPEGDL
998,56	998,45	48,06	155 - 162	QLEEQCHI
1044,43	1044,47	25,68	109 - 118	NSAEPEQSLA ^b
1058,46	1058,49	25,17	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,52	1097,56	27,80	46 - 55	LKPTPEGDLE
1097,52	1097,56	30,19	45 - 54	ELKPTPEGDL
1126,38	1126,62	28,22	29 - 39	ISLLDAQSAPL
1210,54	1210,65	35,23	47 - 57	KPTPEGDLEIL
1212,51	1212,59	25,85	43 - 53	VEELKPTPEGD
1226,54	1226,60	28,64	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1242,59	1242,61	42,42	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1325,61	1325,67	31,66	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1344,61	1344,58	39,48	151 - 161	FNPTQLEEQCH
1360,59	1360,74	41,57	06 - 18	TMKGLDIQKVAGT
1367,60	1367,69	33,45	14 - 26	KVAGTWYSLAMAA
1432,49	1432,68	20,79	58 - 69	LQKWENG ^b ECAQK
1442,43	1442,76	19,00	85 - 97	DALNENKVLVLDL
1454,61	1454,71	30,07	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1572,72	1572,89	41,93	02 - 15	IVTQTMKGLDIQKV

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 β Lg TT TG alcalase: β Lg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) e hidrolisada com alcalase (25U g⁻¹).

Tabela 31. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β -Lg Cys TG/alcalase

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
273,01	273,18	13,85	40 - 41	RV
374,00	374,23	16,45	148 - 150	RLS
386,16	386,26	19,55	122 - 124	LVR
424,10	424,26	17,05	146 - 148	HIR
436,05	436,24	21,85	40 - 42	RVY
444,99	445,25	21,28	137 - 140	DKAL
445,91	446,24	32,61	28 - 31	DISL
463,16	463,21	48,08	150 - 153	SFNP
536,18	536,30	19,20	135 - 138	KFDK
607,30	607,33	20,92	135 - 139	KFDKA
640,25	640,27	17,73	96 - 100	DTDYK
715,35	715,39	26,08	88 - 93	NENKVL
803,25	803,32	22,37	125 - 131	TPEVDDE
860,29	860,35	17,50	109 - 116	NSAEPEQS
929,45	929,45	24,80	123 - 130	VRTPEVDD
959,41	959,42	22,71	124 - 131	RTPEVDDE
968,51	968,52	29,32	46 - 54	LKPTPEGDL
973,40	973,56	26,49	99 - 105	YKKYLLF
973,40	973,44	26,49	109 - 117	NSAEPEQSL
989,34	989,39	17,99	108 - 116	ENSAEPEQS
998,58	998,49	48,59	44 - 52	EELKPTPEG
1058,45	1058,49	25,47	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,53	1097,56	30,19	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,53	1097,56	30,19	47 - 56	KPTPEGDLEI
1097,56	1097,56	27,82	46 - 55	LKPTPEGDLE
1102,42	1102,48	26,85	108 - 117	ENSAEPEQSL
1120,37	1120,43	20,23	107 - 116	MENSAEPEQS
1191,48	1191,53	32,12	60 - 69	KWENG ^b ECAQK
1226,57	1226,60	28,64	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1231,63	1231,62	35,44	62 - 72	ENG ^b ECAQKKII
1231,63	1231,66	35,44	32 - 42	LDAQSAPLRVY
1253,55	1253,69	35,27	50 - 60	PEGDLEILLQK
1325,64	1325,67	31,60	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1344,59	1344,58	39,51	151 - 161	FNPTQLEEQCH
1367,67	1367,69	33,55	14 - 26	KVAGTWYSLAMAA
1454,66	1454,71	30,27	43 - 55	VEELKPTPEGDLE

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 β Lg Cys TG alcalase: β Lg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) na presença de Cys e hidrolisada com alcalase (25U g⁻¹).

Tabela 32. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão triptica da β -Lg alcalase/10TG.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
373,98	374,23	15,98	148 - 150	RLS
386,05	386,26	19,48	122 - 124	LVR
424,11	424,26	16,92	146 - 148	HIR
445,09	445,22	21,18	32 - 35	LDAQ
445,09	445,25	21,18	137 - 140	DKAL
463,13	463,28	47,75	80 - 83	AVFK
463,15	463,21	48,32	150 - 153	SFNP
502,15	502,28	17,26	11 - 14	DIQK
536,24	536,30	19,16	135 - 138	KFDK
545,24	545,32	37,07	78 - 82	IPAVF
558,29	558,34	29,48	83 - 87	KIDAL
572,19	572,35	27,12	01 - 05	LIVTQ
607,28	607,33	20,86	135 - 139	KFDKA
640,24	640,27	17,69	96 - 100	DTDYK
645,23	645,30	19,84	155 - 159	QLEEQ
673,40	673,42	36,23	77 - 82	KIPAVF
715,36	715,42	26,02	12 - 18	IQKVAGT
715,36	715,39	26,02	88 - 93	NENKVL
715,36	715,34	26,02	153 - 158	PTQLEE
803,27	803,32	22,37	125 - 131	TPEVDDE
855,34	855,43	26,62	47 - 54	KPTPEGDL
860,31	860,35	17,45	109 - 116	NSAEPEQS
929,42	929,45	24,83	123 - 130	VRTPEVDD
959,38	959,42	22,79	124 - 131	RTPEVDDE
968,52	968,52	29,33	46 - 54	LKPTPEGDL
973,36	973,44	26,60	109 - 117	NSAEPEQSL
998,57	998,49	47,69	44 - 52	EELKPTPEG
1058,51	1058,49	25,25	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,55	1097,56	30,16	45 - 54	ELKPTPEGDL
1097,60	1097,56	27,79	46 - 55	LKPTPEGDLE
1102,42	1102,48	26,86	108 - 117	ENSAEPEQSL
1126,41	1126,62	28,30	29 - 39	ISLLDAQSAPL
1210,54	1210,65	35,13	46 - 56	LKPTPEGDLEI
1212,57	1212,59	25,92	43 - 53	VEELKPTPEGD
1213,42	1213,74	32,10	77 - 87	KIPAVFKIDAL
1218,65	1218,62	44,73	22 - 33	LAMAASDISLLD
1226,64	1226,60	28,64	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1325,71	1325,67	31,53	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1344,57	1344,58	39,37	151 - 161	FNPTQLEEQCH
1346,71	1346,67	42,33	116 - 127	SLV ^a CQCLVRTPE
1347,51	1347,61	31,34	57 - 67	LLQKWEND ^b ECA
1432,50	1432,61	20,76	108 - 120	ENSAEPEQSLV ^a CQ
1454,72	1454,71	30,23	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1460,67	1460,73	33,62	148 - 159	RLSFNPTQLEEQ
1476,58	1476,90	30,00	138 - 150	KALKALPMHIRLS
1488,65	1488,76	42,84	63 - 75	ND ^b ECAQKIIAEK
1552,44	1552,82	30,65	144 - 156	PMHIRLSFNPTQL
1614,67	1614,93	37,43	82 - 95	FKIDALNENKVLVL
1643,54	1643,80	18,29	53 - 65	DLEILLQKWEND ^b E
1669,67	1669,94	39,54	79 - 93	PAVFKIDALNENKVL

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 β Lg alcalase/10 TG: β Lg hidrolisada com alcalase (25 U g⁻¹) e polimerizada com TG (10U g⁻¹).

Em relação aos peptídeos provenientes da digestão gastrointestinal da β -Lg /bromelina (Tabela 33) e dos polimerizados pós ou pré hidrólise com esta enzima (Tabelas 34 - 36), várias sequências peptídicas identificadas foram semelhantes às aquelas presentes nos digeridos gástricos (Tabelas 22 - 25, respectivamente), inclusive o epítipo Tyr₄₂-Leu₅₄, indicando resistência deste fragmento à ação das enzimas digestivas gástricas e intestinais. Para a β -Lg bromelina/10TG, além deste determinante antigênico, foi identificado o epítipo Ile₂₉-Val₄₁, inserido na sequência Ala₂₆-Val₄₃.

Tabela 33. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão péptica da amostra β -Lg/ bromelina

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
273,00	273,13	8,05	36 - 38	SAP
273,00	273,18	8,05	123 - 124	VR
387,07	387,25	15,69	58 - 60	LQK
387,07	387,29	15,69	69 - 71	KKI
424,06	424,26	16,83	146 - 148	HIR
502,14	502,28	17,16	11 - 14	DIQK
506,15	506,25	16,03	5-8	QTMK
545,26	545,32	36,98	78 - 82	IPAVF
571,20	571,30	25,62	152 - 156	NPTQL
606,37	606,34	29,51	132 - 136	ALEKF
640,24	640,27	17,59	96 - 100	DTDYK
665,37	665,34	20,23	134 - 138	EKFDK
673,35	673,42	36,13	77 - 82	KIPAVF
801,37	801,50	26,97	70 - 76	KIAEKT
801,37	801,42	26,97	83 - 89	KIDALNE
805,36	805,40	34,11	150 - 156	SFNPTQL
830,34	830,45	22,03	11 - 18	DIQKVAGT
855,38	855,43	26,45	47 - 54	KPTPEGDL
929,43	929,45	24,75	123 - 130	VRTPEVDD
968,50	968,52	29,17	46 - 54	LKPTPEGDL
1030,56	1030,65	43,33	75 - 83	KTKIPAVFK
1058,45	1058,49	25,09	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,52	1097,56	27,73	46 - 55	LKPTPEGDLE
1097,53	1097,56	30,03	45 - 54	ELKPTPEGDL
1119,44	1119,55	27,67	115 - 124	QSLA ^b CQCLVR
1129,46	1129,53	25,86	123 - 132	VRTPEVDDEA
1226,53	1226,60	28,60	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1226,56	1226,60	30,32	44 - 54	EELKPTPEGDL
1325,63	1325,67	31,52	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1436,67	1436,67	33,50	127 - 138	EVDDEALEKFDK
1454,66	1454,71	29,93	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1488,65	1488,74	32,99	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1510,61	1510,57	32,93	106 - 119	CMENSAEPEQSLA ^b C
1581,80	1581,81	38,67	44 - 57	EELKPTPEGDLEIL
1614,66	1614,93	37,42	82 - 95	FKIDALNENKVLVL
1617,70	1617,78	31,66	42 - 55	YVEELKPTPEGDLE
1680,79	1680,88	39,18	43 - 57	VEELKPTPEGDLEIL
1710,51	1710,87	21,00	146 - 159	HIRLSFNPTQLEEQ
1916,86	1916,97	44,52	126 - 142	PEVDDEALEKFDKALKA

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 β Lg / bromelina: β Lg hidrolisada com bromelina (25 U g⁻¹).

Tabela 34. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β -Lg TT TG /bromelina.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
387,03	387,29	16,00	69 - 71	KKI
387,03	387,25	16,00	12 - 14	IQK
424,08	424,26	17,23	146 - 148	HIR
461,04	461,23	43,34	120 - 123	QCLV
537,19	537,34	29,56	146 - 149	HIRL
567,28	567,27	37,11	19 - 22	WYSL
640,21	640,27	17,87	96 - 100	DTDYK
670,22	670,38	22,29	35 - 40	QSAPLR
676,47	676,36	56,89	05 - 10	QTMKGL
676,47	676,32	56,89	115 - 120	QSLV ^a CQ
801,35	801,50	27,20	70 - 76	KIAEKT
801,35	801,42	27,20	83 - 89	KIDALNE
805,34	805,40	34,32	150 - 156	SFNPTQL
874,30	874,36	23,81	125 - 132	TPEVDDEA
929,41	929,45	24,92	123 - 130	VRTPEVDD
968,45	968,52	29,33	46 - 54	LKPTPEGDL
1030,53	1030,51	43,24	121 - 129	CLVRTPEVD
1042,76	1042,57	77,00	97 - 104	TDYKKYLL
1058,43	1058,49	25,25	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,51	1097,56	27,88	46 - 55	LKPTPEGDL
1097,53	1097,56	30,15	45 - 54	ELKPTPEGDL
1129,44	1129,53	26,02	123 - 132	VRTPEVDDEA
1213,52	1213,74	32,21	77 - 87	KIPAVFKIDAL
1226,53	1226,60	30,48	44 - 54	EELKPTPEGDL
1226,57	1226,60	28,64	45 - 55	ELKPTPEGDL
1255,66	1255,71	32,55	83 - 93	KIDALNENKVL
1325,61	1325,67	31,65	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1344,55	1344,74	39,28	31 - 42	LLDAQSAPLRVY
1355,57	1355,65	28,99	44 - 55	EELKPTPEGDL
1360,57	1360,74	41,90	65 - 76	ECAQKKIAEKT
1384,58	1384,63	24,41	17 - 29	GTWYSLAMAASDI
1391,56	1391,65	35,31	125 - 136	TPEVDDEALEKF
1428,49	1428,83	38,62	76 - 88	TKIPAVFKIDALN
1436,64	1436,67	33,71	127 - 138	EVDDEALEKFDK
1454,65	1454,71	30,17	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1488,65	1488,74	33,03	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1510,59	1510,57	33,05	106 - 119	CMENSAEPEQSLAC
1587,71	1587,80	34,72	41 - 54	VYVEELKPTPEGDL
1592,15	1591,78	83,61	21 - 36	SLAMAASDISLLDAQS
1617,68	1617,78	31,77	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
1646,78	1646,82	35,08	123 - 136	VRTPEVDDEALEKF
1760,64	1760,81	21,88	118 - 133	ACQCLVRTPEVDDEAL
1775,80	1775,82	42,58	115 - 130	QSLA ^b CQCLVRTPEVDD
1818,63	1818,81	22,03	119 - 134	CQCLVRTPEVDDEALE

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 β Lg TT TG/ bromelina: β Lg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) e hidrolisada com bromelina (25U g⁻¹).

Tabela 35. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β-Lg Cys TG /bromelina.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
424,05	424,26	17,15	146 - 148	HIR
455,20	455,29	20,67	37 - 40	APLR
536,13	536,30	19,36	135 - 138	KFDK
640,22	640,27	17,64	96 - 100	DTDYK
665,30	665,34	20,48	134 - 138	EKFDK
672,28	672,38	26,41	09 - 14	GLDIQK
801,33	801,42	27,17	83 - 89	KIDALNE
803,27	803,32	22,33	125 - 131	TPEVDDE
855,37	855,43	26,58	47 - 54	KPTPEGDL
856,42	856,44	23,01	33 - 40	DAQSAPLR
874,32	874,36	23,53	125 - 132	TPEVDDEA
929,37	929,45	24,89	123 - 130	VRTPEVDD
959,38	959,42	22,76	124 - 131	RTPEVDDE
968,47	968,52	29,29	46 - 54	LKPTPEGDL
989,32	989,56	24,97	02 - 10	IVTQTMKGL
989,32	989,50	24,97	63 - 71	NG ^b ECAQKKI
989,32	989,48	24,97	118 - 126	A ^c CQCLVRTP
1030,33	1030,46	23,72	124 - 132	RTPEVDDEA
1030,50	1030,65	43,17	75 - 83	KTKIPAVFK
1030,50	1030,46	43,17	124 - 132	RTPEVDDEA
1030,53	1030,51	43,83	121 - 129	CLVRTPEVD
1043,47	1043,56	25,08	83 - 91	KIDALNENK
1058,43	1058,49	25,22	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,51	1097,56	27,85	46 - 55	LKPTPEGDL
1097,54	1097,56	30,16	45 - 54	ELKPTPEGDL
1129,46	1129,53	25,99	123 - 132	VRTPEVDDEA
1161,36	1161,60	15,91	36 - 45	SAPLRVYVEE
1179,49	1179,59	34,98	11 - 20	DIQKVAGTWY
1226,54	1226,60	30,47	44 - 54	EELKPTPEGDL
1226,54	1226,69	30,47	84 - 94	IDALNENKVLV
1226,55	1226,60	28,70	45 - 55	ELKPTPEGDL
1255,65	1255,71	32,53	83 - 93	KIDALNENKVL
1325,61	1325,67	31,73	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1338,57	1338,86	41,85	69 - 80	KKIIAEKTKIPA
1344,56	1344,58	39,40	151 - 161	FNPTQLEEQCH
1349,64	1349,70	39,80	09 - 20	GLDIQKVAGTWY
1355,56	1355,65	28,96	44 - 55	EELKPTPEGDL
1360,56	1360,74	41,83	06 - 18	TMKGLDIQKVAGT
1375,64	1375,65	45,09	42 - 53	YVEELKPTPEGD
1454,63	1454,71	30,05	43 - 55	VEELKPTPEGDL
1476,55	1476,78	29,99	130 - 142	DEALEKFDKALKA
1477,67	1477,79	38,53	08 - 20	KGLDIQKVAGTWY
1488,64	1488,74	33,12	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1510,63	1510,57	33,06	106 - 119	CMENSAEPEQSLAC
1530,64	1530,84	35,93	03 - 16	VTQTMKGLDIQKVA
1587,71	1587,80	34,64	41 - 54	VYVEELKPTPEGDL
1617,65	1617,78	31,69	42 - 55	YVEELKPTPEGDL
1657,73	1657,64	46,62	105 - 119	FCMENSAEPEQSLA ^{b,c}
1916,78	1916,97	44,58	126 - 142	PEVDDEALEKFDKALKA

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A;
 As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos;
 βLg Cys TG/ bromelina: βLg polimerizada com TG (10 U g⁻¹) na presença de Cys (0,1 mol L⁻¹) e hidrolisada com bromelina (25U g⁻¹).

Tabela 36. LC-ESI-MSⁿ - Peptídeos gerados a partir da digestão trípica da β -Lg bromelina/10TG.

Massa experimental [M+H] ⁿ	Massa teórica [M+H] ⁿ	Tempo de retenção (min)	Posição	Sequência peptídica
272,84	273,18	10,23	40 - 41	RV
424,07	424,26	17,44	146 - 148	HIR
461,10	461,23	43,41	120 - 123	QCLV
536,18	536,30	19,68	135 - 138	KFDK
537,23	537,34	29,79	146 - 149	HIRL
542,22	542,32	21,55	36 - 40	SAPLR
545,23	545,32	37,07	78 - 82	IPAVF
640,20	640,27	17,96	96 - 100	DTDYK
665,31	665,34	20,84	134 - 138	EKFDK
718,30	718,37	33,87	151 - 156	FNPTQL
801,38	801,50	27,29	70 - 76	KIAEKT
801,38	801,42	27,29	83 - 89	KIDALNE
803,28	803,32	22,54	125 - 131	TPEVDDE
826,31	826,50	56,69	99 - 104	YKKYLL
855,33	855,43	26,87	47 - 54	KPTPEGDL
929,40	929,45	25,00	123 - 130	VRTPEVDD
959,39	959,42	22,91	124 - 131	RTPEVDDE
968,47	968,52	29,36	46 - 54	LKPTPEGDL
1058,44	1058,49	25,43	123 - 131	VRTPEVDDE
1097,49	1097,56	26,28	43 - 52	VEELKPTPEG
1097,50	1097,56	30,23	47 - 56	KPTPEGDLEI
1097,52	1097,56	27,95	46 - 55	LKPTPEGDLE
1129,46	1129,53	26,21	123 - 132	VRTPEVDDEA
1179,53	1179,59	35,29	11 - 20	DIQKVAGTWY
1226,56	1226,60	28,78	45 - 55	ELKPTPEGDLE
1226,57	1226,60	30,54	44 - 54	EELKPTPEGDL
1242,58	1242,61	31,48	123 - 133	VRTPEVDDEAL
1260,56	1260,62	28,44	42 - 52	YVEELKPTPEG
1325,61	1325,67	31,71	43 - 54	VEELKPTPEGDL
1344,56	1344,74	39,53	31 - 42	LLDAQSAPLRVY
1355,58	1355,65	29,05	44 - 55	EELKPTPEGDLE
1360,61	1360,74	42,05	06 - 18	TMKGLDIQKVAGT
1428,55	1428,83	38,69	76 - 88	TKIPAVFKIDALN
1454,63	1454,71	30,21	43 - 55	VEELKPTPEGDLE
1488,66	1488,74	33,09	42 - 54	YVEELKPTPEGDL
1545,13	1544,69	85,77	150 - 162	SFNPTQLEEQCHI
1545,60	1545,86	34,89	64 - 77	G ^a ECAQKKIAEKTk
1576,41	1576,69	21,44	118 - 131	A ^a CQCLVRTPEVDDE
1587,70	1587,87	34,70	03 - 17	VTQTMKGLDIQKVAG
1617,68	1617,78	31,83	42 - 55	YVEELKPTPEGDLE
1646,72	1646,82	35,12	123 - 136	VRTPEVDDEALEKF
1657,75	1657,64	46,67	105 - 119	FCMENSAEPEQSLA ^b c
1669,64	1669,94	39,78	79 - 93	PAVFKIDALNENKVL
1680,79	1680,88	39,85	43 - 57	VEELKPTPEGDLEIL
1716,72	1716,85	33,43	41 - 55	VYVEELKPTPEGDLE
1738,64	1738,99	31,29	136 - 150	FDKALKALPMHIRLS
1783,55	1783,90	33,12	49 - 63	TPEGDLEILLQKWEN
1916,79	1917,02	44,64	26 - 43	ASDISLLDAQSAPLRVYV
1922,05	1922,03	42,39	43 - 59	VEELKPTPEGDLEILLQ
1946,71	1946,91	25,76	119 - 135	CQCLVRTPEVDDEALEK

n - Valores de massa monoisotópica calculada a partir da sequência de aminoácidos; b - variante B; a - variante A; As seqüências destacadas em cinza correspondem aos epítomos; β Lg bromelina/ 10TG: β Lg hirolisada com bromelina (25 U g⁻¹) e polimerizada com TG (10U g⁻¹).

Na literatura não foram encontrados estudos relacionados à identificação de epítomos após digestão gastrointestinal *in vitro* da β -Lg polimerizada com TG ou β -Lg polimerizada pré ou pós hidrólise. Nesse contexto, os dados até então reportados se referem aos peptídeos oriundos da β -Lg tratada por alta pressão ou glicação. Zeece et al. (2008) observaram que embora o tratamento com alta pressão (≥ 400 MPa) tenha aumentado a digestibilidade da β -Lg pela pepsina, liberando predominantemente peptídeos pequenos (7 a 10 resíduos de aminoácidos) e de menor potencial antigênico, foram identificados alguns peptídeos (Leu₃₂-Leu₅₄, Phe₈₂-Leu₁₀₄ e Leu₁-Leu₁₀) que contêm epítomos que se ligam à IgE. Chicón et al. (2008b) verificaram que após tratamento com pressão ≥ 200 MPa e digestão com pepsina, a β -Lg apresentou menor baixo potencial antigênico, o que foi atribuído principalmente à remoção da proteína intacta, no entanto ainda foram detectados epítomos estáveis à digestão, Leu₉₅-Leu₁₀₄, Asp₉₆-Phe₁₀₅, Ile₂₉-Val₄₁ e Tyr₄₂-Leu₅₄.

As proteínas do soro de leite bovino tratadas com alta pressão (400 MPa) e submetidas à digestão com pepsina não apresentaram diferenças quanto à resposta antigênica comparadas aos digeridos não tratados (CHICÓN et al., 2008a). Em ambos os casos houve liberação de epítomos da β -Lg considerados altamente reativos, Leu₁-Lys₈, Val₉₂-Tyr₁₀₀, Leu₁₄₉-Ile₁₆₂, Arg₄₁-Lys₆₀, Leu₁₀₂-Arg₁₂₄, Ala₂₅-Arg₄₀ (Sélo et al., 1999; Jarvinen et al., 2001), sendo que os três últimos fragmentos também foram também estáveis à hidrólise com pepsina em associação com a Corolase PP (CHICÓN et al., 2008a).

No estudo conduzido por Corso-Martinez et al. (2008), foi verificado que após processo de glicação e digestão gastrointestinal *in vitro* da β -Lg, alguns epítomos ou peptídeos que continham epítomos foram identificados, Leu₁-Lys₈, Ser₂₁-Arg₄₀, Arg₄₀-Gln₅₉, Arg₄₀-Lys₆₀ e Gln₆₈-Ile₇₈, os quais foram resistentes à hidrólise com pepsina e tripsina.

As Tabelas 37 e 38 mostram um panorama dos epítomos identificados após digestão *in vitro* das amostras avaliadas no presente estudo. Os digeridos gástricos e gastrointestinais da β -Lg nativa apresentaram maior número de

epítomos do que as amostras hidrolisadas e polimerizadas com TG pré ou pós hidrólise. Todos os cinco epítomos identificados no digerido gástrico da amostra β -Lg Cys TG foram também encontrados no digerido da amostra β -Lg TT TG. Após digestão gastrointestinal destes polimerizados, foram identificados, em comum, os epítomos Leu₁-Lys₈ e Tyr₄₂-Leu₅₄. Os digeridos gástricos da β -Lg hidrolisada com alcalase ou os polimerizados pré ou pós hidrólise com esta enzima apresentaram em comum o epítomo Ile₂₉-Val₄₁, com exceção para o tratamento β -Lg Cys TG/alcalase. Após digestão gastrointestinal, o epítomo Tyr₄₂-Leu₅₄ foi o predominante no conjunto de amostras estudadas, com exceção daquelas tratadas com Alcalase, para as quais não foram identificados epítomos após a digestão completa. Os resultados apontam que dentre os epítomos identificados, os fragmentos Ile₂₉-Val₄₁ e Tyr₄₂-Leu₅₄ parecem apresentar maior estabilidade à digestão gástrica e gastrointestinal, respectivamente.

Tabela 37. Peptídeos correspondentes aos epítomos identificados após digestão péptica das amostras.

Epítomos	β-Lg	β-Lg TT TG	β-Lg Cys TG	β-Lg/Alcalase	β-Lg Alcalase/ 10TG	β-Lg TT TG/Alcalase	β-Lg Cys TG/Alcalase	β-Lg/bromelina	β-Lg bromelina/ 10TG	β-Lg Cys TG/bromelina	β-Lg TT TG/bromelina
Leu ₁ -Lys ₈	x							x	x		x
Leu ₁ -Ala ₁₆	x	x									x
Leu ₃₁ -Pro ₄₈											
Ala ₂₅ -Arg ₄₀											
Ile ₂₉ -Val ₄₁	x	x	x	x	x	x				x	
Tyr ₄₂ -Leu ₅₄	x	x	x					x	x		
Val ₄₁ -Lys ₆₀	x										
Lys ₄₇ -Lys ₆₀	x										
Ala ₆₇ -Ile ₇₈	x									x	
Lys ₇₅ -Ala ₈₆											
Leu ₉₅ -Pro ₁₁₃											
Leu ₉₅ -Leu ₁₀₄	x	x	x								x
Asp ₉₈ -Phe ₁₀₅	x	x	x								
Thr ₉₇ -Glu ₁₀₈											
Tyr ₁₀₂ -Arg ₁₂₄											
Arg ₁₂₄ -Ala ₁₃₄		x	x				x				
Glu ₁₂₇ -Pro ₁₄₄	x	x									
Lys ₁₄₁ -Asn ₁₅₂											
Leu ₁₄₉ -Ile ₁₆₂											

Tabela 38. Peptídeos correspondentes aos epítomos identificados após digestão triptica das amostras.

Epítomos	β-Lg	β-Lg TT TG	β-Lg Cys TG	β-Lg/Alcalase	β-Lg Alcalase/ 10TG	β-Lg TT TG/Alcalase	β-Lg Cys TG/Alcalase	β-Lg/bromelina	β-Lg bromelina/ 10TG	β-Lg Cys TG/bromelina	β-Lg TT TG/bromelina
Leu ₁ -Lys ₈	x	x	x								
Leu ₁ -Ala ₁₆											
Leu ₃₁ -Pro ₄₈											
Ala ₂₅ -Arg ₄₀											
Ile ₂₉ -Val ₄₁									x		
Tyr ₄₂ -Leu ₅₄	x	x	x					x	x	x	x
Val ₄₁ -Lys ₆₀	x										
Lys ₄₇ -Lys ₆₀											
Ala ₆₇ -Ile ₇₈	x										
Lys ₇₅ -Ala ₈₆											
Leu ₉₅ -Pro ₁₁₃											
Leu ₉₅ -Leu ₁₀₄											
Asp ₉₈ -Phe ₁₀₅											
Thr ₉₇ -Glu ₁₀₈											
Tyr ₁₀₂ -Arg ₁₂₄											
Arg ₁₂₄ -Ala ₁₃₄											
Glu ₁₂₇ -Pro ₁₄₄											
Lys ₁₄₁ -Asn ₁₅₂											
Leu ₁₄₉ -Ile ₁₆₂											

As proteínas do leite bovino são um dos principais alérgenos alimentares que causam reações imunológicas mediadas por IgE, isto devido à alta resistência ao processo de digestão pelas enzimas gastrointestinais (ASTWOOD et al., 1996) ou ainda aos os peptídeos provenientes da digestão que podem ter mais de 10 resíduos de aminoácidos, podendo desta forma reter fragmentos com capacidade de se ligar à IgE e estimular as células T de resposta (SEN et al., 2002; LEHMANN et al., 2006). Vários processos tecnológicos têm sido utilizados na tentativa de reduzir ao máximo a alergenicidade das proteínas do leite (EL-AGAMY, 2007). Dentre eles, o processo enzimático é um dos métodos mais estudados e aplicados para este fim, principalmente na elaboração de fórmulas infantis hipoalergênicas (EL-AGAMY, 2007; FRITSCHÉ, 2009; VAN ESCH et al., 2011). A hidrólise extensa das proteínas, até que maioria dos peptídeos formados atinja MM entre 2 e 5 kDa, é citado como o tratamento mais eficaz na redução da alergenicidade das proteínas do soro de leite (KANANEN et al. 2000; EL-AGAMY, 2007). Entretanto, os produtos provenientes da hidrólise podem apresentar algumas características indesejáveis, como por exemplo, a presença de proteína antigênica residual na sua forma intacta, resistente à hidrólise (DIBBERN et al., 2003; NATALE et al., 2004; NOWAK-WEGRZYN et al., 2009) ou liberação de determinantes antigênicos após clivagem da proteína (EL-AGAMY, 2007; VAN ESCH et al., 2011). Além disso, a formação de peptídeos menores que 6 kDa e liberação de alguns aminoácidos como a Leu, Ala, Phe e Tyr após a hidrólise, pode conferir sabor indesejável ao alimento, relativo ao amargor (ALTING et al., 1998; EL-AGAMY, 2007).

Os resultados aqui apresentados mostraram que a hidrólise com alcalase, neutrase ou bromelina clivou de forma distinta a β -Lg. A alcalase promoveu a formação de peptídeos de menor MM e caráter mais hidrofílico que os obtidos com neutrase ou bromelina. Embora a hidrólise com bromelina tenha resultado em produtos de MM maior e menos hidrofílicos, foi capaz de reduzir a antigenicidade da proteína, assim como a alcalase, corroborando os resultados de outros estudos que indicam que outros fatores estão envolvidos na resposta antigênica da proteína como estrutura molecular e sequência aminoacídica que compõe o

peptídeo liberado na hidrólise (JARVINEN et al., 2001; ADEL-PATIENT et al., 2003; CHICÓN et al., 2008).

O tratamento com TG também tem sido relatado como meio de modificar as propriedades antigênicas de proteínas alimentares (BABIKER et al., 1998; CLARE et al., 2007; WRÓBLEWSKA et al., 2008; VILLAS-BOAS et al., 2010; O'SULLIVAN & FITZGERALD, 2012). A β -Lg apresenta estrutura globular e estável, que dificulta o acesso aos resíduos de Gln, doadores de acila para a reação de *cross-link* catalisada pela TG (PARTSCHEFELD et al., 2007). Estes sítios podem ser disponibilizados com tratamento prévio da proteína como a desnaturação térmica (MOTOKI & SEGURO, 2006; EISSA et al., 2006; BÁEZ et al., 2011), agentes redutores DTT ou Cys (FAERGEMAND et al., 1997; EISSA et al., 2006; VILLAS-BOAS et al., 2010; VILLAS-BOAS et al., 2012), ou hidrólise com diferentes proteases (WRÓBLEWSKA et al., 2008).

O tratamento térmico e principalmente, a utilização do agente redutor Cys facilitaram a ação da TG na β -Lg, com formação de polímeros de MM alta (Figuras 12 e 14) e formação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys decorrente do *cross-link* (Tabela 12). O tratamento térmico causa a desnaturação da β -Lg e formação de agregados via intercâmbio tiol-dissulfeto e/ou interações não covalentes (MUDGAL et al., 2011), que podem dificultar o acesso a alguns dos resíduos de Lys e Gln na molécula, limitando a taxa de *cross-link* na proteína. A polimerização com TG na presença de Cys promoveu quase o dobro da formação da ligação isopeptídica ϵ -(γ -Gln)Lys comparado ao tratamento com TG pós tratamento térmico. Em cada subunidade de β -Lg há nove resíduos Gln, porém nem todos estão expostos para ação da TG (COUSSON et al., 1992). Segundo Hemung et al. (2009), aqueles identificados como sendo potenciais doadoras de acila para ação da TG, estão localizados nas posição Gln₁₃, Gln₆₈, Gln₁₁₅, Gln₁₂₀, Gln₁₅₅ ou Gln₁₅₉. O resíduo Gln₆₈, por exemplo, está localizado em uma das cordas- β e os resíduos Gln₁₃ e Gln₁₅₅ encontram-se na α -hélice. O resíduo Gln₁₂₀ está numa região de difícil acesso à TG, devido à proximidade da ligação dissulfeto entre os resíduos Cys₁₀₆ - Cys₁₁₉ (HEMUNG et al., 2009). No entanto, os agentes redutores como o DTT ou Cys, ao romper a ligação Cys₁₀₆ - Cys₁₁₉, facilitam o acesso da TG

ao resíduo Gln₁₂₀ (HEMUNG et al., 2009). Em trabalho recente, Villas-Boas et al. (2012) propuseram que a utilização da Cys poderia resultar na formação da cistina, que ao evitar o intercâmbio tiol-dissulfeto e reagregação via pontes dissulfeto, aumentaria a exposição dos resíduos de Lys e Gln e, conseqüentemente, a formação do *cross-link* na proteína.

Em comparação aos tratamentos de polimerização pós tratamento térmico da β -Lg ou na presença de Cys, o processo de hidrólise com a alcalase, neutrase ou bromelina previamente ao tratamento com TG, pouco alterou a MM da proteína, no entanto, houve formação da ligação isopeptídica ϵ -(γ -Gln)Lys, detectada em concentração mais elevada no material polimerizado pós hidrólise com alcalase, confirmando que a formação do *cross-link* não implica no aumento da MM, embora possa alterar a estrutura da molécula (FLANAGAN & FITZGERALD 2002). O tratamento isolado de hidrólise com alcalase ou bromelina ou a polimerização pós hidrólise com estas enzimas reduziram significativamente a antigenicidade da β -Lg, sendo que para a amostra hidrolisada com alcalase a resposta de IgE anti- β -Lg foi praticamente anulada.

No tratamento de polimerização pré hidrólise, a alcalase promoveu a proteólise praticamente completa dos polímeros de MM alta, resultando em peptídeos de MM entre 2,6 a 9,2 kDa. Os resultados podem ser explicados pela ampla especificidade da alcalase, que cliva o lado carboxila de aminoácidos hidrofóbicos Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val e Met (MARKLAND E SMITH, 1971; ADLER-NISSEN, 1986) que, para β -Lg, pode resultar em mais de 40 possibilidades de clivagem e gerar peptídeos predominantemente hidrofílicos, de MM baixa e, conseqüentemente, de baixo potencial antigênico. A hidrólise dos polímeros com bromelina ou neutrase foi parcial, pois foram detectados produtos de MM alta, possivelmente resistentes à ação destas proteases. No entanto, a resposta antigênica destes produtos foi menor que a das amostras que sofreram apenas polimerização.

Além das diferenças quanto às características dos produtos formados, o tratamento de polimerização da β -Lg pré ou pós hidrólise também alterou a

susceptibilidade da proteína à digestão gastrointestinal. No estado nativo, os sítios de clivagem para a pepsina, correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos, formam um núcleo de difícil acesso no interior da estrutura da β -Lg, tornando-a altamente resistente à digestão (DALGALARRONDO et al., 1995; GUO et al., 1995; FU et al., 2002). No entanto, os processos de hidrólise, ao quebrar ligações específicas na proteína, e de polimerização, ao induzir rearranjo estrutural na molécula, aumentaram a exposição dos sítios de clivagem da proteína para a ação das enzimas digestivas, principalmente para a pepsina.

Dependendo do tratamento, diferentes peptídeos e epítomos foram liberados após digestão *in vitro* das amostras. Conforme apresentado nas Tabelas 37 e 38 (página 134), a β -Lg apresentou 14 possíveis fragmentos de ligação com IgE que foram estáveis à digestão, nove destes presentes no digerido gástrico e quatro no digerido gastrointestinal. As amostras β -Lg TT TG e β -Lg Cys TG e aquelas polimerizadas pré ou pós hidrólise com bromelina também apresentaram, embora em menor número, fragmentos correspondentes aos epítomos estáveis à digestão gástrica e gastrointestinal. O tratamento com alcalase, isolado ou associado à TG, resultou em um produto que após digestão gastrointestinal não mais apresentou epítomos. Os determinantes antigênicos estáveis à digestão podem atravessar a barreira e a mucosa intestinal e, conseqüentemente, sensibilizar o sistema imunológico e desencadear a resposta alérgica (MORENO, 2007; PICARIELLO et al., 2010). Assim, a alteração ou eliminação destes fragmentos é um dos objetivos chave na redução do potencial alergênico das proteínas alimentares.

A associação da hidrólise enzimática e a polimerização com a TG pode também modificar algumas importantes propriedades tecnológicas e funcionais de proteínas alimentares. Na polimerização póshidrólise foi reportado que hidrolisados da soja tratados com TG apresentaram géis mais resistentes, termicamente estáveis e com maior capacidade emulsificante (BABIKER, 2000). Estas propriedades também foram melhoradas em hidrolisados de caseinato de sódio (FLANAGAN & FITZGERALD, 2002; O'SULLIVAN & FITZGERALD, 2012) e

hidrolisados do glúten (AGYARE et al., 2008) tratados com a TG. Para a polimerização pós hidrólise, foi verificado aumento significativo na solubilidade de polímeros de caseinato de sódio hidrolisados com Protamex (FLANAGAN & FITZGERALD, 2002). Portanto, além de hipoalêrgico, há indicativos de que o produto resultante da associação dos processos de hidrólise e polimerização poderá apresentar importantes propriedades tecnofuncionais.

7. CONCLUSÕES

Com a metodologia de superfície de resposta foi definida que a condição 3% de substrato e 25 U enzima g⁻¹ foi aquela com qual se obteve maior GH da β -Lg com as três enzimas, sendo que com a alcalase obteve-se GH pelo menos duas vezes superior ao obtido com a neutrase ou a bromelina.

Após a polimerização dos hidrolisados, a análise por espectrometria de massas mostrou que houve aumento da MM nestas amostras. A formação do dipeptídeo ϵ -(γ -Gln)Lys, característico da reação de *cross-link*, foi detectada em todas as amostras polimerizadas pós hidrólise, porém em maior concentração na amostra tratada com a alcalase, indicando que o pré tratamento com esta enzima disponibilizou maior número de sítios específicos, favorecendo a ação da TG.

A polimerização da β -Lg após tratamento térmico ou na presença de Cys levou à formação de produtos de MM alta (> 100 kDa). Os polímeros, assim como observado para a β -Lg, foram mais eficientemente hidrolisados com a alcalase, do que com a bromelina ou a neutrase.

Tanto o processo de hidrólise como o tratamento com a TG pré ou pós hidrólise foram capazes de reduzir o potencial antigênico da β -Lg. Dentre os tratamentos estudados, o mais eficaz foi a hidrólise com alcalase que praticamente anulou a antigenicidade da proteína.

Após simulação da digestão gastrointestinal, não foram identificados peptídeos correspondentes aos epítomos no hidrolisado com alcalase ou nos polimerizados pré ou pós hidrólise com esta enzima. Com a bromelina foram identificados alguns epítomos, embora em menor número do que o observado para a proteína não tratada.

Embora o tratamento de hidrólise, por si só, tenha sido capaz de reduzir significativamente a antigenicidade da β -Lg, o processo associado de hidrólise e polimerização não deve ser descartado, pois tem o potencial de modificar as propriedades tecnológicas e funcionais de proteínas alimentares, de forma diferenciada daquela que seria resultante dos tratamentos em separado. Portanto, para a aplicação em sistemas alimentares, além do aspecto antigênico, sugere-se

como objetivo de futuros estudos a avaliação das propriedades tecnofuncionais dos materiais modificados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S.L.; BARNETT, D.; WALSH, B.J.; PEARCE, R.J.; HILL, D.J.; HOWDEN, M.E. Human IgE-binding synthetic peptides of bovine beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin. In vitro cross-reactivity of the allergens. **Immunology and Cell Biology**, v. 69, 91-107, 1991.
- ADEL-PATIENT, K.; CRÉMINON, C.; BERNAND, H.; CLEMENT, G.; NEGRONI, L. L. FROBERT, Y.; GRASSI, J.; WAL, J. M.; CHATEL, J. M. Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine β -lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allerg-specific IgE, IgG1 and IgG2a in β -lactoglobulin - sensitized mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 235, n.1, p. 21-32, 2000.
- ADEL-PATIENT, K.; NAHORI, M. A.; PROUST, B.; LAPA E SILVA, J. R.; CRÉMINON, C.; WAL, J. M.; VARGAFTIG, B. B. Elicitation of the allergic reaction in β -lactoglobulin – sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. **Clinical Experimental Allergy**, v. 33, n.3, p. 376-385, 2003.
- ADLER-NISSEN, J. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. **ACS Symposium Series**, v. 92, p. 125-146, 1979.
- ADLER-NISSEN, J; OLSEN, H.S. **Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M.; Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.
- AGYARE, K.K.; XIONG, Y.L.; ADDO, K. Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1131-1137, 2008.
- ALTING, A.C.; MEIJER, R.J.; VAN BERESTEIJN, E.C. Selective hydrolysis of milk proteins to facilitate the elimination of the ABBOS epitopes of bovine serum albumin and other immunoreactive epitopes. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 8, p. 1007–1012, 1998.
- AOAC Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**, 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.
- ASTWOOD, J. D.; LEACH, J. N.; FUCHS, F. L. Stability of food allergens to digestion in vitro. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1269-1273, 1996.
- BABIKER, E.E.; FUJISAWA, N.; MATSUDOMI, N.; KATO, A. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3746-3750, 1996.
- BABIKER, E. F.; HIROYUKI, A.; MATSUDOMI, N.; IWATA, H.; OGAWA, T.; BANDO, N.; KATO, A. Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of

- soy protein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 866-871, 1998a.
- BABIKER, E. F.; MATSUDOMI, N.; KATO, A. Masking of antigen structure of soybean protein by conjugation with polysaccharide and cross-linkage with microbial transglutaminase (short communication). **Nahrung**, v. 42, p. 158-159, 1998b.
- BABIKER, E.E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. **Food Chemistry**, v. 70, p. 139-145, 2000.
- BÁEZ, G.D.; MORO, A.; BALLERINI, G.; BUSTI, P.A.; DELORENZI, N.J. Comparison between structural changes of heat-treated and transglutaminase cross-linked beta-lactoglobulin and their effects on foaming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1758-1765, 2011.
- BALL, G.; SHELTON, M. J.; WALSH, B. J.; HILL, D. J.; HOSKING, C. S.; HOWDEN, M. E. H. A major continuous allergenic epitope of bovine β -lactoglobulin recognized by human IgE binding. **Allergy**, v. 24, p. 758-764, 1994.
- BANNON, G.A. What makes a food protein an allergen? **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 4, p. 43-46, 2004.
- BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J. M.; CLEMENT, G.; ADEL-PATIENT, K.; PELTRE, G.; CRÉMINON, C.; WAL, J. M. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human β -casein and bovine β -casein, a major allergen of milk. **Molecular Immunology**, v. 37, n.3, p. 161-167, 2000.
- BESLER, M. Determination of allergens in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 662-671, 2001.
- BIN MD YASIR, S.; SUTTON, K.H.; NEWBERRY, M.P.; ANDREWS, N.R.; GERRARD, J.A. The impact of trnasglutaminase on soy protein and tofu texture. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1491-1501, 2007.
- BOIRIE, Y; DANGIN, M; GACHON, P; VASSON, MP; MAUBOIS, JL; BAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v. 94, p.14930 -14935, 1997.
- BOZA, J.J.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; GIP, A. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43,p. 872-875, 1995.
- BROWNLOW, S.; CABRAL, J.H.; COOPER, R.; FLOWE, D.; YEWDALL, S.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A.; SAEYER, L. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still en enigmatic lipocalin. **Structure**, v.5, n.4, p. 481-495, 1997.
- BURKS, W.; BALLMER-WEBER, B.K. Food Allergy : Review. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 50, p. 595-603, 2006.

- CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULF, N.A.; PALMA, M.S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**. 1994.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; Recio, I.; LÓPEZ-FANDINÓ, R. Influence of high hydrostatic pressure on the proteolysis pattern of β -lactoglobulin A treated with trypsin. **Journal of Dairy Research**. 73:121–128, 2006.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDINÓ, R. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 367-376, 2008a.
- CHICÓN, R.; LÓPEZ-FANDINÓ, R.; ALONSO, E.; BELLOQUE, J. Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of beta-lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 928-938, 2008b.
- CHUNG, S. Y.; CHAMPAGNE, E. T. Association of end-product adducts with increased IgE-binding of roasted peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3911–3916, 2006.
- CIANFERONI, A.; SPERGEL, J.M. Food allergy: review, classification and diagnosis. **Allergology International**, v. 58, n. 4, p. 457-466, 2009.
- CLARE, D. A., GHARST, G., & SANDERS, T. H. Transglutaminase polymerization of peanut proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.2, p. 432-438, 2007.
- CLARE, D.A.; DAUBERT, C. Expanded Functionality of Modified Whey Protein Dispersions after Transglutaminase Catalysis. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C576-584, 2011.
- CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; PEDROCHE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 67, p. 269-274, 1999.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 254 - 262, 2000.
- CLEMENT, G.; BOQUET, D.; FROBERT, Y.; BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J.M.; ADEL-PATIENT, K.; CREMINON, C.; WAL, J.M.; GRASSI, J. Epitopic characterization of native β -Lactoglobulin. **Journal of Immunological Methods**, v.266, p. 67-78, 2002.
- CORZO-MARTÍNEZ, M.; LEBRÓN-AGUILAR, R.; VILLAMIEL, M.; QUINTANILLA-LÓPEZ, J. E., MORENO, F. J. Application of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the characterization of galactosylated and tagatosylated β -lactoglobulin peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.7205-7212, 2009.

- COUSSONS, P. J.; PRICE, N. C.; KELLY, S. M.; SMITH, B.; SAWYER, L. Transglutaminase catalyses the modification of glutamine side chains in the C-terminal region of bovine beta-lactoglobulin. **Biochemistry Journal**, v. 283, p. 803–806, 1992.
- COVEY, T.R.; BONNER, R.F.; SHUSHAN, B.I. The Determination of Protein, Oligonucleotide and Peptide Molecular Weights by Ion-spray Mass Spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 2, n. 11, p. 249-255, 1988
- DAUBERT, C.R.; HUDSON, H.M.; FOEDING, E.A.; PRABHASANKAR, P. Rheological characterization and electrokinetic phenomena of charged whey protein dispersions of defined sizes. **Lebensmittel - Wissenschaft und – Technologie**, v. 39, p. 206-215, 2006.
- DALGALARRONDO, M.; DUFOUR, E.; CHOBERT, J.M.; BERTRAND-HARB, C.; HAERTLÉ, T. Proteolysis of β -casein by pepsin in ethanolic media. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 1–14, 1995.
- DIBBERN J.R.; D.A., PALMER, G.W.; WILLIAMS, P.B.; BOCK, S.A.; DRESKIN, S. RBL cells expressing human Fc epsilon RI are a sensitive tool for exploring functional IgE-allergen interactions: studies with sera from peanut-sensitive patients. **Journal of Immunology Methods**, v. 274, p. 37–45, 2003.
- DICKINSON, E. Enzymatic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 334-339, 1997.
- DUMAY, E.M.; KALICHEVSKY, M.T.; CHEFTEL, J.C. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and the baroprotective effects of sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1861-1868, 1994.
- DURBIN, K. R. TRAN, J. C. ZAMDBORG, L.; STEVE M. M. S.; CATHERMAN, A.D.; LEE, J.E.; LI, M.; KELLIE, J. F.; KELLEHER, N.L. Intact mass detection, interpretation, and visualization to automate Top-Down proteomics on a large scale. **Proteomics**, v. 10, p. 3589–3597, 2010.
- EISSA, A. S.; PUHL, C.; KADLA, J. F.; KHAN, S. A. Enzymatic Cross-Linking of β -Lactoglobulin: Conformational Properties Using FTIR Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v.7, n.6, p.1707-1713, 2006.
- EL-AGAMY, E.I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 64–72, 2007.
- FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B.; Enzymatic cross-linking of whey protein by Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v.11, n. 1, p. 19-25, 1997.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.

- FERRIGE, A.G.; SEDDON, M.J.; GREEN, B.N.; JARVIS, S.A.; SKILLING, J. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 6, 707-711, 1992.
- FIOCCHI, A.; RESTANI, P.; RIVA, E.; MIRRI, G.P.; SANTINI, I.; BERNARDO, L.; GALLI, C.L. Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. **Allergy**, v. 53, p. 798-802, 1998.
- FLANAGAN, J.; FITZGERALD, R. J. Physicochemical and nitrogen solubility properties of bacillus proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post- hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5429-5436, 2002.
- FORT, N.; CARRETERO, C.; PARÉS, D.; TOLDRA, M.; SAGUER, E. Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: effects on the heat-induced gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n.3, p. 463-471, 2007.
- FREIMAN, L.O.; SRURSABAA, A.U.O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 170-173, 1999.
- FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; SANTOS, J.E.; OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1432 - 1438, 1993.
- FRITSCHÉ, R. Utility of animal models for evaluating hypoallergenicity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, p. 979 – 983, 2009.
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, v. 48, n.10, p. 86-88, 1994.
- FU, T. J.; ABBOTT, U. R.; HATZOS, C. Digestibility of food allergens and nonallergens proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7154-7160, 2002.
- GAUCHE C.; VIEIRA, J.T.C.; OGLIARI, P.J.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 788-794, 2008.
- GAUDRY, P. A.; FERNANDES, J.; REISH, R.; ROUX, K. H.; SATHE, S. K.; TEUBER, S. S.; REESE, G.; LEHRER, S. B.; Murine IgE and IgG antibody responses to allergenic and non-allergenic foods: potential model for allergenicity assessment of foods in man. **Journal of allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n.2, p. S234, 2004.
- GAUTHIER, S. F.; VACHON, C.; SAVOIE, L. Enzymatic conditions of an in vitro method to study protein digestion. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 3, p.960-964, 1986.

- GONZÁLES-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, MP; GUADIX, EM
Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, p.523-528, 1994.
- GRUBER, P.; VIETHS, S.; WANGORSCH, A.; NERKAMP, J.; HOFMANN, T.
Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4002–4007, 2004.
- GUO, M. R.; FOX, P. F.; FLYNN, A. Susceptibility of β -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. **Journal of Dairy Science**, v.78, p. 2336-2344, 1995.
- HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p. 251-258, 2003.
- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II Functional properties of peptides. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 6, p. 559-71,1992.
- HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para asaúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- HEINZMANN, A.; BLATTMANN, S.; SPUERGIN, P.; FORSTER, J.; DEICHMAN, K.A. The recognition pattern of sequential B cell epitopes of beta-lactoglobulin does not vary with the clinical manifestations of cow's milk allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 120, p. 280-286, 1999.
- HELM, R.M.; BURKS, A.W. Mechanism of food allergy. **Current Opinion in Immunology**. v.12, p.647-653, 2000.
- HEMUNG, B.O.; LI-CHAN, E.C.Y.; YONGSAWATDIGUL, J. Identification of glutaminyl sites on β -lactoglobulin for threadfin bream liver and microbial transglutaminase activity by MALDI-TOF mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 115, p. 149–154, 2009.
- HERNELL, O.; LÖNNERDAL, B. Nutritional evaluation of protein hydrolysate formulas inhealthy term infants: plasma amino acids, hematology, and trace elements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 296–301, 2003.
- HETTINGA, K.; VALENBERG, H.V.; DE VRIES, S.; BOEREN,S.; VAN HOOIJDONK, T.; VAN ARENDONK, J.; VERVOORT, J. **The Host Defense Proteome of Human and Bovine Milk**, PLoS ONE www.plosone.org, v.6, n.4, 2011.
- HYUN, C. K.; SHIN, H. K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v.36, n.1-2, p.65-71, 2000.

- HUDSON, L.; HAY, F.C. **Practical Immunology**, 3 ed. Blackwell Scientific Publications, 1989.
- HUR, S.J., OU LIM, B., DECKER, E.A., MCCLEMENTS, D.J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1-12, 2011.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*, 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- JAROS, D.; PARTSCHEFELD, C.; HENLE, T.; ROHM, H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, p. 113-155, 2006.
- JARVINEN, K.N., CHATCHATEE, P., BARDINA, L., BEYER, K., SAMPSON, H.A. IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 126, p. 11-118, 2001.
- JONG, G. A. H., & KOPPELMAN, S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *JFS: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, 67(8), 2798-2006, 2002.
- KANAJI, T.; OZAKI, H.; TAKAO, T.; KAWAJIRI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M.; SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. Strain S-8112. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11565-11572, 1993.
- KANANEN, A.; SAVOLAINEN, J.; MAKINEN, J.; PERTTILA, U.; MYLLYKOSKI, L.; PIHLANTO-LEPPALA, A. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal**, v. 10, p.691-697, 2000.
- KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 2299-2301, 1988
- KIM, S. B. et al. Peptic and tryptic hydrolysis of nature and heated whey proteins to reduce its antigenicity. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4043-4050, 2007.
- KINSELLA, J.E. & WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food Nutrition Research**, v.33, p.343-437,1989.
- KITABATAKE, N.; KINEKAWA, Y. I. Digestibility of bovine milk whey protein and β -lactoglobulin *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4917-4923, 1998.
- KLEBER, N.; KRAUSE, I.; ILLGNER, J.H. The antigenic response of β -Lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research Technology**. v.219, p. 105-110, 2004.
- KOPPELMAN, S. J.; HEFLE, S. L. **Detecting allergens in food**. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006.

- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolysed with various alkaline proteinases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 657-666, 2000.
- KURAIISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSU, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Review International**, v. 17, p. 221-246, 2001.
- KURISAKI, J.; NAKAMURA, S.; KAMINOGAWA, S. YAMAUCHI, K. The antigenic properties of β -lactoglobulin examined with mouse IgE antibody. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 46, p. 2069-2075, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 27, p. 680-685, 1970.
- LEHMANN, K.; SCHWEIMER, K.; REESE, G.; RANDOW, S.; SUHR, M.; BECKER, W.M.; VIETHS, S.; RÖSCH, P. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. **Biochemistry Journal**, v. 395, n.3, p. 463-472, 2006.
- LORAND, L. Transglutaminase: Remembering Heinrich Waelsch. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 7-12, 2002.
- LORENZEN, P.C.; SCHLIMME, E.; ROSS, N. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 42, n.3, p. 151-154, 1998.
- MACIERZANKA, A.; SANCHO, A.I.; MILLS, E.N.C.; RIGBY, N.M.; MACKIE, A.R. Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of b-casein and blactoglobulin. **Soft Matter**, v. 5, p. 538–550, 2009.
- MAGGIO L.; ZUPPA A.A.; SAWATZKI G.; Valsasina R.; Schubert W.; Tortorolo G. Higher urinary excretion of essential amino acids in preterm infants fed protein hydrolysates. **Acta Paediatrica**, v.94, p. 75–84, 2005.
- MANDALARI, G.; ADEL-PATIENT, K.; BARKHOLT, V.; BARO, C.; BENNETT, L.; BUBLIN, M.; GAIER, S.; GRASER, G.; LADICS, G.S.; MIERZEJEWSKA, D.; VASSILOPOULOU, E.; VISSERS, Y.M.; ZUIDMEER, L.; RIGBY, N.M.; SALT, L.J.; DEFERNEZ, M.; MULHOLLAND, F.; MACKIE, A.R.; WICKHAMAND, M.S.J.; MILLS, E.N.C. In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 55, 372-381, 2009.
- MARINELLO, L.; GIOSAFATTO, C.V.; DI PIERRO, P.; SORRENTINO, A.; PORTA, R. Synthesis and resistance to in vitro proteolysis of transglutaminase cross-linked phaseolin, the major storage protein from *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.12, p. 4717-4721, 2007.
- MARKLAND, F. S, SMITH, E. L. Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. In: BOYER, P. D. **The enzymes**. 3. ed. New York:Academic Press, Vol:III -Hydrolysis: peptide bonds, p.561-607, 1971.

- MARTIN, J.M.; TRINK B.; DANEMAN D.; DOSCH, H.M.; ROBINSON, B. Milk proteins in the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). **Annals of Medicine**, v.23, p.447-452, 1991.
- MARTINS, Z. J. **Abacaxi, cultura, material prima, processamento e aspectos econômicos. In: Processamento: produtos e subprodutos, características e utilização.** 2. ed., Coleção: Série Frutas Tropicais. Campinas, SP: ITAL, 1992.
- MARTOS.; G.; CONTRERAS, P.; MOLINA, E.; LOPEZ-FADIÑO, R. Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 5640–5648, 2010.
- MATSUDOMI, N.; SASAKI, T.; KATO, A.; KOBAYASHI, K. Polymerization of deaminated peptide fragments obtained with the mild acid hydrolysis of ovalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p. 738-742, 1985.
- MATSUMOTO, L. Mitigation of the allergenic activity of beta-lactoglobulin by electrolysis. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 22, p. 235–242, 2011.
- MIERZEJEWSKA, D.; KUBICKA, E. Effect of temperature on immunoreactive properties of the cow milk whey protein β -lactoglobulin. **Milchwissenschaft**, v.61, n.1, p.69-72, 2006.
- MIETSCH, F.; FEHÉR, J.; HALÁSZ, A. Investigation of functional properties of partially hydrolyzed proteins. **Nahrung**, v. 33, p. 9-15, 1989.
- MILLS, E.N.C.; MADSEN C.; SHEWRY, P.R.; WICHERS, H.J. Food allergens of plant origin – their molecular and evolutionary relationships. **Trends in Food Science Technology**, v. 14, p. 145–156, 2003.
- MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J. Induction of oral tolerance in mice by continuous feeding with β -lactoglobulin and milk. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n.6, p. 1287-1294, 2002.
- MONACI, L.; TREGOAT, V.; VAN HENGEL, A.J.; ANKLAM, E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, 2006.
- MONACO, H.L.; ZANOTTI, G.; SPADON, P.; BOLOGNESI, M.; SAEYER, L.; ELIOPOULOS, E.E. Cristal structure of the trigonal form of bovine β -lactoglobulin and its complex with retinol at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.197, n.4 , p.695-706, 1987.
- MONDOULET, L.; PATY, E.; DRUMARE, M. F.; AH-LEUNG, S.; SCHEINMANN, P.; WILLEMOT, R. M.; WAL, J. M.; BERNARD, H. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4547–4553, 2005.
- MORENO, F.J.; MACKIE, A.R.; MILLS, E.C.N. Phospholipid interactions protect the milk allergen α -lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9810–9816, 2005.

- MORENO, J. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.61, p.50-60, 2007.
- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 9, p. 204-210, 1998.
- MOUÉCOUCOU, J.; FRÉMONT, S.; VILLAUME, C.; SANCHEZ, C.; MÉJEAN, L. Polysaccharides reduce in vitro IgE/IgE-binding of β -lactoglobulin after hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1242-1249, 2007.
- MUDGAL, P.; DAUBERT, C.R.; CLARE, D.A.; FOEGEDING, E.A. Effect of Disulfide Interactions and Hydrolysis on the Thermal Aggregation of β -Lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1491–1497, 2011.
- MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: Lorand, L. *Methods in Enzymology*, v.XLV, p. 475-85, New York, Academic Press, 1976.
- NACER, A. S. et al. Interactions between β -lactoglobulin and pectins during in vitro gastric hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 355-360, 2004.
- NAKAMURA, A.; WATANABE, K.; OJIMA, T.; AHN, D. H.; SAEKI, H. Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop Tropomyosin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7559–7564, 2005.
- NATALE, M.; BISSON, C.; MONTI, G.; PELTRAN, A.; GAROFFO, L.P.; VALENTINI, C.F.; BERTINO, E.; CASCIA, A.; CANTI, A. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.48, p. 363-369, 2004.
- NIELSEN, G.S; PETERSEN, B.R.; MOLLER, A.J. Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat. **Meat Science**, v. 41, n. 3, p. 293-299, 1995.
- NOWAK-WĘGRZYN, A.; SAMPSON, H. Adverse reactions to foods. **Med Clin North Am**, v. 90, p. 97-127, 2006.
- NOWAK-WĘGRZYN, A.H.; BENCHARITIWONG, R.; SCHWARZ, J.; DAVID, G.; EGGLESTON, P.; GERGEN, P.J.; LIU, A.H.; PONGRACIC, J.A.; SARPONG, S.; SAMPSON, H.A. Mediator release assay for assessment of biological potency of German cockroach allergen extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n.4, p. 949-955, 2009.
- OHTSUKA, T.; SAWA, A.; KAWABATA, R.; NIO, N.; MOTOKI, M. Substrate Specificities of Microbial Transglutaminase for Primary Amines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6230–6233, 2000.
- O'SULLIVAN, D.; FITZGERALD, R.J. Physicochemical properties and residual antigenicity of transglutaminase-cross-linked sodium caseinate hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 23, p.18-23, 2012.

- OTANI, H.; UCHIO, T.; TOKITA, F. Antigenic reactivities of chemically modified β -lactoglobulins with antiserum to bovine β -lactoglobulin. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.49, p. 2531-2536, 1985.
- OTTE, J.; ZAKORA, M.; QVIST, K. B.; OLSEN, C.E.; BARKHOLT, V. Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 835–848, 1997.
- PACHECO, M.T.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p. 333-338, 2005.
- PAPIZ, M.Z.; SAEYER, L.; ELIOPOULOS, E.E.; NORTH, A.C.T.; FINDLAY, J.B.C.; SIVAPRASADARAO, R.; JONES, T.A.; NEWCOMER, M.E.; KRAULIS, P.J. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. **Nature**, v.324, n.6095, p.383-385, 1986.
- PARTSCHEFELD, C.; RICHTER, S.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T. Modification of β -lactoglobulin by microbial transglutaminase under high hydrostatic pressure: Localization of reactive glutamine residues. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 462–468, 2007.
- RSCB PDB: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank. Disponível em <http://www.pdb.org>.
- PEÑAS, E.; RESTANI, P.; BALLABIO, C.; PRÉSTAMO, G.; FIOCCHI, A.; GÓMEZ, R. Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 286-290, 2006.
- PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; FIERRO, O.; MAMONE, G.; CAIRA, S.; DI LUCCIA, A.; MONICA, S.; ADDEO, F. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implication. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n.3, p. 295-308, 2010.
- PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, p. 179-187, 2006.
- POMS, R. E.; KLEIN, C. L.; ANKLAN, E. Methods for allergen analysis in food: a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, n. 1, p. 1 – 31, 2004.
- QUIN, B. Y.; BEWLEY, M. C.; CREAMER, J. K.; BAKER, E. N.; JAMESON, G. B. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. **Protein Science**, v. 8, p. 75–83, 1999.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v, 62, n, 3, p. 597-635, 1998.

- REDDY, I. M.; KELLA, K. D.; KINSELLA, J. E. Structural and conformational basis of resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotrytic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, p. 737-741, 1988.
- RESTANI, P.; VELONA, T.; PLEBANI, A.; UGAZIO, A.G.; POIESI, C.; MURARO, A.; GALLI, C.L. Evaluation bt SDS-PAGE and Immunblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clinical and Experimental Allergy*, v.25, n.7, p.641-658, 1995.
- RESTANI, P.; BALLABIO, C.; CATTANEO, A.; ISOARDI, P.; TERRACCIANO, L. FIOCCHI, A. Characterization of bovine serum albumin epitopes and their role in allergic reactions Allergy. *Allergy Supplement*, v.59, n.78, p.21-24, 2004.
- RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: A statistical approach. *International Dairy Journal*, v.16, n.1, p. 26-32, 2006.
- ROOS, N.; LORENZEN, P. CHR.; SCHREZENMEIR, J.; SCHLIMME, E. Cross-linking by transglutaminase changes neither the in vitro proteolysis nor the in vivo digestibility of caseinate. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, v. 55, n. 4, p. 261-276, 2003.
- RUITIER, B.; ROZEMULLER, E.H.; VAN DICK, A.J.; GARSEN, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A.; TILANUS, MG.; KNOL, E.F.; VAN HOFFEN, E. Role of human leucocyte antigen DQ in the presentation of T cell epitopes in the major cow's milk allergen α 1-casein. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 143, p. 119-126, 2007.
- SABADIN, I.S. **Efeito da hidrólise pré e pós polimerização catalisada pela transglutaminase na antigenicidade da β -lactoglobulina**. 2010, 90p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; KAWAJIRI, H.; MOTOKI, M. ϵ -(γ -Glutamyl)Lysine cross-link distribution in food as determined by improved method. *Journal of Food Science*, v. 60, p. 416-419, 1995.
- SAKURAI, K.; GOTO, Y. Manipulating monomer–dimer equilibrium of bovine–lactoglobulin by amino acid substitution. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 25735–25750, 2002.
- SAMPSON, H.A. Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 113, p. 805-819, 2004.
- SCHAFER, C.; SCHOTT,M.; BRANDL, F.; NEIDHART,S.; RCARLE, R. identification and quantification of ϵ -(γ -glutamyl)lisil in digests of enzymatically cross-linked leguminous proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 2830-2837, 2005.

- SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-KDa to 100-KDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.
- SCHMIDT, D. G.; MEIJER, R. J.; SLANGEN, C. J.; VAN BERESTEIJN, E. C. Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 25, p. 1007–1017, 1995.
- SCHNELL, S.; HERMAN, R.A. Should digestion assays be used to estimate persistence of potential allergens in tests for safety of novel food proteins? **Clinical Molecular Allergy**, v.7, n.1, 2009.
- SEGURO, K.; KUMAZAWA, Y.; KURAISHI, C.; SAKAMOTO, H.; MOTOKI, M. The ϵ -(γ -glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 10, p. 2557-2562, 1996.
- SÉLO, L.; CLÉMENT, G.; BERNARD, H. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clinical and Experimental Allergy**, v.29, n.12, p.1696-1704, 1999.
- SEN, M.; KOPPER, R.; PONS, L.; ABRAHAM, E.C.; BURKS, A.W.; BANNON, G.A. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 882-887, 2002.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**, São Paulo: Livraria Varela, 1996.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, no.4, p. 397-409, 2004.
- SHARMA R.; ZAKORA M.; QVIST, K.B. Susceptibility of an industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v.12, n.12, p.1005-1012, 2002.
- SICHERER S.H. Food allergy. **Lancet**, v. 360:701-10, 2002.
- SIRIPORN, D.; KONGPOB, R.; KITTINAN, K.; WIWUT, T. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, p. 202–206, 2008.
- SMITHERS, G.W.; BALLARD, J.F.; COPELAND, A.D.; DE SILVA, K.J.; DIONYSIUS, D.A; FRANCIS, G.L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P.A.; MCINTOSH, G.H.; MITCHELL, I.R.; PEARCE, R.J.; REGESTER; G.O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1454-145, 1996.
- SPIEGEL, T.; HUSS, M. Whey protein aggregation under shear conditions: effects of pH-value and removal of calcium. International. **Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.5, p.559, 2002.

- STĂNCIUC, N.; PLANCKEN, I. V. D.; ROTARU, G.; HENDRICKX, M. 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.
- SVENNING, C.; BRYNHILDSVOLD, J.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. Antigenic response of whey proteins and genetic variants of β -lactoglobulin - The effect of proteolysis and processing. **International Dairy Journal**, v. 10, 699–711, 2000.
- TAHERI-KAFRANI, A.; GAUDIN, J. C.; RABESONA, H.; NIOI, C.; AGARWAL, D.; DROUET, M.; CHOBERT, J. M.; BORDBAR, A. K.; HAERTLE, T. Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4974-4982, 2009.
- TANG, C. H.; LI, L.; YANG, X. Q. Influence of transglutaminase-induced cross-linking on in vitro digestibility of soy protein isolate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 178-731, 2006.
- TANG, C-H.; MA, C-Y. Modulation of the thermal stability of β -lactoglobulin by transglutaminase treatment. **European Food Research Technology**, v.225, n.5-6, p. 649-652, 2007.
- TANG, C. H.; Transglutaminase-induced cross-linking of vicilin-rich kidney bean protein isolate: influence on the functional properties and in vitro digestibility. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 941-947, 2008.
- VAN BERESTEIJN, E. C. H.; PEETERS, R.A.; KAPER, J.; MEIJER, R.J.G.M.; ROBBEN, A.J.P.M.; SCHMIDT, D.G. Molecular Mass Distribution, Immunological Properties and Nutritive Value of Whey Protein Hydrolysates. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 7, p. 619- 625, 1994.
- VAN ESCH, B.C.A.M.; KNIPPINGA, K.; JEURINKA, P.; VAN DER HEIDEC, S.; DUBOISD, A.E.J.; WILLEMSENA, L.E.M.; GARSSENA, J.; KNIPPELSA, L.M.J. In vivo and in vitro evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. **Toxicology Letters**, v. 201, p. 264–269, 2011.
- VILLAS-BOAS, M. B.; VIEIRA K. P., TREVISAN, G.; ZOLLNER, R. L.; NETTO, F. M. The effect of Transglutaminase-Induced Polymerization in the Presence of Cysteine on β -Lactoglobulin Antigenicity. **International Dairy Journal**, v.20, p. 386–392, 2010.
- VILLAS-BOAS, M. B.; FERNANDES, M.A.; ZOLLNER, R. L.; NETTO, F. M. Effect of polymerization with transglutaminase on in vitro digestion and antigenicity of β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 25, p.123-131, 2012.
- WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- WAL, J.M. Structure and function of milk allergens. **Allergy**, v. 56, n. 67, p. 35-38, 2001.
- WAL, J.M. Cow's milk allergens. **Allergy**, v. 53, p. 1013-1022, 1998.

- WALSH, D.J.; CLEARY, D.; MCCARTHY, E.; MURPHY, S.; FITZGERALD, R.J. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. **Food Research International**, v. 36, p.677-683, 2003.
- WATANABE, M., SUZUKI, T., IKENZACA, Z.; ARAI, S. Controlled enzymatic treatment of wheat protein for productions of hypoallergenic flour. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 388-490, 1994.
- WRÓBLEWSKA, B.; JEDRYCHOWSKI, L. Influence of enzymatic cow milk hydrolysates on IgA and IgG response of Balb/c mice organism. **Czech Journal of Food Science**, v.23, n.2, p. 51-63. 2005.
- WRÓBLEWSKA, B.; JEDRYCHOWSKI, L.; HAJÓS, G.; SZABÓ, E. Influence of Alcalase and Transglutaminase on Immunoreactivity of Cow Milk Whey Proteins. **Czech. Journal of Food Science**, v. 26, p. 15-23, 2008.
- ZEECE, M.; HUPPERTZ, T.; KELLY, A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.9, p. 62–69, 2008.
- ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; PEREIRA DIAS, N.F.G.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.4, n.4, p.1-8, 2001.

ANEXO 1



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1586-1**, sobre "**Efeitos da hidrólise pré e pós polimerização catalisada pela transglutaminase na antigenicidade da β -lactoglobulina**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Flávia Maria Netto / Isabele Serimarco Sabadin**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **05 de agosto de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1586-1**, entitled "**Effect of hidrolyses pre and post polymerization catalized by transglutaminase on antigenicity of β -lactoglobulin**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 5, 2008**.

Campinas, 05 de agosto de 2008.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>