
Alergia alimentar: uma abordagem sobre as proteínas lácteas e os principais tratamentos físico-químicos e enzimáticos aplicados para reduzir a antigenicidade: revisão da literatura

Food allergy: an approach about milk proteins and the use of physicochemical or enzymatic treatments applied to reduce its antigenicity: literature review

Mariana Bataglin Villas Boas, Hellen Daniela de Souza Coelho, Milena Baptista Bueno, Célia Regina de Ávila Oliveira, Flávia Maria Netto

¹Curso de Nutrição da Universidade Paulista, Sorocaba-SP, Brasil; ²Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia e Alimentos da Universidade Estadual de Campinas-SP, Brasil.

Resumo

O processo alérgico às proteínas alimentares é 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. Na infância, o leite de vaca está no topo da lista dos alimentos considerados potencialmente alergênicos, sendo que as proteínas β -lactoglobulina (β -Lg) e α -Lactalbumina (α -La) presentes na fração do soro de leite são aquelas consideradas as mais antigênicas. 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 tem como objetivo reunir as principais pesquisas realizadas em relação à caracterização de proteínas alergênicas, as reações imunológicas comumente envolvidas, bem como a utilização de tratamentos físico-químicos e enzimáticos aplicados com a finalidade de reduzir o potencial alergênico de proteínas alimentares, em especial aquelas presentes no leite.

Descritores: Polimerização; Hidrólise; Tratamento térmico

Abstract

Food allergy is an important public health problem, affecting 1-2% of adults and up to 8% of children under three years old. In childhood, cow's milk is one of the most important allergenic products, being the whey fractions corresponding to β -lactoglobulin (β -Lg) and α -Lactalbumin (α -La) considered more antigenic. 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 present the main researches related to the characterization of allergenic proteins, the most commonly reactions involved in immunologic response, as well as the physicochemical or enzymatic treatments applied in order to reduce the allergenic potential of food proteins, in particular those present in milk.

Descriptors: Polymerization; Hydrolysis; Heat treatment

Introdução

A alergia alimentar é uma doença cada vez mais frequente nos países ocidentais e permanece um campo a ser explorado e compreendido pela ciência¹. 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. Na infância, o leite bovino está no topo da lista dos alimentos considerados potencialmente alergênicos².

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 alérgico³.

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 pepsina⁴. Essa resistência resulta na não fragmentação de sequências específicas de aminoácidos, que podem sensibilizar indivíduos e desencadear o processo alérgico, mesmo quando a proteína é administrada em baixas concentrações⁵.

A alteração na conformação dos determinantes antigênicos – epítomos – como resultado da perda da estrutura terciária, pode reduzir o potencial antigênico da proteína³. Vários estudos têm focado a utilização de diferentes processos físicos, químicos ou enzimáticos para redução do potencial antigênico das proteínas do soro de leite. Diante do exposto, a presente revisão tem como

objetivo reunir as principais pesquisas realizadas em relação à caracterização de proteínas alergênicas, as reações imunológicas comumente envolvidas, bem como a utilização de tratamentos físico-químicos e enzimáticos aplicados com a finalidade de reduzir o potencial alergênico de proteínas alimentares. O enfoque desta revisão foi nas proteínas lácteas, já que a alergia ao leite de vaca (ALV) é uma das alergias alimentares mais comuns principalmente em crianças e continua em ascendência. O tema é um desafio em dois principais âmbitos: na área da saúde visando um tratamento eficaz, e na área tecnológica visando a formulação de produtos hipoalergênicos.

Revisão da Literatura

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 subfrações presentes em pequenas concentrações no soro do leite, são compostas por: lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres⁶.

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: coagulação enzimática, resultando no coágulo de caseína; precipitação ácida no pH isoeletrico, resultando na caseína isoeletrica, 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 protéico⁷.

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 emulsificante⁸. Nutricionalmente, devido ao seu conteúdo de aminoácidos⁸ 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 suplementar⁹.

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, também para idosos e atletas⁸. 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. Além disso, após hidrólise, pode haver a formação de peptídeos bioativos capazes de modular respostas fisiológicas no orga-

nismo, como imunológica, opióide e ergogênica⁸⁻⁹.

A β -Lg é a principal proteína do soro de leite em ruminantes, perfaz 50% do total das proteínas que constituem esta fração³. É uma proteína globular, constituída por 162 aminoácidos, massa molecular (MM) ~ 18,3 kDa contém um grupo sulfidril livre (-SH) e duas pontes dissulfeto intramolecular (-S-S-), ligando a CyS_{66} - CyS_{160} e CyS_{106} - CyS_{119} . A estrutura secundária consiste de folhas-B antiparalelas formadas por nove cordas- β (β -strands). A estrutura cristalina mostra que o monômero de MM ..., 18,3 kDa, consiste predominantemente de folhas-B (50%) e uma pequena porção de α -hélice (15%), estruturas ao acaso (15%) e estruturas em volta ou turns (20%). A β -Lg apresenta polimorfismo genético, sendo que as variantes A e B são mais comuns⁶.

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 áreas⁸.

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 isoeletrico, além de apresentar alta afinidade de ligação com íons cálcio, o que leva à maior estabilidade da estrutura secundária desta proteína³.

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. Muitas das ligações dissulfeto são protegidas no núcleo da proteína e, conseqüentemente, não são facilmente acessíveis¹⁰.

Alergia ao leite de vaca é uma das alergias alimentares mais comuns em crianças, com uma incidência estimada de 2-3% para crianças com idade até 4 anos. 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 sanguíneos, 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 diarreia), 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 anafilático¹¹.

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 organismo¹². A Tabela 1 mostra a composição centesimal das proteínas do leite bovino em comparação ao leite humano.

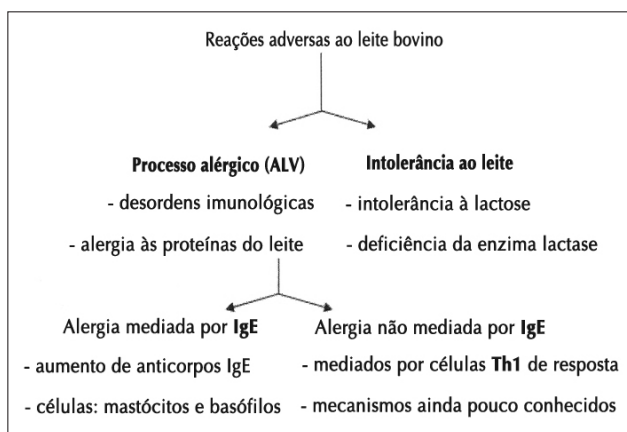


Figura 1. Classificação das reações adversas ao leite bovino

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

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. No leite bovino, as quatro frações da caseína α S1-, α S2-, β - e K- caseína e as proteínas do soro β -lactoglobulina, α -lactalbumina são considerados os principais responsáveis por desencadear a resposta alérgica³.

Tratamentos físico-químicos

A desnaturação térmica pode alterar a conformação dos epítopos como resultado da perda da estrutura ter-

ciária, consequentemente reduzindo o potencial antigênico da proteína^{3,13}. 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. Portanto, os agregados formados após desnaturação térmica podem apresentar características estruturais distintas quando diferentes condições de aquecimento são utilizadas, resultando em diferentes graus de antigenicidade¹⁴.

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 > 700C¹⁵. Mierzejewska & Kubicka¹⁶ 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.*¹⁷ 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.*¹⁴ 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 epítopos intramoleculares devido ao desdobramento da cadeia polipeptídica, ou mesmo à formação de novos sítios antigênicos¹⁷. 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 epítopos¹⁷.

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 frequentemente observadas no processamento industrial. O processo resulta

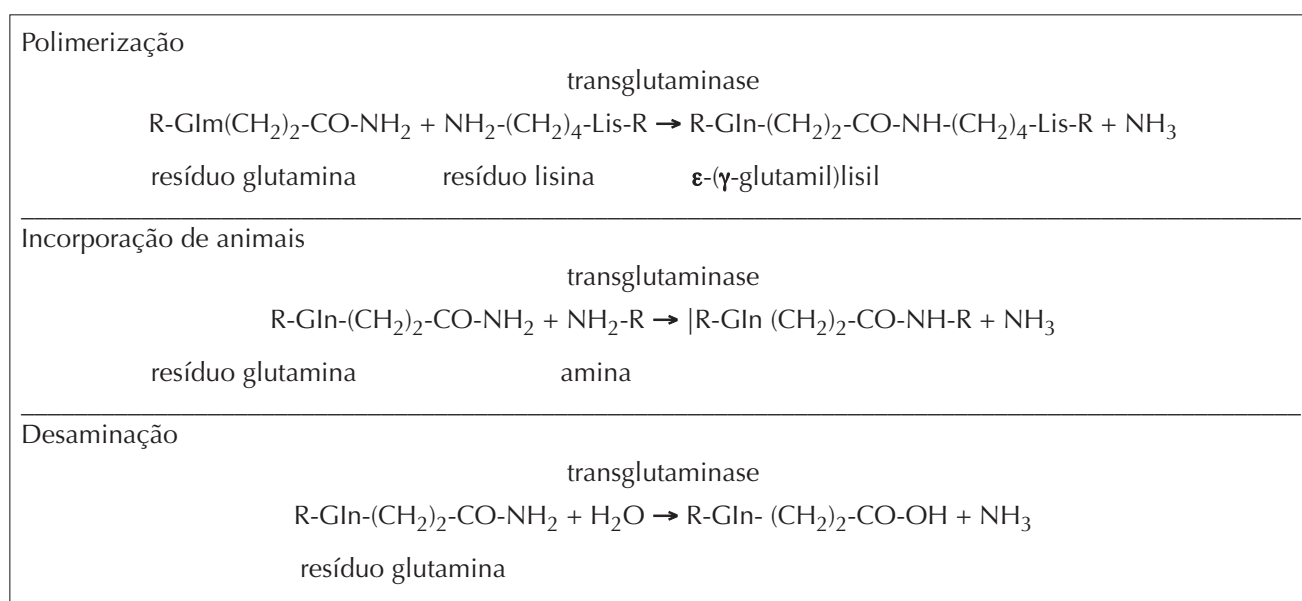


Figura 2. Reações catalisadas pela transglutaminase

na formação de compostos intermediários, denominados produtos de Amadori os quais podem tanto aumentar a atividade de ligação de IgE, como reduzir ou não afetar o seu reconhecimento¹⁸⁻¹⁹.

Tratamentos enzimáticos

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. A hidrólise enzimática de proteínas é utilizada para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo²⁰. Pode melhorar em particular as características de absorção das proteínas, reunindo as seguintes propriedades: nutricionalmente adequado, osmoticamente equilibrado e hipoalergênico²¹. Concernente à questão hipoalergênica, embora as formulações elaboradas com hidrolisados protéicos do soro de leite tem sido um grande avanço na terapia de indivíduos alérgicos, estas podem apresentar atividade antigênica decorrente de material não hidrolisado, proveniente principalmente da β -Lg²². Até então, somente a hidrólise extensa das proteínas, até que maioria dos peptídeos formados atinja MM entre 2 e 5kDa, pode anular alergenicidade das proteínas do soro de leite²³.

A especificidade da enzima é um dos fatores determinantes na redução da alergenicidade das proteínas²⁴. Kananen *et al.*²³ 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 destas proteínas. Para o mesmo substrato, Svenning *et al.*²⁴ 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.

A reação com a enzima transglutaminase (TG) também pode alterar a antigenicidade das proteínas. A Figura 2 ilustra as reações catalisadas pela TG, que modifica as proteínas por meio de incorporação de aminas, ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamil) lisil ou desaminação²⁵. 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 sensoriais¹³.

Villas-Boas *et al.*²⁶ e posteriormente Villas-Boas *et al.*²⁷ concluíram que a utilização do aminoácido cisteína (Cys) facilitou a reação de polimerização por TG e melhorou, digestibilidade proteica e reduziu potencial antigênico, observado por testes *in vivo* e *in vitro*. Estes resultados são promissores, em especial para o tratamento com agente redutor Cys, uma vez que este poderia ser utilizado em produtos alimentares.

Recentemente tem sido estudado o processo tecnológico de hidrólise enzimática associada à polimerização com a TG, já que o mesmo pode modificar algumas importantes propriedades tecnológicas e funcionais de proteínas alimentares e ter impacto no potencial alergênico do produto²⁸. Wróblewska *et al.*²⁹ e Sabadin *et al.*³⁰ observaram redução da antigenicidade das proteínas de

soro de leite ao combinar hidrólise com alcalase e polimerização com TG em diferentes condições.

Discussão

As proteínas do leite bovino são um dos principais alérgenos alimentares que causam reações imunológicas mediadas por IgE, isto devido à alta resistência destas proteínas ao processo de digestão pelas enzimas gastrointestinais 31 ou ainda aos devido os peptídeos provenientes da digestão apresentarem sequências aminoácídicas com capacidade de se ligar à IgE e estimular as células T de resposta alérgica. Vários processos tecnológicos têm sido utilizados na tentativa de reduzir ao máximo a alergenicidade das proteínas do leite³². Dentre eles, o processo enzimático é um dos métodos mais estudados e aplicados para este fim, principalmente na elaboração de fórmulas infantis hipoalergênicas^{32,22}. 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 leite³². 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, ou na liberação de determinantes antigênicos após clivagem da proteína^{32,22}. 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, podem conferir sabor indesejável ao alimento, relativo ao amargor, fator negativo quando se pensa em aplicação industrial destes produtos³².

O tratamento com TG também tem sido relatado como meio de modificar as propriedades antigênicas de proteínas alimentares^{26,28-29}. Além das diferenças quanto às características dos produtos formados, o tratamento de polimerização pode também alterar a susceptibilidade da proteína à digestão gastrointestinal, e consequentemente seu potencial alergênico. Este tratamento também pode modificar algumas importantes propriedades tecnológicas e funcionais de proteínas alimentares. Hidrolisados da soja tratados com TG apresentaram géis mais resistentes, termicamente estáveis e com maior capacidade emulsificante³³. Estas propriedades também foram melhoradas em hidrolisados de caseinato de sódio²⁸ e hidrolisados do glúten³⁴ tratados com a TG. Portanto, além de hipoalergênico, há indicativos de que o produto resultante do processo de polimerização poderia apresentar importantes propriedades tecnofuncionais, devendo ser levado em consideração na formulação de produtos.

Conclusão

O presente estudo relata as principais características de proteínas lácteas, as reações e componentes envolvidos no processo alérgico, bem como os tratamentos físico-químicos e enzimáticos que vêm sendo utilizados para atenuar a antigenicidade destas proteínas. A utilização de proteínas lácteas, em especial aquelas pre-

sentos no soro de leite, auxilia no entendimento sobre como um processo pode alterar a conformação proteica e resultar na modificação do seu reconhecimento pelas imunoglobulinas do tipo E, envolvidas no processo alérgico. Utilizar as proteínas lácteas como modelo de estudo tem sido comum, já que as mesmas apresentam inúmeras propriedades físico-químicas, nutricionais e tecnológicas. Com os resultados reportados, outras proteínas alimentares, também alergênicas, podem ser estudadas e modificadas, por exemplo, as proteínas da soja, do glúten e aquelas presentes no ovo. Com isto aumentam-se as chances de se fornecer um produto cada vez mais seguro aos portadores de alergia alimentar, sem a necessidade de excluí-los da alimentação.

Referências

- Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol*. 2009;58(4):427-66.
- Matsumoto L. Mitigation of the allergenic activity of beta-lactoglobulin by electrolysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22:235-42.
- Monaci L, Tregoat V, Van Hengel AJ, Anklam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur Food Res Technol*. 2006;223(2):149-79.
- Chicón R, López-Fandifio R, Alonso E, Belloque J. Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of beta-lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. *J Dairy Sci*. 2008;91:928-38.
- Mouécoucou J, Frémont S, Villaume C, Sanchez C, Méjean L. Polysaccharides reduce in vitro IgE/IgE-binding of β -lactoglobulin after hydrolysis. *Food Chem*. 2007;104:1242-9.
- Haraguchi FK, Abreu WC, De Paula H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nutr*. 2006;19(4):479-88.
- Zinsly PF, Sgarbieri VC, Pereira Dias NFG, Jacobucci HB, Pacheco MTB, Baldini VLS. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Braz J Food Technol*. 2001;4(4):1-8.
- Pacheco MT, Dias NFG, Baldini VL, Tanikawa C, Sgarbieri VC. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(2):333-8.
- Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *J Nutr Biochem*. 2003;14:251-8.
- Restani P, Velona T, Plebani A, Ugazio AG, Poiesi C, Muraro A. *et al*. Evaluation by SDS-PAGE and Immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clin Exp Allergy*. 1995;25(7):651-8.
- Nowak-Węgrzyn AH, Bencharitiwong R, Schwarz J, David G, Eggleston P *et al*. Mediator release assay for assessment of biological potency of German cockroach allergen extracts. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(4):949-55.
- Hettinga K, Valenberg HV, De Vries S, Boeren S, Van Hooijdonk T, Van Arendonk J *et al*. The Host Defense Proteome of Human and Bovine Milk. 2001;6(4):103-9.
- Rodríguez-Nogales JM. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of eows' milk: A statistical approach. *Int Dairy J*. 2006;16(1):26-32.
- Spiegel T, Huss M. Whey protein aggregation under shear conditions: effects of pH-value and removal of calcium. *International. J Food Sci Technol*. 2002;37(5):559-68.
- Fiocehi A, Restani P, Riva E, Mirri GP, Santini I, Bernardo L *et al*. Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. *Allergy*. 1998;53:798-802.
- Mierzejewska D, Kubięka E. Effect of temperature on immunoreactive properties of the cow milk whey protein β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft Milk Sci Technol*. 2006;61(1):69-72.
- Kleber N, Krause I, Illgner JH. The antigenic response of β -Lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. *Eur Food Res Technol*. 2004;219(2):105-10.
- Nakamura A, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H. Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *J Agric Food Chem*. 2005;53(19):7559-64.
- Taheri-Kafrani A, Gaudin JC, Rabesona H, Nioi C, Agarwal D, Drouet M, *et al*. Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *J Agric Food Chem*. 2009;57:4974-82.
- Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Technol*. 2000;11(7):254-62.
- González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Páez, MP; Guadix EM. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnol Bioeng*. 1994;44:523-8.
- Van Eseh BCAM, Knippinga K, Jeurinka P, Van Der Heidee S, Dubois AEJ, Willemsena LEM *et al*. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. *Toxicol Lett*. 2001;201(3):264-9.
- 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. *Int Dairy J*. 2000;10(10):691-7.
- Svenning C, Brynhildsvold J, Molland T, Langsrud T, Vegarud GE. Antigenic response of whey proteins and genetic variants of β -lactoglobulin – The effect of proteolysis and processing. *Int Dairy J*. 2000;10(10):699-711.
- 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 Hydrocolloid*. 2007;21(3):463-71.
- Villas-Boas MB, Vieira KP, Trevisan G, Zollner RL, Netto FM. The effect of Transglutaminase-Induced Polymerization in the Presence of Cysteine on β -Lactoglobulin Antigenicity. *Int Dairy J*. 2010;20(6):386-92.
- Villas-Boas MB, Fernandes MA, Zollner RL, Netto FM. Effect of polymerization with transglutaminase on *in vitro* digestion and antigenicity of β -lactoglobulin. *Int Dairy J*. 2012;25(2):123-31.
- O'Sullivan D, Fitzgerald RJ. Physicochemical properties and residual antigenicity of transglutaminase-cross-linked sodium caseinate hydrolysates. *Int Dairy J*. 2012;23(1):18-23.
- Wróblewska B, Jedrychowski L, Hajós G, Szabó E. Influence of α -calase and transglutaminase on immunoreactivity of cow milk whey proteins. *Czech J Food Sci*. 2008;26:15-23.
- Sabadin IS, Villas Boas MB, Zollner RL, Netto FM. Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on lactoglobulin antigenicity. *Eur Food Res Technol*. 2012;35(5):801-9, 2004;219:105-10.
- Astwood JD, Leach JN, Fuchs FL. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nat Biotechnol*. 1996;14(10):1269-73.
- El-Agamy EI. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin Res*. 2007;68:64-72.

33. Babiker EE. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chem.* 2000;70(2):139-45.

34. Agyare, KK, Xiong YL, Addo K. Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate. *Food Chem.* 2008;107(3): 1131-7.

Endereço para correspondência:

Prof^a Dra. Mariana Battaglin Villas Boas
Universidade Paulista – Campus Sorocaba
Av. Independência, 210 – Éden
Sorocaba-SP, CEP 18087-101
Brasil

E-mail: mariana.balvaro@gmail.com

Recebido em 5 de agosto de 2014
Aceito em 11 de setembro de 2014