



Universidade de
Aveiro
2013/2014

Departamento de Química

**TERESA
HENRIQUES**

**Valorização do kiwi (*A. deliciosa*) de
baixo calibre - extração de actinidina e
sua aplicação na produção de
hidrolisados de glúten**



Universidade de Aveiro
2013/2014

Departamento de Química

**TERESA
HENRIQUES**

Valorização do kiwi (*A. deliciosa*) de baixo calibre - Extração de actinidina e sua aplicação na produção de hidrolisados de glúten

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Ramo da Bioquímica Alimentar, realizada sob orientação científica da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, Investigadora de Pós-Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Ao tio Lilo e à mamã Mimi.

“The period of greatest gain in knowledge and experience is the most difficult period in one’s life.” - Dalai Lama

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora associada com agregação do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Quero agradecer às minhas orientadoras pela oportunidade que me deram de realizar este trabalho e pelas correções, críticas e ajuda prestada durante o seu desenvolvimento.

Agradeço ao professor Manuel António Coimbra pelos artigos disponibilizados e ao professor José Lopes da Silva pelo extrato comercial de papaína cedido.

Ao professor Rui Vitorino pela oportunidade de realizar os primeiros ensaios de SDS-PAGE e zimografia, e ao Fábio Trindade pela preciosa ajuda e disponibilidade prestada durante o ensaio de zimografia.

À Anne-Marie Costa agradeço a disponibilidade, amabilidade e ajuda prestada na aquisição dos espetros FTIR.

À Dulce Helena, um grande obrigada por toda a preocupação e disponibilidade manifestadas, mas principalmente pela simpatia de todos os dias.

Quero ainda agradecer à minha mãe, manas, titios, e amigos que tanto me ouviram e me animaram e me incentivaram durante esta longa caminhada, obrigada a todos do fundo do meu coração!

À Inês e ao Quitério por terem sido família, à Barbarian pelos cafés e conversas da manhã, à Barbosinha pela paciência de sempre, ao Koky pelos conbíbios musicais. Obrigada!

Um muito muito obrigada à família Andrade pelos Domingos acolhedores, todo o amor, ajuda e dedicação demonstrados.

Ao meu querido André Andrade por ter tido sempre tempo e paciência para me ouvir, por me ter ajudado em tudo, pelos passeios surpresa, por todo o amor e amizade, muito obrigada!

palavras-chave

A. deliciosa, actinidina, extração, aplicações alimentares, glúten.

resumo

O kiwi é o fruto de uma planta pertencente ao género botânico *Actinidia*, da família das Actinidiaceae. Apesar das suas propriedades bioativas, o desperdício anual associado à venda e processamento do kiwi é bastante significativo. A actinidina é uma cisteína protease que representa 50% da proteína solúvel do kiwi. O objetivo deste trabalho foi valorizar o kiwi e os seus subprodutos estudando o efeito da actinidina no glúten. A enzima foi extraída em quatro condições distintas e os extratos sujeitos a um estudo de cinética enzimática com azocaseína. A extração que resultou num extrato rico em proteína (rendimento superior a 70%) com elevada atividade enzimática específica (1,31 a 14,59 U/mg de proteína) consistiu num simples *salting out* da proteína presente no sumo do fruto após homogeneização e centrifugação. A zimografia realizada a pH 3, 6 e 8 mostrou ainda que a enzima é ativa numa vasta gama de pH e permitiu identificar diferentes estados de maturação da enzima (N-preactinidina e actinidina madura). Realizaram-se ensaios preliminares para avaliar o efeito da actinidina no glúten através da análise dos hidrolisados de glúten de elevado e baixo peso molecular, obtidos após incubação da enzima com glúten hidratado e com glúten liofilizado. Os hidrolisados foram analisados por FTIR, tendo-se observado alterações estruturais nas amostras tratadas com actinidina. Estas alterações estruturais foram corroboradas pela alteração do perfil eletroforético dos resíduos obtidos após hidrólise e pela presença de aminoácidos livres nos sobrenadantes. A análise dos hidrolisados obtidos por SDS-PAGE após 1, 2 e 24 horas de incubação do glúten liofilizado com actinidina (25, 50 e 75 µg/mg) mostrou a presença de péptidos com baixo peso molecular (entre 30 e 20 kDa). A incubação durante 24 horas resulta numa hidrólise mais extensa, com formação adicional de péptidos com cerca de 20 kDa. Os resultados obtidos permitiram concluir que os extratos de actinidina tem elevado potencial para aplicação industrial na produção de hidrolisados de glúten, com a vantagem de ser uma metodologia de extração simples e de baixo custo.

keywords

A. deliciosa, actinidin, extraction, food applications, gluten.

abstract

Kiwifruit is the fruit of a plant belonging to the genus *Actinidia*, the family of Actinidiaceae. Despite its bioactive properties, the annual waste associated with fruit commercialization and processing is significant. Actinidin is a cysteine protease which represents 50% of the soluble protein in kiwifruit. The goal of this work was to add value to kiwifruit and its by-products through studying actinidin effect in gluten. The enzyme was extracted in four different conditions and extracts subjected to enzyme kinetics study with azocasein. It was found that the extraction resulting in an extract rich in protein (yield greater than 70%) with high specific enzyme activity (1.31 to 14.59 U/mg protein) is obtained through a simple salting out of the protein present in the fruit juice after homogenization and centrifugation. Zymography carried out at pH 3, 6 and 8 also showed that the enzyme is active over a wide pH range and it was possible to identify the mature and N-preactinidin. Preliminary experiments were performed to evaluate the effect of actinidin on gluten by analysis of the high and low molecular weight gluten hydrolysates, obtained after incubation of the enzyme with hydrated and freeze-dried gluten. The hydrolysates were analysed by FTIR, and it was observed structural changes in the samples treated with actinidin. These structural changes were corroborated with the changes observed in the electrophoretic profile of the residues obtained after hydrolysis, and the presence of free amino acids in the supernatants. Analysis of the supernatants obtained by SDS-PAGE after 1, 2 and 24 hours of incubation of the freeze-dried gluten with actinidin (25, 50 and 75 µg/mg) showed the presence of peptides with lower molecular weight (between 30 and 20 kDa). Incubation for 24 hours results in a more extensive hydrolysis with formation of additional peptides about 20 kDa. The results showed that the actinidin extracts has high potential for industrial application in the production of hydrolysed gluten, with the advantage of a simple and low cost extracting methodology.

Índice

Índice de Tabelas.....	xv
Índice de Figuras.....	xvii
Lista de abreviaturas.....	xix
I. MOTIVAÇÃO.....	1
II. INTRODUÇÃO.....	3
1 KIWI: CARACTERÍSTICAS GERAIS E COMERCIALIZAÇÃO.....	3
2 COMPOSIÇÃO DO KIWI.....	4
2.1 Açúcares totais.....	5
2.2 Ácidos orgânicos.....	5
2.3 Polissacarídeos.....	5
2.4 Ácidos gordos.....	6
2.5 Vitamina C.....	6
2.6 Polifenóis e outros fitoquímicos.....	7
2.7 Proteínas.....	7
3 ACTINIDINA (E.C.3.4.22.14).....	8
3.1 Estrutura e cinética enzimática.....	10
3.2 Aplicações.....	14
3.3 Efeito da suplementação com actinidina na digestão do glúten.....	15
4 GLÚTEN.....	16
4.1 Composição.....	17
4.2 Alergia e intolerância.....	18
4.3 A dieta gluten free.....	19
III. OBJETIVO.....	23
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1 Amostras.....	25
1.1 Kiwis.....	25
1.2 Glúten.....	25
1.3 Extrato de actinidina.....	26
1.4 Extrato de papaína.....	26
2 Extração de proteína solúvel.....	26
3 Determinação de proteína solúvel total pelo método do BCA.....	28
4 Determinação de atividade enzimática pelo método da azocaseína.....	28
5 Estudo da cinética enzimática.....	29
6 Zimografia.....	29
7 Hidrólise do glúten com cisteína proteases.....	30
7.1 Análise dos hidrolisados proteicos por espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR).....	31

7.2	Análise de aminoácidos das frações hidrolisadas de baixo peso molecular por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID)	32
7.3	Análise de proteínas presentes nas frações hidrolisadas de elevado e baixo peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	33
V.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
1	Proteína solúvel total e atividade enzimática	35
2	Cinética enzimática	38
3	Zimografia	39
4	Hidrólise de glúten com cisteína proteases	40
4.1	Análise dos hidrolisados proteicos por FTIR	40
4.2	Análise de aminoácidos por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID)	42
4.3	Análise de proteínas presentes nas frações hidrolisadas de elevado e baixo peso molecular por SDS-PAGE	45
5	Considerações finais	48
VI.	CONCLUSÕES	51
VII.	TRABALHOS FUTUROS	53
VIII.	BIBLIOGRAFIA	55

Índice de Tabelas

Tabela 1 Composição de <i>A. deliciosa</i> . var. 'Hayward'. Apresentado em g/100 g de fruto fresco, na ausência de outra indicação. Adaptado de (5, 8, 12).....	4
Tabela 2 Tipos de proteínas e aminoácidos presentes no glúten. Adaptado de (55).....	18
Tabela 3 Tabela nutricional da farinha de trigo tipo 65 para usos culinários Nacional.....	25
Tabela 4 Condições de extração utilizadas para obtenção do extrato rico em actinidina.	27
Tabela 5 Condições experimentais em que se deram os ensaios enzimáticos para o estudo do efeito de proteases cisteínicas no glúten.....	31
Tabela 6 Atividade enzimática da papaína comercial e EAct determinada pelo método da azocaseína (pH 6,5) após incubação durante 15 minutos a 37 °C.....	35
Tabela 7 Extração de proteína solúvel a partir do kiwi inteiro em quatro condições distintas; massa dos extratos obtidos, sua concentração em proteína solúvel e atividade enzimática específica.....	35
Tabela 8 Resumo de condições de extração descritas na literatura para obtenção de extratos de actinidina...	37

Índice de Figuras

Figura 1 Algumas variedades de kiwi (<i>Actinidia</i> sp.).....	3
Figura 2 Sequência completa de aminoácidos da actinidina. Em cima: destacam-se os aminoácidos com funções na atividade proteolítica da enzima q: Gln-19; c: Cys-25; h: His-162 e n: Asn-182. Em baixo destaca-se a sequência da enzima ativa madura. Fonte NCBI.....	9
Figura 3 Representação esquemática da anatomia do kiwi <i>A. deliciosa</i> . 1: Pericarpo; 2: Sementes; 3: Córtex.	9
Figura 4 Estrutura 3D do complexo actinidina-E-64. Fonte RCSB-PDB.....	10
Figura 5 Representação esquemática do mecanismo catalítico das cisteína proteases: 1) Formação do par catalítico Cys ⁻ - His ⁺ . 2) Ataque nucleofílico à ligação peptídica do substrato com formação da ligação tioéster. 3) e 4) Regeneração do grupo carbonilo (catálise ácida do resíduo de His ⁺) e liberação de um péptido (P ₁). 5) e 6) Regeneração da enzima com liberação do substrato com novo terminal carboxílico (P ₂).	11
Figura 6 Representação das interações enzima-substrato envolvendo o par catalítico Cys-25 – His-162 e os resíduos Gln-19 e Asn-182. Fonte (40).	12
Figura 7 Interação entre os grupos tiol e imidazol na actinidina. Fonte (41)	13
Figura 8 Pontes dissulfeto intramoleculares (α e γ - gliadina e α -HMW) e intermoleculares presentes no glúten. Fonte (55).	17
Figura 9 Ácido linoleico e seus conjugados.	20
Figura 10 Fluxograma do procedimento de extração de actinidina em quatro condições: diretamente do sumo e com tampão citrato de sódio, água e tampão carbonato de sódio.	27
Figura 11 Representação gráfica da digestão de azocaseína 1,5 mg/mL durante incubação com extratos não purificados de actinidina e ECPap durante 60 minutos.	38
Figura 12 Zimografia do extrato de actinidina com desenvolvimento a pH 3, 6 e 8.	39
Figura 13 Espetro FTIR (800-3000 cm ⁻¹) dos resíduos e sobrenadantes resultantes da incubação do glúten com ECPap 0,1, ECPap 1,0 e EAct 1,0.	41
Figura 14 Espetro FTIR (650-1750 cm ⁻¹) dos sobrenadantes resultantes da incubação do glúten com ECPap 0,1, EAct 1,0 e ECPap 1,0 e um branco, B. A) Região Amida I. B) Região Amida II. C) Região Amida III.	42
Figura 15 Concentração de aminoácidos (aa) em ligação peptídica e livres presentes nos sobrenadantes obtidos após incubação de glúten hidratado com ECPap 0,1, ECPap 1,0 e com EAct 1,0 durante 22 horas a 37 °C. B: branco.	43
Figura 16 Concentração de aminoácidos livres presentes nos sobrenadantes obtidos após incubação de glúten hidratado com ECPap 0,1, ECPap 1,0 e EAct 1,0 durante 22 horas a 37 °C. B:branco.	44
Figura 17 Géis de SDS-PAGE dos resíduos e sobrenadantes das amostras ECPap 0,1, ECPap 1,0 e EAct 1,0. A: amostra; B branco; M: marcador de peso molecular com 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34 e 26 kDa; m: marcador de peso molecular com 97, 66, 45, 30, 20 e 15 kDa.	46
Figura 18 Géis de SDS-PAGE dos hidrolisados proteicos de elevado (A) e baixo (B) peso molecular obtidos após incubação de glúten (G) com actinidina 0,5, 1,0 e 1,5 mg durante 1, 2 e 24 horas. B: branco; M: marcador de peso molecular com 97, 66, 45, 30, 20 e 15 kDa.	47

Lista de Abreviaturas

A	
A	Área
ACTsumo	Extrato não purificado de actinidina obtido diretamente do sumo
Ala, A	Alanina
Arg, R	Arginina
Asn, N	Asparagina
Asp, D	Aspartato
Asx	Asparagina ou aspartato
B	
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
BHT	Hidroxitolueno butilado
C	
CLA	Ácido linolénico conjugado
CTPP	Propeptídeo do terminal carboxílico
Cys, C	Cisteína
E	
EAct	Extrato não purificado de actinidina
ECPap	Extrato comercial de papaína
EDTA	Ácido etilenodiamina tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
F	
FTIR	Espetroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier
<i>fr</i>	Fator de resposta
G	
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama
Gln, Q	Glutamina
Glx	Glutamina ou glutamato
Gly, G	Glicina
H	
His	Histidina
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HMW	Elevado peso molecular
HPLC	Cromatografia em fase líquida de alta resolução
I	
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
K	
Keap1-Nrf2	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
k_{cat}/K_m	Constante de especificidade
KFAct 1a	Actinidina, isoforma ácida
KFAct 1b	Actinidina, isoforma básica
K_m	Constante de Michaelis

L	
LC-MS	Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa
Leu, L	Leucina
LMW	Baixo peso molecular
Lys, K	Lisina
M	
Met, M	Metionina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N	
NTPP	Propeptídeo do terminal amina
P	
Phe, F	Fenilalanina
PI	Padrão interno
pI	Ponto isoelétrico
Pro, P	Prolina
R	
Res	Resíduo
S	
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Ser, S	Serina
Sn	Sobrenadante
T	
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TGt	Transglutaminase tecidual
Thr, T	Treonina
TLP	<i>Thaumatococcus</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Tyr, Y	Tirosina
V	
Val, V	Valina

I. MOTIVAÇÃO

O trabalho aqui apresentado surgiu de uma ideia que tive e partilhei com as minhas orientadoras, Elisabete Coelho e Ivonne Delgadillo, as quais me deram a oportunidade de a explorar na minha dissertação para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Alimentar.

Trata-se de estudar duas proteínas do meu interesse: uma enzima, a actinidina, e as prolaminas do trigo que formam o glúten. Tive conhecimento da primeira quando fiz a unidade curricular de ‘Projeto’ sobre valorização do kiwi de baixo calibre, no último ano de licenciatura, tendo-me interessado pelas suas propriedades proteolíticas. No ano seguinte tive oportunidade de trabalhar com o glúten, uma rede proteica pela qual também me interessei bastante por um lado, devido às suas propriedades viscoelásticas únicas e por outro, devido aos problemas de alergia e intolerância a ela associados.

Estas vivências levaram-me a questionar: ‘Será que a actinidina consegue hidrolisar o glúten para que possa ser consumido por indivíduos com uma dieta *gluten free*?’. Esta questão é a principal motivação deste trabalho.

II. INTRODUÇÃO

1 KIWI: CARACTERÍSTICAS GERAIS E COMERCIALIZAÇÃO

O kiwi é um fruto de plantas do género *Actinidia* das quais existem cerca de 60 espécies, muitas representadas por mais do que uma variedade, com várias formas, cores e tamanhos (Figura 1). É um fruto que se caracteriza pelo seu sabor agradável, o qual se adapta e cresce em condições bastante distintas, desde os trópicos até regiões de clima frio (1). Apesar de ser um fruto selvagem nativo da China (2), a sua exploração comercial iniciou-se na Nova Zelândia com a espécie *A. deliciosa* var. 'Hayward' por volta dos anos 70 (1,3) tendo-se rapidamente propagado para a Europa e mundo. Atualmente são cultivadas mais de 40 variedades de kiwi, embora as mais conhecidas continuem a ser *A. deliciosa* var. 'Hayward' e *A. chinensis* var. 'Hort16A', ambas provenientes de cultivos neozelandeses (1,3).



Figura 1 Algumas variedades de kiwi (*Actinidia* sp.).

Os principais produtores e exportadores de kiwi a nível mundial são a Itália, a Nova Zelândia e o Chile os quais contabilizaram 73% da produção mundial de kiwi em 2003. Os restantes 27% dizem respeito a outros dez países (Portugal, França, Grécia, China, entre outros), considerados produtores secundários (4). Em Portugal, a produção de kiwi iniciou-

se na década de 80 com a plantação de sementes *A. deliciosa* var. 'Hayward' (4), tendo-se intensificado em 2000 com a exportação de kiwis para Espanha.

Os principais produtores portugueses situam-se na região Entre Douro e Minho, tendo contribuído com 83% da produção nacional entre 2001 e 2005, seguindo-se a Beira Litoral (zona da Bairrada), que contribuiu com 18% da produção nacional no mesmo período (4). A campanha de comercialização de kiwi dá-se entre meados de Novembro, estendendo-se até Maio do ano seguinte. Durante esse período, o kiwi é armazenado e conservado em câmaras frigoríficas sem etileno, para prevenir o amadurecimento precoce do fruto. A boa capacidade de conservação a baixas temperaturas, aliada à produção de frutos de bom calibre (cerca de 100 g/fruto) e sabor fizeram dos kiwis *A. deliciosa* var. 'Hayward' a principal variedade de kiwi comercializada a nível mundial (2,4,5).

2 COMPOSIÇÃO DO KIWI

A composição de qualquer fruto depende de vários fatores, tais como as condições de crescimento (4), espécie e variedade (6), momento da colheita, duração e temperatura de armazenamento (7,8). A composição média do kiwi *A. deliciosa* var. 'Hayward' no momento de colheita encontra-se sumariada na Tabela 1.

Tabela 1 Composição de *A. deliciosa* var. 'Hayward'. Apresentado em g/100 g de fruto fresco, na ausência de outra indicação. Adaptado de (5, 8, 12).

<i>A. deliciosa</i> var. 'Hayward'	
Cor do fruto	Verde
Densidade dos pêlos	Denso
Massa do fruto (g)	99,6 ± 14,4
°Brix mínimo/ideal	6,2/7,5-8
Água	84,05
Açúcares totais	10,51
Acidez total	1,92
Fibra dietética total	2,6
Pectina (mg)*	392
Gordura	0,3
Proteína	1,13
Ácido ascórbico (mg/100g)	55,0 ± 14,3

*Equivalentes de ácido galacturónico

2.1 Açúcares totais

Os açúcares maioritários do kiwi são a glucose, a frutose e a sacarose, os quais foram determinados por HPLC (Cromatografia em fase líquida de alta resolução) num estudo realizado com sete cultivos de kiwi colhidos durante quatro anos seguidos (6). Os açúcares totais representaram 8,05 g/100 g de fruto fresco (var. 'Elmwood') a 13,29 g/100 g de fruto fresco (var. 'Fatma') da composição do kiwi, com predomínio de glucose e frutose (40 a 45% dos açúcares totais para todas as variedades com exceção das variedades 'Bruno' e 'Fatma' em que o açúcar predominante foi a sacarose (45 a 48%)). A sacarose é a principal forma de transporte de açúcares nos frutos, a qual é utilizada para a produção de energia ou para biossíntese. Durante o amadurecimento do fruto verifica-se uma redução de sacarose e aumento de glucose e frutose (9), os quais, associados à redução no teor de ácidos orgânicos, contribuem para frutos com °Brix superior e melhor sabor (6,9).

2.2 Ácidos orgânicos

O ácido cítrico é o principal ácido orgânico encontrado no kiwi, o qual representa cerca de 55 a 70% dos seus ácidos orgânicos, com 1,06 a 1,95 g/100 g de fruto fresco, seguindo-se o ácido málico e o ácido quínico, com proporções variáveis: o ácido málico varia entre 0,24 e 0,41 g/100 g fruto fresco para 'Hayward' e 'Abbot', respetivamente, e 0,30 g/100 g de fruto fresco e 0,71 g/100 g de fruto fresco para 'Gracie' e 'Fatma', respetivamente (6). Os ácidos totais representam 1,92 a 3,05% da massa fresca do kiwi, e são convertidos em açúcares (gluconeogénese) para serem utilizados como fonte de energia ao longo do desenvolvimento do fruto (9).

2.3 Polissacarídeos

O kiwi, como outros frutos, é rico em polissacarídeos de reserva (grânulos de amido) e estruturais (celulose). Para além da celulose, o kiwi é bastante rico em polissacarídeos solúveis como as pectinas (homogalacturonanas e ramnogalacturonanas com cadeias laterais de galactanas e arabinogalactanas) e polissacarídeos insolúveis como as hemiceluloses (xiloglucanas, glucuronoxilanas e galactoglucomananas) (10), os quais não são digeridos pelas secreções gastrointestinais, sendo denominados de fibra dietética. Alguns destes polissacarídeos já foram associados às propriedades benéficas do fruto na prevenção de certos tipos de cancro e outras doenças de envelhecimento (11,12) e à manutenção de uma microflora saudável por proliferação e adesão de bifidobactérias ao

epitélio do intestino e diminuição do pH, principalmente após o consumo de kiwis *A. chinensis* (13).

2.4 Ácidos gordos

Os ácidos gordos maioritários do kiwi são o ácido linolénico (35-40%), oleico (26-36%), palmítico (15-22%), linoleico (9-11%) e esteárico (2-5%), presentes essencialmente nas sementes do fruto, maioritariamente esterificados com triacilglicerol. O elevado teor destes ácidos gordos (principalmente do ácido α -linolénico ω -3) e a sua biodisponibilidade (preferência pela posição sn-2 do triacilglicerol), é uma característica que destaca o kiwi da maioria dos frutos, normalmente com teor de gordura desprezável (14). Por outro lado, durante o armazenamento a baixas temperaturas (0 ou 5 °C) verifica-se aumento do rácio ácidos gordos insaturados/ácidos gordos saturados na membrana, devido ao aumento de ácido oleico e diminuição de ácido palmítico, com conseqüente aumento da sua permeabilidade e fuga de eletrólitos para o citosol (8). Este fenómeno é descrito como sendo um mecanismo de adaptação de fruto ao *stress* causado pela temperatura reduzida a que o fruto é normalmente armazenado. Ao longo do armazenamento do fruto também se verifica uma ligeira redução da concentração de ácido linolénico uma vez que este é mais suscetível à oxidação (8).

2.5 Vitamina C

O elevado teor de ácido ascórbico, a forma ativa da vitamina C, dos frutos *Actinidia* é outra característica que os destaca dos restantes frutos, conferindo-lhes capacidade antioxidante semelhantes à das uvas tintas (12). Geralmente o kiwi apresenta um teor em vitamina C superior a 50 mg/fruto, com algumas exceções, por exemplo, as variedades ‘Fatma’ e ‘Abbot’ (*A. deliciosa*) apresentam 26,3 mg/fruto e 38,2 mg/fruto, respetivamente (6). Outra particularidade interessante dos frutos do género *Actinidia* é que, ao contrário dos outros alimentos contendo vitamina C em que se observa decréscimo da sua concentração ao longo do seu armazenamento, os frutos *Actinidia* não mostraram alterações significativas na concentração de ácido ascórbico total durante o armazenamento (7,15).

2.6 Polifenóis e outros fitoquímicos

A presença de ácidos fenólicos, flavonóides, vitamina C e E, entre outros fitoquímicos atualmente identificados tanto na polpa como na casca do kiwi (7,16), conferem-lhe atividade antioxidante *in vitro*, sendo que existe uma relação linear entre essa capacidade e o teor de vitamina C e polifenóis presentes no kiwi (17). Ao contrário do que acontece com a maior parte dos compostos do kiwi, o momento de colheita não influencia os níveis de fenóis nem a capacidade antioxidante do fruto. Por outro lado, o armazenamento influencia negativamente a sua capacidade antioxidante, apesar de se registar um ligeiro aumento quando o fruto é climatizado à temperatura ambiente após armazenamento a 0 °C (7).

2.7 Proteínas

É difícil padronizar a composição proteica do kiwi, uma vez que se observam variações das concentrações das diferentes proteínas e respetivas isoformas, as quais estão fortemente relacionadas com a espécie, variedade e o estado de maturação do fruto (18). Sabe-se que as proteínas maioritárias do kiwi são a actinidina, TLP (*thaumatin-like protein*), kiwilina, KiTH e kissper. Destas, a actinidina (ou actinidaina) é a maioritária, representando cerca de 50% da proteína solúvel (19,20). Esta enzima tem sido descrita como sendo o principal alergénio do kiwi (18,21,22), tendo também sido relacionada com o efeito laxante do fruto, manifesto principalmente em idosos (23). A TLP ou Act d2 é uma proteína com 24 kDa associada a reações alérgicas (22) e a propriedades antifúngicas, com potencial para a produção de pesticidas naturais (19). A kiwilina, ou Act d5, tem aproximadamente 26 kDa, e é a principal proteína dos kiwis *A. chinensis* var. 'Hort16A', apresentando-se sob várias isoformas (21) e cuja função na célula é desconhecida (24). A observação de que kissper e KiTH existem no fruto maduro em quantidade estequiométrica e de que a primeira apresenta 100% homologia com o terminal amina da kiwilina e a segunda 100% homologia com o terminal carboxílico da mesma proteína, levou a concluir que estas proteínas são o produto da degradação de kiwilina, provavelmente catalisada pela actinidina (22). A KiTH tem 16 kDa, mas a sua função não é conhecida. Quanto a kissper, é um pequeno péptido com 39 resíduos, resistente à proteólise e pertencente à família de proteínas com domínio do tipo EGF (fator de crescimento epidérmico), rico em cisteína, a qual se caracteriza pela capacidade de formação de canais iónicos dependente de pH nas membranas lipídicas (22), com potencial na prevenção de doenças como fibrose cística *in vitro* (25).

Em suma, verifica-se que para além de ser um fruto com sabor agradável, bom calibre e capacidade de conservação, o kiwi distingue-se por apresentar uma composição rica em compostos bioativos, o que o torna num alimento funcional. Estudos realizados *in vivo* mostraram que a ingestão de três kiwis por dia resulta na redução da oxidação lipídica e ativação do sistema imunitário, podendo assim reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, alguns tipos de cancro e doenças degenerativas como Alzheimer (12,26). Apesar disso, do milhão de toneladas de kiwi que se produzem anualmente, 30% (peso húmido) resulta em desperdícios na forma de cascas, polpas e sementes (20). Todo este desperdício tem como destino a compostagem. Para além disso, o seu comércio como fruto fresco está associado à persistente dificuldade em escoar os kiwis de baixo calibre (45-62 g/fruto) (27), os quais apresentam a mesma composição rica em compostos bioativos e sabor agradável dos kiwis comercializados (cerca de 100 g/fruto fresco), mas são desperdiçados devido à sua menor dimensão.

Neste trabalho o foco incide sobre a actinidina, nomeadamente no estudo das suas propriedades proteolíticas e potenciais aplicações, de modo a valorizar este fruto importante para a economia regional e de reduzir os desperdícios associados à sua comercialização e processamento.

3 ACTINIDINA (E.C.3.4.22.14)

Dentro da grande diversidade de espécies do kiwi, existem vários genes que codificam para cisteína proteases, as quais apresentam massas moleculares semelhantes (entre 22 e 30 kDa), mas pI (entre 3,9 e 9,3) e local de expressão (folha, caule, fruto) distintos (21,24,28). O nome actinidina refere-se a um conjunto destas cisteína proteases, semelhantes a outras cisteína proteases de plantas, como a papaína (*Carica papaya*), bromelaína (*Ananas comosus*), ficina (*Ficus glabrata*), zingipaína (*Zingiber officinale*), e de animais, como a catepsina B e a calpaína, presente em mamíferos (29). Nos kiwis *A. deliciosa*, as principais formas da actinidina são as isoformas ácidas (pI 4), KFAct 1a, e básicas (pI 9), KFAct 2a, com cargas superficiais +8 e -10, respetivamente. Apesar de ambas as isoformas serem expressas e se encontrarem presentes no fruto maduro, as isoformas básicas existem em menor quantidade, apresentando 1,5% da atividade proteolítica das isoformas ácidas (21,28), ou são inativas (30).

```

1 mglpksfvsm sliffstlli lslafnaknl tqrtndevka myeswlikyg ksynslgewe
61 rrfeifketl rfidehnadt nrsykvglng fadltdeefr stylgftsgs ntkkvsnrje
121 prvgqvlpqsy vdwsagavv diksggecgg cwafsaiatv eginkivtgv lislseqeli
181 dcgrtqnrtrg cnggyitdgf qfiinnggin teenypytaq dgecnvelqn ekyvtidtye
241 nvpynnewal qtavtyqpvs valdaagdaf kqyssgiftg pcgtaidhav tivgygtegg
301 idywivknsw dttwgeegym rilrnvggag tcgiatmpsy pvkynnqnyp epyssslinpp
361 afsmskdgpv gvedgqrysa

1 mglpksfvsm sliffstlli lslafnaknl tqrtndevka myeswlikyg ksynslgewe
61 rrfeifketl rfidehnadt nrsykvglng fadltdeefr stylgftsgs ntkkvsnrje
121 prvgqvlpqsy vdwsagavv diksggecgg cwafsaiatv eginkivtgv lislseqeli
181 dcgrtqnrtrg cnggyitdgf qfiinnggin teenypytaq dgecnvelqn ekyvtidtye
241 nvpynnewal qtavtyqpvs valdaagdaf kqyssgiftg pcgtaidhav tivgygtegg
301 idywivknsw dttwgeegym rilrnvggag tcgiatmpsy pvkynnqnyp epyssslinpp
361 afsmskdgpv gvedgqrysa

```

Figura 2 Sequência completa de aminoácidos da actinidina. Em cima: destacam-se os aminoácidos com funções na atividade proteolítica da enzima q: Gln-19; c: Cys-25; h: His-162 e n: Asn-182. Em baixo destaca-se a sequência da enzima ativa madura. Fonte NCBI.

Estas enzimas são sintetizadas como zimogénio (380 aminoácidos e aproximadamente 39 kDa), sendo posteriormente convertida na sua forma ativa madura (Figura 2) após três eventos proteolíticos na sua sequência de aminoácidos: o corte de um péptido no terminal amina, entre os aminoácidos 24 e 25, que sinaliza a enzima para o retículo endoplasmático, seguindo-se o corte entre os aminoácidos 33 e 34, que converte a enzima na sua forma ativa N-preactinidina com 37 kDa, a qual é secretada e convertida na sua forma ativa madura com 220 aminoácidos e aproximadamente 24 kDa, após perda do terminal amina (NTPP), altamente conservado entre as cisteína proteases, e do terminal carboxílico (CTPP), com tamanho variável ou até mesmo inexistente em algumas cisteína proteases, mas que no kiwi tem 34 aminoácidos, sendo este terminal determinante para o correto processamento da enzima (21,24,28).

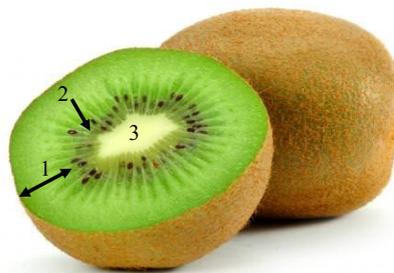


Figura 3 Representação esquemática da anatomia do kiwi *A. deliciosa*. 1: Pericarpo; 2: Sementes; 3: Córtex.

A actinidina expressa-se essencialmente no fruto, onde se observa a acumulação de mRNA durante o desenvolvimento da planta e redução até 50% após a colheita da planta, sem que se observe redução dos níveis de actinidina ao longo do amadurecimento

(29,31,32). A enzima está maioritariamente presente no pericarpo (Figura 3), em vacúolos, junto à membrana plasmática, complexo de Golgi e lisozimas, grânulos de amido e plastídios (28,31). A sua função fisiológica na planta ainda não é clara, embora se saiba que está envolvida na proteólise da kiwilina em KiTH e kissper (22) e que tenha funções de reserva e defesa (19). Uma vez ativa, a actinidina tem atividade moderada numa vasta gama de pH (4 a 10) e temperatura, sendo o seu pH ótimo 6 (33) e temperatura ótima entre 40 e 42 °C (20).

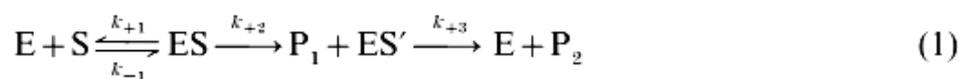
3.1 Estrutura e cinética enzimática

A estrutura tridimensional da actinidina (Figura 4) foi determinada por Baker em 1976 (34), mas só em 1980 se identificaram as três pontes dissulfeto (resíduo 25 e 65; 56 e 98 e 156 e 206), o domínio L com três α -hélices e o resíduo catalítico de Cys-25 (aminoácidos 19-115 e 214-220) e o domínio R com folha- β antiparalela e o resíduo catalítico de His-162 (aminoácidos 1-18 e 116-213) (35). Esta estrutura mostrou ser sobreponível com a da papaína, anteriormente determinada, apresentando três locais de ligação ao substrato, S1, S2 e S3 (32,35,36). Também em 1988 foram identificados três potenciais locais de glicosilação na sua sequência de aminoácidos (devido à presença da sequência Asn-X-Ser, em que X é um aminoácido qualquer), um no terminal carboxílico e dois no terminal amina (29), provavelmente com função de sinalizar e promover o seu processamento na enzima ativa madura.

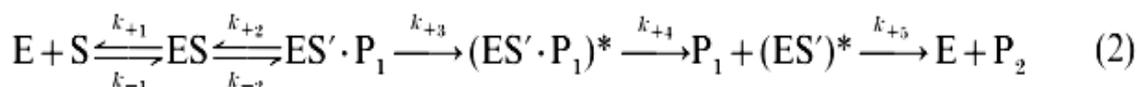


Figura 4 Estrutura 3D do complexo actinidina-E-64. Fonte RCSB-PDB.

A equação (1) representa a cinética enzimática inicialmente proposta em 1973 (38) em que se descreve a ligação da enzima (E) ao substrato (S) (reação de acilação), com formação do complexo ES, e libertação do produto P_1 (lento) seguindo-se a rápida regeneração da enzima e libertação do produto P_2 .



Posteriormente verificou-se que o passo limitante da reação não era a libertação de P_1 , uma vez que o tempo de vida de ES' era superior ao previsto teoricamente pela equação (1). Assim se concluiu que a equação (2) é a que melhor representa a cinética da enzima, em que o passo limitante é o de desacilação associado à alteração de conformação de $ES' \cdot P_1$ para $(ES' \cdot P_1)^*$, libertação de P_2 e regeneração da enzima (Figura 5) (39).



Para além do par catalítico Cys-25 – His-162, a atividade enzimática da actinidina envolve ainda outros dois resíduos: Gln-19 e Asn-182 (Figura 6). O resíduo de Cys-25 contribui com o átomo de enxofre para o ataque nucleofílico ao grupo carbonilo da ligação peptídica do substrato (com formação de uma ligação tioéster), e, juntamente com o resíduo de Gln-19, estabiliza o substrato através da formação de pontes de hidrogénio entre os seus grupos amina e amida, respetivamente, e o grupo carbonilo da ligação peptídica do

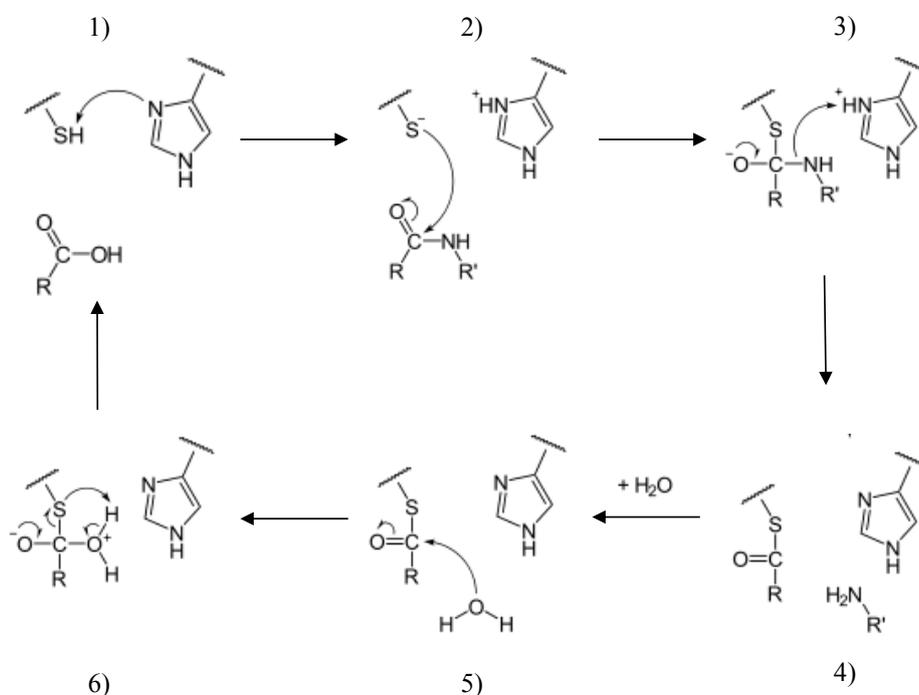


Figura 5 Representação esquemática do mecanismo catalítico das cisteína proteases: 1) Formação do par catalítico Cys⁻ - His⁺. 2) Ataque nucleofílico à ligação peptídica do substrato com formação da ligação tioéster. 3) e 4) Regeneração do grupo carbonilo (catálise ácida do resíduo de His⁺) e libertação de um peptído (P₁). 5) e 6) Regeneração da enzima com libertação do substrato com novo terminal carboxílico (P₂).

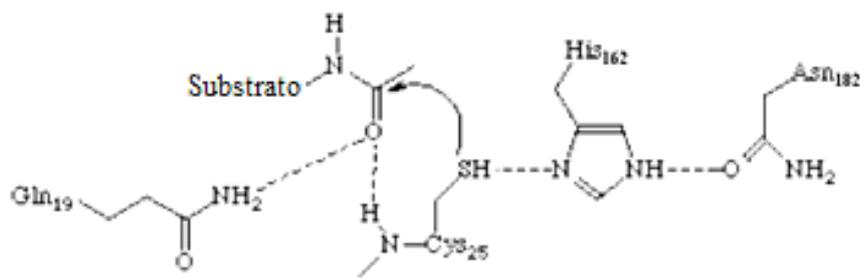


Figura 6 Representação das interações enzima-substrato envolvendo o par catalítico Cys-25 – His-162 e os resíduos Gln-19 e Asn-182. Fonte (40).

substrato, favorecendo o ataque pela Cys-25. Para além disso, o resíduo de Asp-182 orienta o anel imidazol da His-162 através de uma ponte de hidrogénio entre a amina secundária da histidina e o grupo carbonilo do seu terminal amida. Por fim, o anel de imidazol da His-162 estabiliza o resíduo catalítico de Cys-25 por interações electroestáticas entre a sua amina terciária e o protão do grupo -SH da cisteína, permitindo a desacilação e regeneração da enzima (36).

A formação da díade catalítica $\text{Cys}^- - \text{His}^+$ necessária à atividade da enzima, depende quer do pH do meio em que se encontra a enzima, quer do potencial elétrico dos resíduos envolvidos na atividade do centro ativo e presentes nos locais de ligação ao substrato, P1, P2 e P3. Verifica-se que a diferença entre os potenciais elétricos do átomo de enxofre da Cys-25 e do átomo de azoto da amina terciária da His-162 é bastante superior no caso da actinidina, relativamente à papaína, o que resulta num centro ativo com maior estabilidade, daí a diferença entre os pKa dos seus estados ionizados, 3,2 e 10,1 para actinidina e 4,2 e 8,6 para papaína; do mesmo modo, os seus pI são de 3,1 e 8,8 respetivamente; quanto maior a diferença de potencial entre os resíduos catalíticos da enzima, mais estável é o par iónico $\text{Cys}^- - \text{His}^+$ (41). Para além disso, a pH ácido, o potencial elétrico do centro ativo da actinidina é positivo, favorecendo a formação do ião tiolato pela diminuição do seu pKa de 7,6 para 3,3 (Figura 7); quando o pH é básico, o potencial negativo induz a formação do ião imidazol pela diminuição do seu pKa de 4,3 para 8,5, garantindo assim um vasto espetro de atividade da actinidina em diferentes condições de pH (41). Outro fator que se revelou importante na estabilização do par iónico $\text{Cys}^- - \text{His}^+$ foi a presença de água nos locais ativos da enzima, uma vez que esta surge sempre nas posições S1, S2 e S3, contribuindo para a sua estabilidade e atividade enzimática por estabelecer pontes de hidrogénio entre a enzima e o substrato (36).

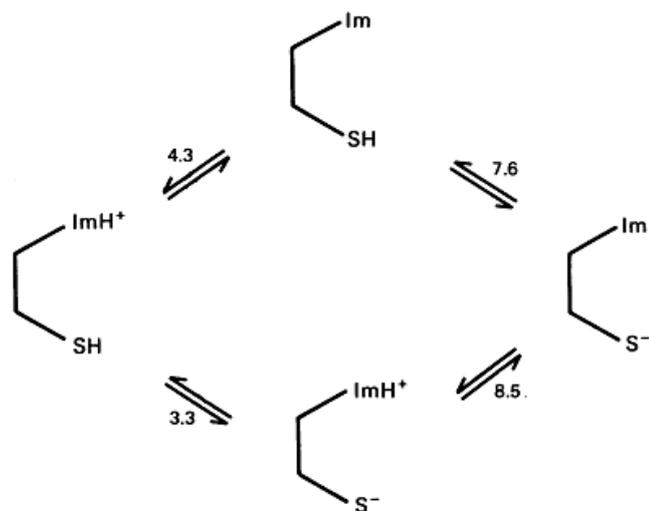


Figura 7 Interação entre os grupos tiol e imidazol na actinidina. Fonte (41) .

Como acima referido, existem três locais de interação enzima-substrato, (S1-P1, S2-P2 e S3-P3), os quais são numerados a partir do local de corte (S1-P1) no sentido do terminal amina (terminal amina-S3P3-S2P2-S1P1-terminal carboxílico) (42). No geral, a enzima liga a resíduos catiónicos nas posições S1 e S3 (24,36,43), e a Leu, Val ou Phe na posição S2, onde se forma um *pocket* com elevada afinidade para aminoácidos hidrofóbicos. O local S2 merece especial atenção uma vez que tem forte influência na especificidade das cisteína proteases (36,43). Por exemplo, apesar de a actinidina e a papaína apresentarem estruturas tridimensionais virtualmente sobreponíveis e de partilharem a mesma tríade catalítica Cys-His-Asn, em que os aminoácidos se encontram na mesma orientação (44), as suas estruturas primárias apresentam apenas 52% de homologia (29). Esta diferença tem consequências na sua capacidade de ligar resíduos hidrofóbicos com cadeias laterais aromáticas no local S2, sendo que a papaína é 10 a 100 vezes mais específica (k_{cat}/K_m) na ligação destes aminoácidos do que a actinidina, precisamente devido à sua menor afinidade (maior K_m) para aminoácidos com cadeias laterais aromáticas (44). Durante muito tempo a substituição de serina na papaína (Ser-205) por metionina na actinidina (Met-211) foi apontada como o principal motivo pela diferença observada devido ao impedimento estereoquímico causado pela metionina, tornando o *pocket* S2 da actinidina consideravelmente menor (29,39,45). Atualmente, porém, não é claro se é esta substituição ou se são as diferenças no ambiente químico da actinidina e da papaína (a actinidina tem maior potencial elétrico) as responsáveis pelas diferenças observadas na hidrólise de aminoácidos aromáticos na posição S2 (41). A equação (2) prevê uma alteração

conformacional após ligação do substrato que não é prevista no mecanismo da papaína e o impedimento estereoquímico causado pela forte interação entre os resíduos Asp-142–Lys-145 presente exclusivamente na actinidina levam a supor que a alteração conformacional diz respeito a uma deslocação do resíduo de Met-211 de modo a permitir a ligação do resíduo aromático. Assim, é possível que seja a interação Asp-142–Lys-145 a dificultar a saída de P₁ do *pocket* hidrofóbico, atrasando a reação de regeneração da enzima e libertação de P₂, daí a menor capacidade da actinidina para ligar aminoácidos com cadeias laterais aromáticas relativamente à papaína.

3.2 Aplicações

A capacidade proteolítica da actinidina numa vasta gama de pH e especificidade para vários aminoácidos permitem a sua aplicação em vários ramos da indústria alimentar, principalmente no amaciamento de carne (46), mas também como estabilizante na produção de cerveja e na panificação, tendo ainda aplicações na indústria farmacêutica e de pesticidas (19). A aplicação de actinidina no músculo da carne resulta num aumento da sua solubilidade e capacidade de retenção de água, de forma diretamente proporcional à quantidade de enzima aplicada, o que resulta numa carne mais tenra e succulenta (46). Um trabalho realizado em 2009 estudou o efeito que a injeção de uma solução de actinidina no bife (0,9 U/g de bife). Observaram degradação de proteínas com 100-200 kDa (troponina T, cadeia pesada de miosina, proteína C e α -actinina), com formação de péptidos de 20 kDa (46). A atividade proteolítica da actinidina resultou num aumento da maciez da carne e manutenção da sua firmeza e elasticidade, uma vez que a actinidina não degrada extensivamente as cadeias de colagénio, provavelmente devido ao seu elevado teor em prolina e hidroxiprolina. Este e outros trabalhos realizados com o mesmo intuito mostraram que actinidina atua através da digestão suave/moderada, com a vantagem de não ser necessária em concentrações elevadas e de poder ser aplicada na forma de extratos parcialmente purificados (46–48). Resultados semelhantes foram obtidos tendo o leite de soja como substrato, em que se observou o aumento de azoto solúvel em 40%, assim como alteração do perfil eletroforético das proteínas de soja após incubação com extrato de actinidina numa gama de 0 a 1,0 U/mL de leite de soja, com formação de pequenos péptidos (16 a 20 kDa) e de polipeptídeos com peso molecular entre 30 e 42 kDa (49). Recentemente estudou-se o potencial da enzima para aplicação como agente coagulante na indústria de queijos (20), tendo-se verificado que a percentagem de gordura do leite não

influencia a sua atividade enzimática e que os produtos de hidrólise são os mesmos da quimosina, o principal coagulante utilizado na produção de queijos. Os autores verificaram que a hidrólise se deu preferencialmente na β - e κ -caseína, a pH 5 (pI da caseína é de 4,6), com a vantagem de não se terem observado alterações na atividade enzimática após dois meses de armazenamento e de não alterar as propriedades sensoriais do queijo, o que representa uma vantagem relativamente ao uso de papaína, que produz péptidos e aminoácidos de sabor amargo. No entanto, a qualidade do coágulo de leite produzido não foi testada (20).

3.3 Efeito da suplementação com actinidina na digestão do glúten

Com base na literatura, o efeito do pré-tratamento de glúten com actinidina ainda não foi testado (50), mas já se demonstrou o efeito positivo da suplementação com actinidina na digestão gastrointestinal no glúten, nomeadamente ao nível das gliadinas. Os estudos foram realizados *in vitro* simulando as condições de digestão gástrica (51) e duodenal (52) com e sem suplementação de actinidina. Os autores não observaram diferenças na digestão gástrica do glúten na presença de actinidina (51), tendo-se apontado para o elevado teor de prolina destas prolaminas como o fator responsável pela sua baixa digestibilidade e flexibilidade limitada, impedindo a ligação ao centro ativo quer das enzimas digestivas, quer da actinidina (51). Para além disso a literatura também refere a baixa afinidade da actinidina para resíduos de prolina (43), o que também pode justificar os resultados obtidos. No caso da gliadina, a suplementação com actinidina resultou em dois péptidos (11 e 10 kDa) inexistentes após a sua digestão na ausência de actinidina, o que foi interpretado pelos autores como efeito negativo da suplementação com actinidina na digestibilidade da gliadina, no entanto, estes péptidos podem desempenhar funções bioativas (revisto em (53)) e a sua presença pode igualmente ser observada como resultado da atividade enzimática da actinidina, e portanto, significar que esta enzima desempenha um papel benéfico na digestão do glúten. Quanto à digestão duodenal do glúten e gliadinas, a suplementação com actinidina mostrou ser benéfica, com o desaparecimento de bandas ainda presentes após a digestão gástrica (20-30 kDa). Este trabalho permitiu confirmar que a suplementação de alimentos contendo glúten com actinidina resulta num aumento da sua digestibilidade gastrointestinal *in vitro* (essencialmente nas gliadinas e ao nível do intestino).

Em 2011 (54) estudou-se o efeito da actinidina *in vivo* na digestão de ratos alimentados com seis tipos de proteínas de baixa digestibilidade, entre elas o glúten, tendo a sua dieta sido suplementada com kiwis ‘Hayward’ ou ‘Hort16A’ (54). Verificou-se o efeito positivo desta enzima na digestão da maioria das proteínas testadas, incluindo o glúten (29%), tendo-se registado proteólise em três subunidades das LMW (41, 37 e 35 kDa) e nas ω -gliadina. Os resultados obtidos nestes trabalhos representam uma mais-valia à motivação deste trabalho e permitem reforçar o efeito benéfico que a actinidina tem na digestão de diferentes tipos de proteínas de baixa digestibilidade (52).

4 GLÚTEN

O glúten é a massa viscoelástica obtida após lavagem de massa de farinha de trigo com água, sendo constituído por 75-85% de proteína (prolaminas), 5-10% de gordura e quantidades vestigiais de amido e outros hidratos de carbono (55). Para além do trigo, o glúten também está presente em farinhas de outros cereais do género *Triticum*, como a cevada e o centeio. As proteínas maioritárias destas farinhas são as prolaminas (80%) que constituem o glúten, constituído pelos monómeros de gliadina (α/β , ω e γ - gliadina), solúveis em soluções de etanol 60%, e os polímeros insolúveis de glutenina LMW (baixo peso molecular) e HMW (elevado peso molecular) (56). Estas prolaminas estabelecem ligações intra e intermoleculares por pontes dissulfeto (embora a cisteína represente apenas 2% dos aminoácidos presentes no glúten), ligações intermoleculares por pontes de hidrogénio e ligações hidrofóbicas, permitindo a solubilização das gluteninas nas gliadinas com formação da malha única que é o glúten (55). O rácio entre estas proteínas e a forma como estão ligadas (Figura 8) determinam as propriedades do glúten, sendo as gliadinas responsáveis pela sua viscosidade e as gluteninas pela sua elasticidade (55). O glúten tem assim um papel fundamental nas propriedades reológicas e qualidade dos alimentos à base de trigo como são o pão, massas, bolos, etc. (55).

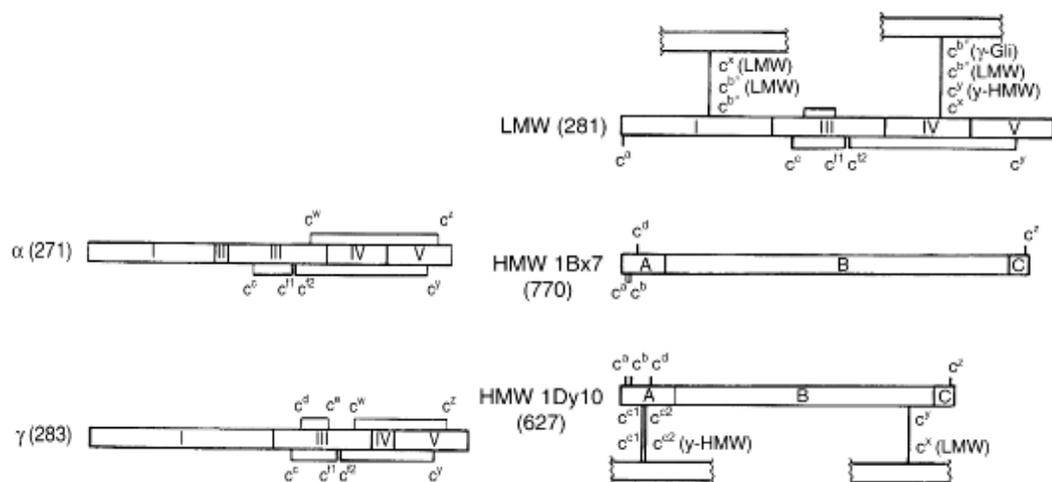


Figura 8 Pontes dissulfeto intramoleculares (α e γ - gliadina e x-HMW) e intermoleculares presentes no glúten. Fonte (55).

4.1 Composição

A composição de aminoácidos do glúten encontra-se na Tabela 2, onde se observa predominância de glutamina e prolina, daí a elevada hidrofobicidade do glúten. As gliadinas são agrupadas em α/β , ω e γ -gliadinas, sendo as α/β e γ -gliadinas maioritárias com peso molecular entre 28 e 35 kDa, sequências repetitivas de QPQFPQPYP e três pontes dissulfeto (α/β -gliadinas) e sequências repetitivas QPQQPFP e quatro pontes dissulfeto (γ -gliadinas); as ω -gliadinas podem ser $\omega 5$ ou $\omega 1,2$ -gliadina, têm peso molecular próximo de 50 e 40 kDa, respetivamente, e caracterizam-se pelo elevado teor de glutamina, prolina e fenilalanina e ausência de pontes dissulfeto, com sequências repetitivas de PQQPFPQQ (55). As gluteninas LMW encontram-se relacionadas com as α/β e γ -gliadinas na composição de aminoácidos e peso molecular, apresentando sequências repetitivas de QQQPPFS e as gluteninas HMW podem ser do tipo x-HMW ou y-HMW, ambas com três domínios: dois não repetitivos (domínios A e C) e um central repetitivo (domínio B), apresentando sequências QPQGQG, com inserções YYPTSP, QQP e/ou QPG e peso molecular entre 83 e 88 kDa (x-HMW) e entre 67 e 74 kDa (y-HMW) (55).

Tabela 2 Tipos de proteínas e aminoácidos presentes no glúten. Adaptado de (55).

Tipo	Massa Molecular $\times 10^3$	Percentagem*	Composição relativa de aminoácidos (%)			
			Gln	Pro	Tyr	Gly
ω 5-Gliadinas	49-55	3-6	56	20	9	1
ω 1,2-Gliadinas	39-44	4-7	44	26	8	1
α/β -Gliadinas	28-35	28-33	37	16	4	3
γ -Gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1
x-HMW	83-88	4-9	37	13	0	6
y-HMW	67-74	3-4	36	11	0	5
LMW	32-39	19-25	38	13	4	1

*Relativamente à proteína total do glúten

4.2 Alergia e intolerância

O glúten é uma proteína bastante estudada devido às suas propriedades reológicas únicas e por representar um dos grandes problemas da sociedade ocidental, devido às reações alérgicas e de intolerância que despoleta em muitos indivíduos. No primeiro caso, o que ocorre é o reconhecimento pelos anticorpos (IgE) do indivíduo alérgico de sequências de aminoácidos presentes no glúten, principalmente da sequência QXYPP em que X e Y são aminoácidos variáveis das gluteninas LMW, causando uma reação alérgica (dermatite atópica) pouco tempo após o contacto com alimentos ou outros produtos (fármacos, produtos de beleza) contendo glúten (57). A alergia ao glúten afeta 2% da população adulta dos países desenvolvidos em 2001, com tendência a aumentar (58). Quanto à intolerância (doença celíaca), a ingestão de glúten induz uma resposta imunitária inadequada no intestino que resulta na atrofia das microvilosidades, hiperplasia das criptas e consequente deficiência na absorção de nutrientes, assim como em doenças do foro psicológico, infertilidade, entre outras (59,60), sendo uma condição que afeta cerca de 1-2% da população mundial (60,61). A doença celíaca é definida por ser uma predisposição genética que alguns indivíduos têm de desencadear uma resposta inflamatória após o consumo e digestão de alimentos contendo glúten (59). Esta resposta depende da passagem dos péptidos não digeridos das gliadinas para a submucosa intestinal, onde são desamidados pela enzima transglutaminase tecidual (TGt). Esta é uma enzima omnipresente e multifuncional dependente de cálcio que, na submucosa intestinal, catalisa a desamidação seletiva (dependente do espaçamento Pro-Gln (62)) dos resíduos de glutamina presentes no glúten e seus péptidos parcialmente digeridos, com especificidade

para α/β e ω -gliadinas e a reação de transaminação entre os aminoácidos de gliadina desamidados e resíduos de lisina de outras proteínas ou entre as próprias endoaminas, com formação de complexos proteicos de elevado peso molecular (60). O elevado teor de prolina do glúten e em particular das gliadinas, dificulta a sua digestão e aumenta a afinidade dos péptidos não digeridos e desamidados para os recetores *human leukocyte antigen* (HLA) da classe II, presentes nas células apresentadoras de antígenos. Dois destes recetores (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) estão fortemente associados à doença celíaca, sendo um fator necessário mas não suficiente para a ocorrência da reação inflamatória desencadeada pela ingestão de alimentos contendo glúten, uma vez que 97% dos indivíduos diagnosticados expressam um ou ambos os alelos deste gene (59,60,62,63). A formação deste complexo de reconhecimento permite a ligação de células T-CD4+ (64), desencadeando uma resposta imunitária (60,62).

4.3 A dieta *gluten free*

Atualmente, ainda não é fácil manter uma dieta *gluten free* devido à dificuldade em obter alimentos de ocorrência natural que não tenham glúten (o glúten está presente em alimentos bastante comuns na dieta humana) e porque os níveis de glúten tolerados por indivíduos alérgicos e intolerantes ao glúten não se encontram estabelecidos, uma vez que variam de paciente para paciente. O Codex Alimentarius define como *gluten free* qualquer alimento que não contém glúten naturalmente ou alimentos em que os níveis de glúten se encontram dentro dos mínimos estabelecidos como seguros para indivíduos celíacos e que podem ser consumidos indefinidamente: 20 ppm em alimentos naturais ou 100 ppm quando alterados tecnologicamente (65).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de eliminar os problemas de alergia e intolerância associados ao glúten, principalmente por alteração do glúten com proteases (66–72), mas também por via da criação de fármacos inibidores da permeabilidade intestinal ou da TGt ou de vacinas (péptidos de glúten) indutoras de tolerância ao glúten (59). Em 1964 fez-se um estudo preliminar sobre o efeito da pré-incubação de glúten com papaína na sua digestão e no desenvolvimento de sintomas de intolerância (70) em que três pacientes celíacos foram sujeitos a dietas contendo glúten (9 g por dia) previamente digerido com papaína comercial ou extrato de papaína (2 g/100 g glúten e 40 g/100 g glúten, respetivamente), tendo-se observado efeito positivo na redução de sintomas aquando da suplementação com extrato de papaína. O mesmo não se observou quando a

pré-digestão do glúten se fez com papaína comercial. Os autores reportaram a existência de uma desamidase (glutamina ciclotransferase) nos extrato de papaína, responsável pela ausência de efeitos da doença celíaca nos pacientes testados (70). Mais tarde, outra protease vegetal foi utilizada com o intuito de reduzir a alergenicidade da farinha de trigo, a bromelaína (57). Nesse trabalho realizado em 1996, a incubação da massa de pão com bromelaína (10 mg/ g farinha) eliminou o efeito alergénico da sequência QXYPP responsável pelos sintomas observados em indivíduos alérgicos ao glúten, mostrando-se eficaz na hidrólise de ligações peptídicas próximas de resíduos de prolina. Os autores desenvolveram assim um pão hipoalergénico com propriedades sensoriais semelhantes à de *muffins* (57). Em 2009 testou-se a introdução de péptidos bloqueadores dos locais de desamidação; a ligação à gliadina impede a ligação da enzima TGt às sequências de desamidação, e o próprio péptido bloqueador não tem resíduos de glutamina (61). Verificaram redução da atividade enzimática da TGt após incubação de gliadina com os péptidos bloqueadores, embora o mesmo não tenha ocorrido quando os péptidos foram incubados com glúten.

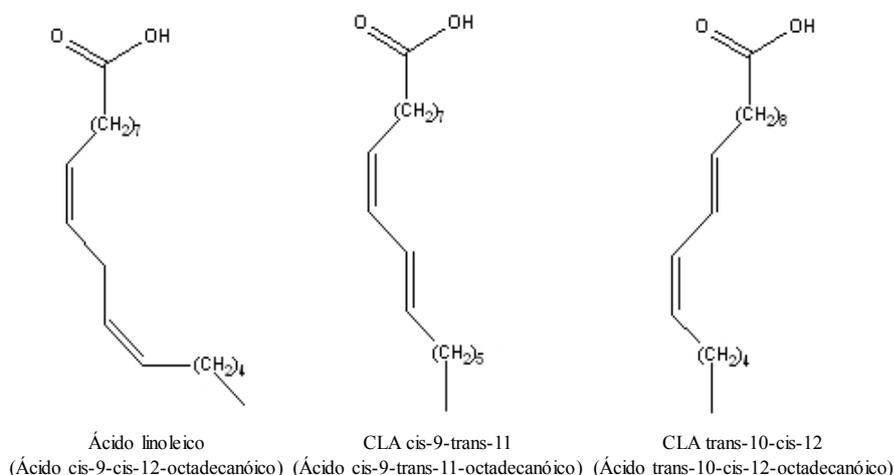


Figura 9 Ácido linoleico e seus conjugados.

Em 2011 estudou-se a via oxidativa da doença celíaca, tendo-se verificado a redução dos sintomas por suplementação de conjugados do ácido linoleico (CLA, Figura 9), a qual ativa a via Keap1-Nfr2, impedindo o ataque à homeostasia oxidativa responsável pela integridade das células do intestino pelos péptidos tóxicos de gliadina (73).

Apesar dos esforços, o único tratamento atualmente aplicado aos pacientes alérgicos e celíacos é a adoção de uma dieta *gluten free* (59,61,73), a qual acarreta mudanças

consideráveis na vida dos mesmos, uma vez a oferta continua a ser reduzida, os produtos *gluten free* têm elevado custo associado e a nível sensorial são de qualidade inferior aos produtos que contém glúten (61).

III. OBJETIVO

Pretende-se com este trabalho associar a redução dos desperdícios associados ao escoamento e processamento do kiwi à produção de hidrolisados de glúten através da pré-hidrólise do glúten extraído da farinha de trigo pela actinidina extraída do kiwi.

O facto de esta enzima ser solúvel, apresentar vasta especificidade para aminoácidos hidrofóbicos e básicos e atividade enzimática moderada numa vasta gama de temperatura e pH, assim como o efeito positivo que a suplementação com actinidina na digestão gastrointestinal de glúten descrito na literatura permitem supor a ocorrência de hidrólise em aminoácidos importantes para o reconhecimento de sequências específicas relacionadas com a alergia e a intolerância ao glúten.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1 Amostras

1.1 Kiwis

Os kiwis foram utilizados para obtenção de extratos não purificados ricos em proteína e com elevada atividade enzimática, tendo-se numa primeira fase do trabalho testado quatro condições de extração com kiwis *A. deliciosa* var. ‘Hayward’ gentilmente cedidos pela Kiwicoop - Cooperativa Frutícola da Bairrada, C.R.L. em meados de Outubro de 2013, após colheita, os quais foram transportados para a Universidade de Aveiro, onde ficaram armazenados a 4 °C. Apresentavam massa média de 90 g, pH 3 e °Brix 16. O extrato não purificado de actinidina foi posteriormente obtido diretamente do sumo a partir de kiwis *A. deliciosa* var. ‘Hayward’ produzidos pela Kiwicoop, adquiridos numa superfície comercial na cidade de Aveiro em meados de Abril de 2014, tendo ficado armazenados a 4 °C até ao momento de extração. Estes kiwis apresentavam massa média igual a 70 g, pH 3 e °Brix 13.

1.2 Glúten

Utilizaram-se duas amostras de glúten, uma hidratada e uma liofiliza, ambas obtidas a partir de farinha de trigo tipo 65 para usos culinários Nacional (Tabela 3). O glúten hidratado foi obtido a partir de 105 g de farinha à qual se adicionou água até obter uma massa viscoelástica, tendo-se de seguida lavado a massa obtida com água de modo a eliminar o amido, albuminas e globulinas. O glúten liofilizado foi obtido da mesma forma, a partir de 100,7 g de farinha. Obtiveram-se 30 g de glúten hidratado e 9,018 g de glúten seco, o qual foi reduzido a pó utilizando um moinho de café.

Tabela 3 Tabela nutricional da farinha de trigo tipo 65 para usos culinários Nacional

<u>Valores médios por 100 g de produto</u>	
Valor energético	346 kcal/1450 kJ
Proteínas	10 g
Hidratos de carbono	73 g
dos quais açúcares	2,5 g
Lípidos	1,5 g
dos quais saturados	0,4 g
Fibras alimentares	3,3 g
Sódio	< 0,01 g

1.3 Extrato de actinidina

O extrato não purificado de actinidina (EAct) utilizado nos ensaios preliminares foi obtido no ano letivo 2010/2011 a partir de 647,2 g de casca de 50 kiwis *A. deliciosa* var. 'Hayward' gentilmente cedidos pela Kiwicoop. As cascas foram homogeneizadas, filtradas, e o seu volume reduzido a metade por liofilização seguindo-se precipitação de proteína obtida por *salting out* com uma solução saturada de sulfato de amónio. A amostra foi posteriormente centrifugada (5000 rpm, 20 minutos, 4 °C, Sigma Laboratory Centrifuges 3K30) e o resíduo suspenso em tampão fosfato de potássio 0,01 M e dialisado contra o mesmo tampão. Este extrato foi liofilizado tendo ficado armazenado à temperatura ambiente.

1.4 Extrato de papaína

Como controlo positivo dos ensaios enzimáticos utilizou-se um extrato de papaína comercial (Sigma-Aldrich) (ECPap) com teor de proteína $\geq 80\%$, determinada pelo método do Biureto e atividade enzimática específica de 0,9 U, determinada por hidrólise de etanoato de N- α -benzoil-L-arginina, sendo que uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 μmol de substrato por minuto a 25 °C e pH 6,2.

2 **Extração de proteína solúvel**

Procedeu-se à extração de proteína solúvel com o objetivo de obter um extrato não purificado rico em proteína e com elevada atividade enzimática. Numa fase inicial do trabalho foram testadas quatro condições de extração (Tabela 4 e Figura 10). Para cada extração um kiwi inteiro foi lavado e homogeneizado num liquidificador. Na extração a partir do sumo, a polpa obtida foi centrifugada (Sigma Laboratory Centrifuges 3K30) três vezes: uma a 4000 rpm e duas a 8000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C. Nas extrações com água destilada (pH 6), com tampão citrato de sódio (pH 5) e com tampão carbonato sódio (pH 9), a extração deu-se sob agitação na proporção 1:2 (m/v) durante 2 horas. As suspensões obtidas foram centrifugadas como descrito para a extração sem adição de solvente. Os extratos obtidos foram filtrados com pano de *nylon* para remover partículas em suspensão e a proteína solúvel foi extraída por *salting out* com uma solução saturada de sulfato de amónio a 60%. Esta solução, que deve ser adicionada lentamente e com agitação

constante para evitar a formação de pontos de elevada concentração do sal, induz um aumento na força iónica, que por sua vez resulta no aumento das interações proteína-proteína, redução da sua solubilidade e precipitação. A mistura obtida foi centrifugada (10000 rpm, 20 minutos, Sigma Laboratory Centrifuges 3K30), os sobrenadantes descartados e os precipitados ricos em proteína e em sais de amónio foram suspensos no respetivo tampão de extração (no caso da extração a partir do sumo e com água, os precipitados foram suspensos em tampão fosfato de potássio) com concentração 0,01 M e extensivamente dialisados contra o mesmo tampão. Os extratos proteicos obtidos foram liofilizados e armazenados para determinação de proteína total e de atividade enzimática. Sempre que possível trabalhou-se a 4 °C.

Tabela 4 Condições de extração utilizadas para obtenção do extrato rico em actinidina.

	Sumo	Citrato 0,1 M	Água	Carbonato 0,1 M
pH	3	5	6	9
Kiwi (g)	85,6	91,7	92,2	86,2
Extrato (mL)	22,0	212,0	222,0	202,0

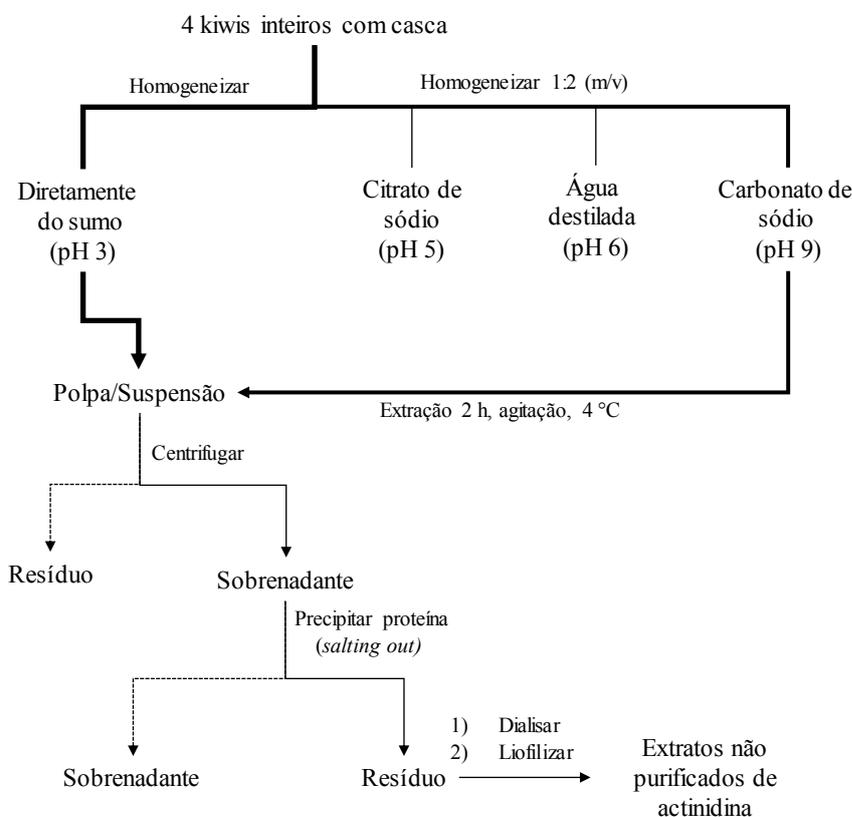


Figura 10 Fluxograma do procedimento de extração de actinidina em quatro condições: diretamente do sumo e com tampão citrato de sódio, água e tampão carbonato de sódio.

Posteriormente obteve-se um extrato não purificado de actinidina diretamente do sumo (ACTsumo) a partir de 3845 g de kiwis, os quais foram lavados, secos e homogeneizados num liquidificador. A polpa obtida foi centrifugada (10000 rpm, 20 minutos, 4 °C, Sigma Laboratory Centrifuges) tendo-se armazenado o sumo de kiwi (2000 mL). A proteína foi precipitada por *salting out* com sulfato de amónio a 60%. O precipitado obtido foi suspenso em tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 6,8, extensivamente dialisado contra o mesmo tampão, e liofilizado. Sempre que possível trabalhou-se a 4 °C.

3 Determinação de proteína solúvel total pelo método do BCA

A concentração de proteína solúvel total foi determinada pelo método do BCA (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit*; Sigma Aldrich) (74) o qual assenta no mesmo princípio de outros métodos colorimétricos como o de Biureto, Lowry e Bradford, com a vantagem de ser mais específico numa gama de 200-1000 µg/mL. Neste método forma-se um complexo de cor verde entre a ligação peptídica e iões de cobre (II) em condições alcalinas, o que promove a redução do cobre (II) a cobre (I) e posterior complexação deste com o ácido bicinonínico na proporção de 1:2, com a formação de um cromóforo roxo bastante estável com máximo de absorvância a 562 nm (75). Uma vez que a quantidade de cobre reduzido é diretamente proporcional à concentração de proteína, é possível determinar a concentração de proteína solúvel presente numa amostra espectrofotometricamente, por correlação com a reta de calibração obtida para albumina de soro bovino (BSA), numa gama de concentrações de 0-1000 µg/mL em função da sua absorvância a 562 nm. Utilizou-se o procedimento padrão, com algumas alterações, em que a 50 µL da solução de extrato de proteína (1 mg/mL em tampão de diálise) ou BSA (0-1000 µg/mL em 0,15 M NaCl diluída com o mesmo tampão da amostra) foi adicionado 1 mL de reagente BCA (obtido por adição da solução contendo ácido bicinonínico em meio alcalino à solução contendo o ião de cobre (II) na proporção 50:1), seguindo-se incubação num banho a 60 °C durante 15 minutos, arrefecimento à temperatura ambiente e leitura de absorvância a 562 nm. Fizeram-se triplicados das amostras e dos padrões de BSA.

4 Determinação de atividade enzimática pelo método da azocaseína

O método da azocaseína foi desenvolvido em 1947 por Charney e Tomarelli (76). Este é uma adaptação do método que utiliza caseína como substrato, sendo que neste caso a

caseína se encontra covalentemente ligada ao grupo sulfonilamida, o que confere ao substrato uma coloração alaranjada. Assim, a digestão da azocaseína por enzimas proteolíticas leva à liberação de compostos cor de laranja solúveis em ácido tricloroacético (TCA) com máximo de absorvância a 440 nm, o que permite aumentar a sensibilidade do método inicial com caseína (77). A intensidade da cor é diretamente proporcional à atividade da enzima, a qual se definiu como a quantidade de proteína (uma vez que o método do BCA não permite quantificar a enzima, mas sim a proteína solúvel presente no extrato) que leva à alteração de absorvância em 0,01 unidades por minuto, nas condições do ensaio. Fizeram-se triplicados de todas as leituras.

Para determinação da atividade enzimática do EAct e ECPap, adicionaram-se 50 µL de solução enzimática 1 mg/mL em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6 a 500 µL de solução de azocaseína 1,5 mg/mL no mesmo tampão com 2 mM de ditioneitol (DTT) e 5 mM de L-cisteína (L-Cys) (agentes redutores que induzem a forma ativa da enzima e evitam a formação de agregados proteicos) e incubou-se durante 15 minutos num banho a 37 °C. A reação foi parada por adição de 550 µL de TCA concentrado, seguindo-se centrifugação (8000 rpm, 6 minutos, Denver Instruments Force 7) e leitura da absorvância do sobrenadante a 440 nm. Para determinação de atividade enzimática dos extratos obtidos em quatro condições de extração e do ACTsumo procedeu-se do mesmo modo, com algumas alterações, as soluções enzimáticas foram preparadas a 2 mg/mL em tampão fosfato de potássio 30 mM, pH 6,8 e a incubação com azocaseína deu-se durante 10 minutos.

5 Estudo da cinética enzimática

Fez-se um estudo do comportamento enzimático dos extratos obtidos em quatro condições de extração como acima descrito para a determinação da sua atividade enzimática, tendo-se alterado o tempo de incubação de 10 minutos para 60 minutos, com leituras de absorvância de 10 em 10 minutos. Como controlo positivo utilizou-se uma solução de ECPap 2 mg/mL em tampão fosfato de potássio 30 mM, pH 6,8.

6 Zimografia

A atividade enzimática do ACTsumo foi avaliada por zimografia, com o objetivo de estudar o efeito da concentração de enzima e do pH na sua atividade. A zimografia é uma

técnica que associa a separação de proteínas por SDS-PAGE ao estudo de atividade enzimática através da polimerização do gel de corrida na presença de um substrato da enzima, normalmente gelatina, e posterior incubação num tampão adequado à sua hidrólise pela protease em estudo. A atividade proteolítica é observada no gel de poliacrilamida digerido na forma de bandas claras num fundo azul (78). O gel de separação preparou-se a 10% com 0,1% de gelatina, a partir de soluções *stock* de acrilamida a 40% e bis-acrilamida a 2%, em tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 com APS 0,05% e TEMED 0,025% para catalisar a polimerização do gel. O gel de empacotamento preparou-se a 4% em tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 6,8 com APS 0,025% e TEMED 0,01%. O tampão de amostra continha Tris-HCl 0,033 M, pH 6,8, SDS 5%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,01%, tendo-se aplicado 5,10 e 15 µL de ACTsumo 1 mg/mL para a análise a pH 6 e 15 µL para as análises a pH 3 e 8. Usou-se o marcador Fisher BioReagents BP 3603. A eletroforese decorreu a 120 V durante 1 hora e 30 minutos em tampão de corrida (Tris 0,100 M, bicina 0,100 M e SDS 0,1%). Após a eletroforese, os géis foram incubados em tampão de renaturação (Triton X-100 2,5% (v/v) durante 1 hora à temperatura ambiente para de seguida serem transferidos para o respetivo tampão de desenvolvimento (tampão citrato de sódio 0,067 M para pH 3 e Tris 0,067 M para pH 6 e 8) com 5 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, 4 mM DDT, 10 mM L-Cys e 0,02% (v/v) Triton X-100, seguindo-se incubação durante a noite a 37 °C com agitação. O Triton X-100 é um detergente não iónico que promove a renaturação da enzima por troca com o SDS da eletroforese. As bandas claras resultantes da atividade proteolítica da actinidina foram observadas depois de corar os géis com *Comassie Blue* R250 em etanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) durante 4 horas com agitação suave e descorá-los com uma solução de etanol a 25% (v/v) e ácido acético a 5% (v/v).

7 Hidrólise do glúten com cisteína proteases

Fizeram-se três ensaios preliminares para o estudo da hidrólise do glúten com EAct e ECPap, como resumido na Tabela 5: dois ensaios com ECPap a partir de soluções mãe de 0,100 mg/mL e 1,064 mg/mL (ECPap 0,1 e ECPap 1,0, respetivamente) e um com EAct a partir de uma solução mãe de 1,044 mg/mL (EAct 1,0), em tampão fosfato de potássio 25 mM e pH 6. A uma porção de extrato hidratado de glúten (cerca de 3 g) adicionaram-se 10 mL de solução enzimática e 10 mL ou 20 mL de tampão fosfato de potássio 0,025 M, pH

6, tendo a reação decorrido durante 22 horas a 37 °C sob agitação. Após a incubação, a enzima foi inativada a 4 °C e as misturas foram posteriormente centrifugadas (1500 rpm, 20 minutos, 4 °C). Separou-se o sobrenadante (Sn) do resíduo (Res) e ambas as frações de cada ensaio foram liofilizadas, tendo sido armazenadas para análises futuras. Fez-se um branco (B) para cada um dos três ensaios em que a solução enzimática foi substituída pelo mesmo volume de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6.

Tabela 5 Condições experimentais em que se deram os ensaios enzimáticos para o estudo do efeito de proteases cisteínicas no glúten.

	ECPap U/mg = 4,39 *		EAct U/mg = 1,11 *
Solução enzimática (mg/mL)	0,100	1,064	1,044
Solução tampão (mL)	10,0	20,0	20,0

* Actividade enzimática específica determinada pelo método da azocaseína.

Posteriormente fez-se um estudo otimizado do efeito da actinidina no glúten. Utilizou-se a amostra de glúten liofilizado e o ACTsumo, tendo-se incubado a 37 °C, sob agitação. Testaram-se três tempos de incubação, 1, 2 e 24 horas, e três concentrações de proteína, 0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL. Para cada concentração de proteína e tempo de incubação, pesaram-se 20 mg de glúten em tubos de cultura, 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6, e 1 mL de solução enzimática preparada no mesmo tampão, o qual continha 0,02% de azida de sódio para impedir o crescimento microbiano. Os ensaios foram realizados em triplicado e prepararam-se três brancos, um para cada tempo de incubação, em que se substituiu a solução de enzimática pelo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6. Após a incubação, a enzima foi inativada num banho de gelo durante 30 minutos, seguindo-se centrifugação (4000 rpm, 30 minutos, Kubota 2010). Separou-se o sobrenadante do resíduo e ambas as frações foram liofilizadas e armazenadas para análise das respectivas frações hidrolisadas.

7.1 Análise dos hidrolisados proteicos por espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR)

Analisaram-se os resíduos e sobrenadantes dos hidrolisados enzimáticos e um dos brancos obtidos nos ensaios preliminares por FTIR, com o objetivo de obter uma caracterização geral dos hidrolisados e observar as alterações na banda relativa a proteína resultantes da incubação do glúten hidratado com ECPap e EAct. Os espectros foram

obtidos num espectrómetro Brüker IFS 55 Golden Gate Specac IFS 55 com 5 mm de abertura e detetor DTGS, com resolução 8 cm^{-1} e 64 scans na região do infravermelho médio.

7.2 Análise de aminoácidos das frações hidrolisadas de baixo peso molecular por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID)

A análise de aminoácidos dos sobrenadantes obtidos nos ensaios preliminares fez-se segundo Zumwalt (79), para a hidrólise ácida, e segundo MacKenzie (80), para a derivatização dos aminoácidos, com o objetivo de estudar a composição dos aminoácidos livres e em ligação peptídica presentes nas amostras. Resumidamente, a 5,00 mg de cada uma das amostras liofilizadas adicionaram-se 500 μL de padrão interno (norleucina 5,0 $\mu\text{mol/mL}$ em HCl 0,1 M). No caso das amostras destinadas à análise de aminoácidos totais procedeu-se à sua hidrólise ácida antes da adição do padrão interno em atmosfera de azoto por adição de 1 mL de HCl 6 M e incubação a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. As amostras foram levadas à secura no evaporador centrífugo *Speedvac*, dissolvidas em 1 mL de HCl 0,1 M e filtradas com filtros de 0,45 μm (LG-Syringue filters, CA, 0,45 μm , \varnothing 25 mm, yellow, steril) sendo novamente levadas à secura no evaporador centrífugo *Speedvac*. Os grupos carboxílicos dos aminoácidos foram convertidos nos respetivos ésteres isobutílicos por adição de 400 μL de isobutanol-HCl e incubação a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 minutos, seguindo-se arrefecimento e evaporação do reagente em excesso no evaporador centrífugo *Speedvac*. Os grupos amina foram convertidos em derivados N-heptafluorobutíricos pela adição de 100 μL de anidrido heptafluorobutírico seguindo-se 10 minutos de incubação a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ em condições antioxidantes (por adição prévia de hidroxitolueno butilado (BHT)) e evaporação do excesso no evaporador centrífugo *Speedvac*. Por fim os derivados de éster isobutil-N-heptafluorobutíricos dos aminoácidos livres e totais foram dissolvidos em 50 μL de acetato de etilo e analisados por GC-FID (injeção de 2 μL). A análise cromatográfica deu-se num cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400, tendo-se utilizado uma coluna DB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,1 μm de espessura de filme) J&W Scientific, Agilent Technology EUA com velocidade linear do gás de arraste (hidrogénio), em modo *splitless*. A temperatura do injetor foi programada para $250 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo a temperatura inicial do forno igual a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, aumentando numa rampa de $2 \text{ }^\circ\text{C/min}$ até $170 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo-se uma rampa de $16 \text{ }^\circ\text{C/min}$ até $250 \text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo a esta temperatura

durante 5 minutos. O detetor foi mantido a 260 °C e a corrida deu-se durante 60 minutos. A concentração dos aminoácidos foi calculada de acordo com a seguinte expressão

$$\left(\frac{A \text{ amostra}}{A \text{ PI}} \right) \times \left(\frac{[PI]}{fr} \right)$$

em que *A* representa área, *PI* o padrão interno e *fr* o fator de resposta dos aminoácidos Ala, Gly, Val, Thr, Ser, Leu, Pro, Asx, Phe, Glx, Lys, Tyr e Arg, obtidos por calibração a partir de soluções de concentração conhecida dos referidos aminoácidos. Fizeram-se duplicados para todas as amostras, tendo-se escolhido como branco o obtido aquando do ensaio com papaína 0,100 mg/mL.

7.3 Análise de proteínas presentes nas frações hidrolisadas de elevado e baixo peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As proteínas presentes nos resíduos e sobrenadantes obtidos nos ensaios preliminares foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não nativas, na presença do detergente aniónico dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) com o objetivo de identificar diferenças no perfil eletroforético do glúten nativo relativamente ao glúten sujeito a hidrólise enzimática e identificar o tipo de proteínas presentes nos sobrenadantes. A eletroforese é uma técnica de separação e identificação de macromoléculas com base na sua velocidade de migração quando aplicadas num gel de poliacrilamida e sujeitas a um potencial elétrico. É uma metodologia com vasta aplicabilidade no estudo de proteínas uma vez que torna possível estimar o número de proteínas presentes numa amostra, assim como o seu peso molecular, número de subunidades, pI e pureza, dependendo das condições de eletroforese (78,81). O SDS é um detergente aniónico que se liga às proteínas na razão de 1:3 (78), alterando a sua conformação nativa e conferindo-lhes a mesma forma e carga negativa, o que permite separar proteínas apenas com base no seu peso molecular (81). No gel de empacotamento, forma-se um gradiente entre os iões Cl⁻ com elevada carga negativa e a glicina presente no tampão de corrida, com poucas cargas negativas (pI 5,97), permitindo o empacotamento das proteínas numa única banda, a qual se separa em bandas discretas após entrada no gel de corrida, uma vez que a pH 8,8, a glicina apresenta mais cargas negativas, o que elimina o gradiente entre os iões Cl⁻ e a glicina (82).

Realizou-se uma eletroforese em condições não-nativas num sistema Bio-Rad mini-protean para SDS-PAGE, segundo o protocolo inicialmente desenvolvido pelo bioquímico suíço Ulrich K. Laemmli (78,83), com pequenas alterações. O gel de separação preparou-se a 20% para os resíduos e a 15% para os sobrenadantes, a partir de soluções *stock* de acrilamida a 40% e bis-acrilamida a 2%, em tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8. O gel de empacotamento preparou-se a 4% em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. A polimerização da acrilamida com a bis-acrilamida para formação do gel de eletroforese é uma reação radicalar, catalisada pela adição de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED 0,05%), sendo o persulfato de amónia (*amonium persulphate*, APS 0,05%) a fonte de radicais livres. O tampão de amostra foi Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 com SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,01%, tendo-se aplicado 13 μ L (50 μ g proteína) para a análise eletroforética dos resíduos e 20 μ L (20 μ g proteína) para análise dos sobrenadantes após incubação durante 5 minutos a 100 °C. O tampão de corrida continha Tris 0,025 M, pH 8,6 com glicina 0,192 M e SDS 0,1% e utilizou-se o marcador Fisher BioReagents BP 3603 para os resíduos e GE Healthcare LMW para os sobrenadantes. A eletroforese deu-se a 150 V durante 1 hora e 30 minutos. Após a eletroforese os géis foram corados com *Comassie Blue* R250 tendo ficado sob agitação na solução corante durante a noite, e posteriormente transferidos para a solução descorante (20% metanol (v/v) e 7% ácido acético (v/v)) durante cerca de 2 horas.

As frações obtidas nos ensaios otimizados com ACTsumo foram analisadas por SDS-PAGE como acima descrito, com algumas alterações. Os géis foram preparados a 15% para a análise dos resíduos e a 20% para a análise dos sobrenadantes, o tampão de amostra dos resíduos continha ureia 8 M e o marcador de peso molecular utilizado foi GE Healthcare LMW. A eletroforese deu-se a 150 V durante 1 hora e 30 minutos. Após a eletroforese os géis foram corados com *Comassie Blue* R250 tendo ficado na solução corante durante a noite sob agitação, e posteriormente transferidos para a solução descorante durante cerca de 3 horas.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Proteína solúvel total e atividade enzimática

As determinações de proteína total pelo método do BCA e de atividade enzimática pelo método da azocaseína mostraram que o EAct obtido a partir das cascas do kiwi é um extrato rico em proteína, com 86,04%, e que a actinidina aí presente mantém a sua atividade enzimática, com atividade específica igual a 1,11 U/mg (Tabela 6).

Tabela 6 Atividade enzimática da papaína comercial e EAct determinada pelo método da azocaseína (pH 6,5) após incubação durante 15 minutos a 37 °C.

	ECPap	EAct
% proteína	≥80	86,04
mg/mL	1,012	1,044
U/mg	4,39*	1,11

*Para determinação de atividade enzimática específica considerou-se 80% proteína

Determinou-se a atividade enzimática do ECPap com o objetivo de ter uma medida de comparação entre as proteases, uma vez que não foi possível determinar a atividade enzimática do EAct nas mesmas condições que as descritas pelo fabricante para o ECPap. Determinou-se a atividade enzimática do ECPap pelo mesmo método. Verifica-se que a papaína é cerca de quatro vezes mais ativa do que a actinidina presente no EAct, com uma atividade específica de 4,39 U/mg, o que está de acordo com o descrito na literatura (41,44).

Os resultados obtidos nos ensaios realizados aos extratos obtidos diretamente do sumo, com tampão citrato de sódio 0,1 M a pH 5, com água destilada a pH 6 e com tampão carbonato de sódio 0,1 M a pH 9, na proporção 1:2 (m/v) são apresentados na

Tabela 7.

Tabela 7 Extração de proteína solúvel a partir do kiwi inteiro em quatro condições distintas; massa dos extratos obtidos, sua concentração em proteína solúvel e atividade enzimática específica.

	Sumo	Citrato 0,1 M	Água	Carbonato 0,1 M
Kiwi (g)	85,6	91,7	92,2	86,2
Extrato proteico (mg)	62,76	595,59	142,19	211,62
Proteína (mg/100 mg de extrato)	95,30	53,43	86,12	62,75
Atividade enzimática específica(U/mg)	14,59	2,68	3,58	0,58

Verifica-se que a massa dos extratos obtidos difere bastante, dependendo das condições em que se deu a extração, com valores entre os 0,73 mg/g kiwi para a extração diretamente do sumo e os 6,49 mg/g kiwi para a extração com tampão citrato de sódio 0,1 M. As extrações com água e com tampão carbonato de sódio 0,1 M resultaram em 1,54 mg/g kiwi e 2,45 mg/g kiwi, respetivamente. No que diz respeito à concentração de proteína solúvel e respetiva atividade enzimática específica, obteve-se um extrato com 95% de proteína e 14,59 U/mg na extração diretamente do sumo, 86% de proteína com 3,58 U/mg para a extração com água, 63% de proteína com 0,58 U/mg para a extração com tampão carbonato e por fim 53% de proteína com 2,68 U/mg para a extração com tampão citrato. A quantificação de proteína solúvel e de atividade enzimática do extrato ACTsumo, obtido a partir de 3845 g de fruto fresco mostrou um teor proteico de 76,4% e atividade enzimática igual a 1,31 U/mg.

A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com o de outros trabalhos em que se procedeu à extração de actinidina (Tabela 8) é difícil tendo em conta a grande diversidade de procedimentos e resultados obtidos, quer para a extração, quer para a determinação da atividade enzimática do extrato obtido, o que torna evidente a dificuldade em comparar estes resultados com os descritos na literatura. Por exemplo, em dois trabalhos realizados recentemente, a actinidina foi extraída em três condições distintas, à semelhança do que se descreve neste trabalho. Um deles extraiu actinidina a pH 3, 5 e 9 tendo verificado que o extrato que apresentava maior atividade enzimática era o obtido a pH 9 (20), ao contrário do que se observa com este trabalho em que a extração a pH 9 foi a que resultou num extrato com menor atividade enzimática. Outro trabalho procedeu à extração com SDS a quente, *salting out* e tampão para SDS-2DE, tendo observado que o método por *salting out* era o mais simples e reprodutível (24), o que vai de encontro ao observado neste trabalho. Considera-se que, para aplicações alimentares, não existe necessidade de purificação dos extratos obtidos (32).

Os resultados obtidos devem ser validados e os protocolos otimizados, no entanto, tendo em conta que a actinidina é uma enzima solúvel e que se encontra ativa no fruto, o facto de o extrato com maior percentagem de proteína e atividade enzimática específica ser o obtido por *salting out* da mesma a partir do sumo do kiwi não é um resultado inesperado.

Tabela 8 Resumo de condições de extração descritas na literatura para obtenção de extratos de actinidina.

Kiwi	Extração	pH	Extrato (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade enzimática	Substrato	Referência
Sem casca	Polpa + centrifugação (10000 rpm 15 min)	4	-	-	1,35 U/mL	Etanoato de N- α -benzoil-L-arginina	(33)
1 kg, com casca	Citrato de sódio 0,05 M pH 5,5 + sulfato de amônio 65% + centrifugação (1500 g 10 min) + diálise	5	20	3,48	0,9 U/mL	Hemoglobina	(49)
80 g, inteiro	Fosfato de potássio 0,01 M pH 7 1:1 (m/v) + centrifugação (40000 g 20 min)	7	-	-	2,5 U/mg	Azocaseína	(21)
	Citrato de sódio 0,1 M pH 5 1:2 (m/v) + centrifugação (13400 g 20 min) + purificação*	5	300	0,13	0,46 mg/mL		
15 g	Fosfato de potássio 0,1 M pH 7 1:2 (m/v) + centrifugação (13400 g 20 min)	7	-	-	0,25 mg/mL	Caseína	(20)
	Bicarbonato de amônio 0,1 M pH 9 1:2 (m/v) + centrifugação (13400 g 20 min) + purificação*	9	-	-	0,62 mg/mL		
Inteiro	Tetracionato de sódio 0,01 M com EDTA 0,001 M (1 L / kg) + centrifugação (15000 g 30 min) + sulfato de amônio 60% + centrifugação (15000 g 30 min) + diálise + purificação **	5,5	-	10	85,6 U/mg	Etanoato de N- α -benzoil-L-arginina	(50)

* Cromatografia de troca iônica (coluna SP-Sephadex C-50) + diálise + cromatografia (coluna QAE-Sephadex A-50 eluída com gradiente de pH 5 a 2,5).

** Cromatografia de troca iônica (coluna DEAE-Sephadex Fast Flow com gradiente NaCl 0 a 0,5 M).

2 Cinética enzimática

Realizou-se o estudo da cinética enzimática dos extratos obtidos após extração em em quatro condições distintas com o objetivo de monitorizar e comparar a atividade enzimática da actinidina presente em cada extrato, tendo-se utilizado ECPap como controlo positivo. A Figura 11 representa a quantidade de azocaseína hidrolisada (máximo de absorvância a 440 nm) por miligrama de proteína ao longo de 60 minutos de incubação a 37 °C e pH 6,8. É possível observar que a actinidina extraída diretamente do sumo é a que se encontra mais ativa, hidrolisando em média o que corresponde a 1,43 unidades de absorvância por miligrama de proteína. Esta amostra também apresenta um perfil de hidrólise enzimática semelhante ao da papaína, cuja média registada foi 1,87 unidades de absorvância por miligrama de proteína. A actinidina obtida com água também se mostrou bastante ativa, com uma média de 0,678 unidades de absorvância por miligrama de proteína e a actinidina extraída com citrato de sódio e carbonato de sódio são as que se encontram menos ativas, com média de 0,165 e 0,074 unidades de absorvância por miligrama de proteína, respetivamente.

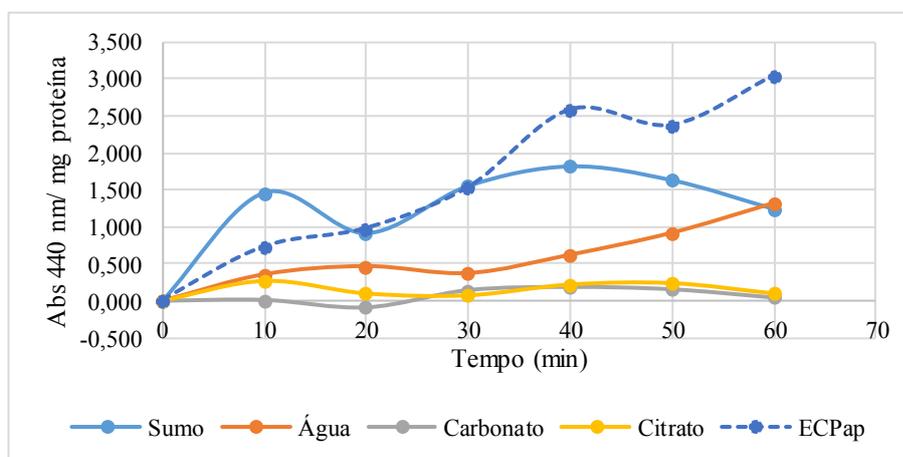


Figura 11 Representação gráfica da digestão de azocaseína 1,5 mg/mL durante incubação com extratos não purificados de actinidina e ECPap durante 60 minutos.

Uma vez que esta enzima se encontra associada a funções de defesa no fruto (19,28,50), as diferenças observadas devem estar relacionadas com o *stress* induzido pela alteração das condições fisiológicas em que a enzima se encontra naturalmente, o que a pode ter ativado e/ou desnaturado a enzima. Para além disso, durante as duas horas de extração da proteína solúvel presente no kiwi, a actinidina, que já se encontra disponível no

sumo e representa 50% da proteína solúvel pode interagir com outras proteases, com inibidores da sua atividade enzimática, pode sofrer auto proteólise, oxidação, entre outros eventos que tornam as enzimas biomoléculas tão suscetíveis à desnaturação (77).

3 Zimografia

Avaliou-se o efeito do pH e da concentração na atividade enzimática no extrato ACTsumo recorrendo a uma zimografia a pH 3, 6 e 8 e com 5, 10 e 15 µg de proteína. A Figura 12 apresenta os resultados obtidos onde é possível observar duas bandas digeridas em todos os ensaios realizados, uma mais intensa com cerca de 22 kDa, a qual foi identificada como a forma ativa madura da actinidina, e outra de menor intensidade, com cerca de 34 kDa, identificada como N-preactinidina (28,30,84). As duas bandas observadas podem igualmente representar uma outra protease, uma leucilaminopeptidase com máxima atividade a pH alcalino e duas isoformas, a qual foi recentemente identificada e caracterizada por ensaios bioquímicos específicos para aminopeptidases tendo-se concluído que se trata de uma metaloprotease dependente do grupo tiol presente essencialmente nas sementes do fruto, mas também no córtex e pericarpo (32), ou ainda uma mistura das duas proteases, já que o tampão de desenvolvimento utilizado continha os cofatores necessários à atividade de metaloproteases e cisteína proteases.

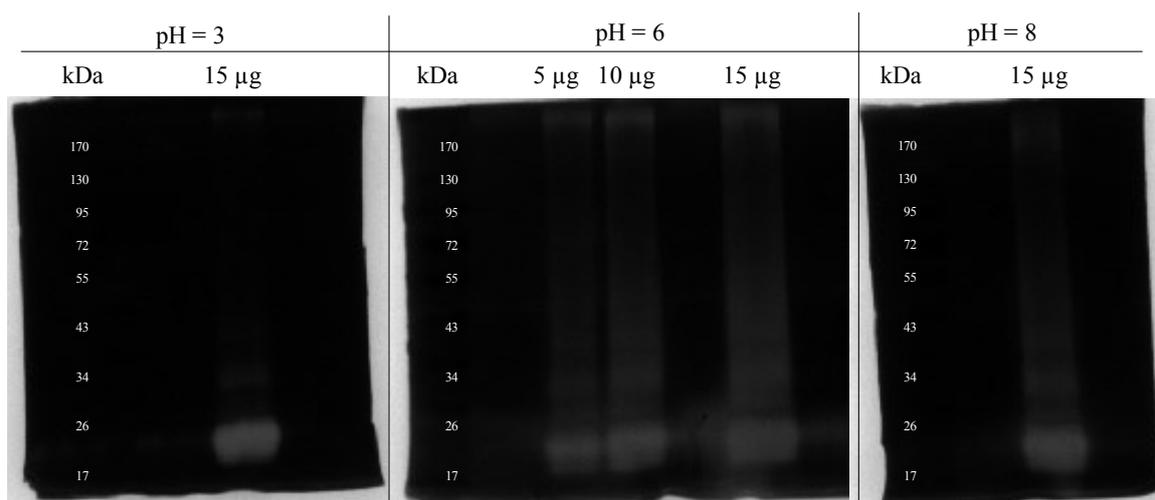


Figura 12 Zimografia do extrato de actinidina com desenvolvimento a pH 3, 6 e 8.

Também é possível observar que as bandas digeridas a pH 3 apresentam intensidades distintas às observadas a pH 6 e 8. As diferenças observadas podem estar relacionadas com o facto de a pH 3 as isoformas ácidas e básicas da actinidina se encontram com a mesma carga (positiva), já que o pI das isoformas ácidas é 4 e das isoformas básicas 9. A pH 6 e 8 as isoformas ácidas e básicas apresentam cargas contrárias, o que sugere que as enzimas são mais ativas nesse caso, já que os géis obtidos a pH 6 e 8 são semelhantes, com bandas mais largas. Por outro lado, as diferenças observadas podem estar relacionadas com a presença da aminopeptidase com atividade máxima a pH alcalino.

Verifica-se que foram extraídas enzimas proteolíticas com massa molecular distinta que são ativas numa vasta gama de pH e cuja extensão da hidrólise se relaciona com a quantidade de enzima presente, sendo tanto mais extensa quanto maior a sua concentração, como seria de esperar.

4 Hidrólise de glúten com cisteína proteases

4.1 Análise dos hidrolisados proteicos por FTIR

Os resíduos, sobrenadantes e um dos brancos o foram analisados por FTIR na região do infravermelho médio para obter uma caracterização geral dos mesmos. Na Figura 13 apresentam-se os espectros FTIR das amostras analisadas. De um modo geral, é possível observar que os espectros dos resíduos e dos sobrenadantes apresentam picos característicos da presença de proteína, com picos na região Amida I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$), Amida II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) e Amida III ($1400\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) (85,86), como seria de esperar, uma vez que são hidrolisados de glúten. A principal diferença entre os espectros dos resíduos e os dos sobrenadantes é a presença de picos característicos da presença de lípidos ($\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$ resultantes do alongamento de grupos H_2 (CH_2), ésteres ($\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$ resultantes

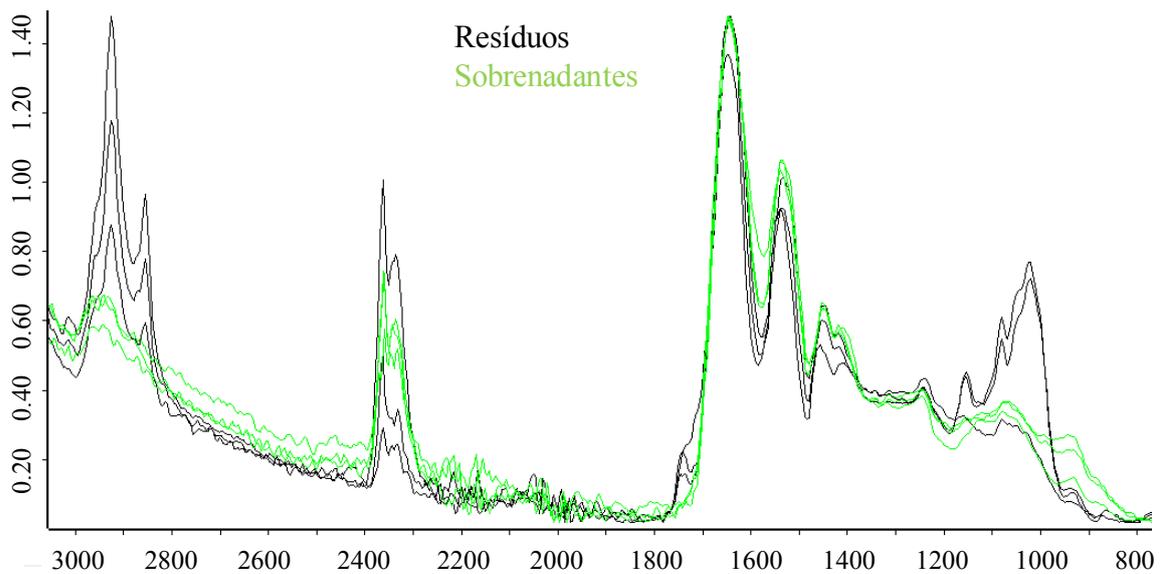


Figura 13 Espectro FTIR ($800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) dos resíduos e sobrenadantes resultantes da incubação do glúten com ECPap 0,1, ECPap 1,0 e EAct 1,0.

do alongamento do grupo C=O e hidratos de carbono ($1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$), provavelmente devido à presença de amido e gordura provenientes do glúten (55). Comparando os resíduos e sobrenadantes ao nível de cada amostra obtida, observam-se diferenças na intensidade dos picos, pelo que se analisaram as amostras dos sobrenadantes com mais detalhe pois não continham vestígios de amido nem de lípidos e porque o espectro do resíduo ECPap 0,1 apresenta um perfil semelhante ao dos sobrenadantes.

Na Figura 14 pode-se observar os espectros dos sobrenadantes de cada uma das amostras e branco entre 1750 e 650 cm^{-1} , com ênfase para os picos na região Amida I (A), Amida II (B) e Amida III (C) (85,86). A observação dos espectros das quatro amostras analisadas mostram diferenças crescentes nas intensidades dos picos ao longo de todo o espectro, sendo estas crescentes, da região Amida I para a região Amida III, a qual é a região em que é mais evidente a diferença entre as amostras analisadas, as quais surgem com intensidade crescente $B > \text{ECPap } 0,1 > \text{EAct } 1,0 > \text{ECPap } 1,0$. Esta observação permite supor que as diferenças observadas estão relacionadas com o aumento de aminoácidos livres e péptidos solúveis, uma vez que o aumento de intensidade corresponde ao aumento de concentração e atividade enzimática das enzimas utilizadas.

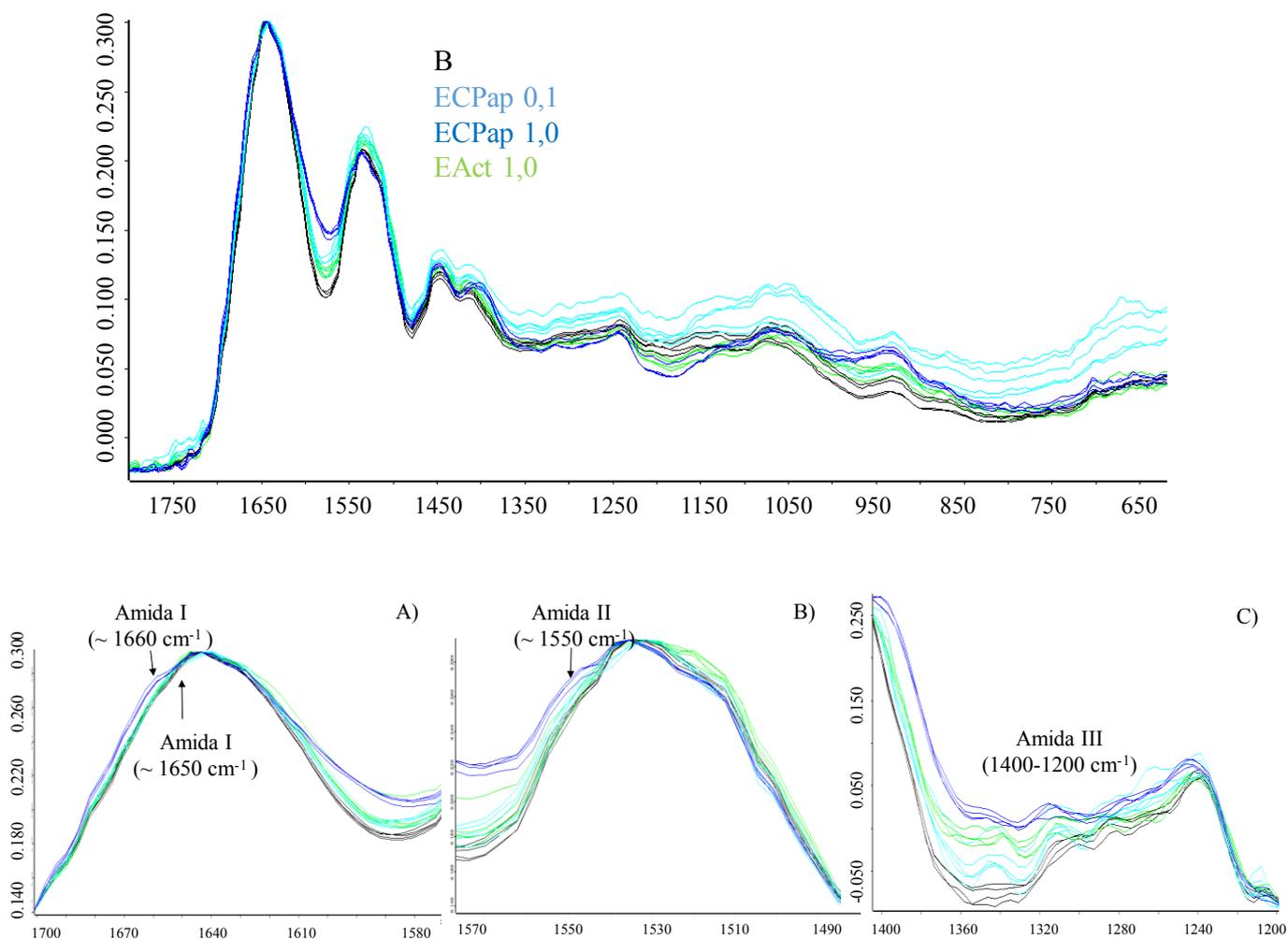


Figura 14 Espectro FTIR ($650\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$) dos sobrenadantes resultantes da incubação do glúten com ECPap 0,1, EAct 1,0 e ECPap 1,0 e um branco, B. A) Região Amida I. B) Região Amida II. C) Região Amida III.

Apesar disso, e uma vez que só se observam diferenças na intensidade dos picos, a análise dos hidrolisados obtidos por FTIR não permite mostrar que ocorreu hidrólise do glúten devido à presença da papaína ou actinidina, apenas que os resíduos e sobrenadantes obtidos são ricos em proteína e que os lípidos e amido presentes no glúten de partida se encontram nos resíduos.

4.2 Análise de aminoácidos por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID)

Procedeu-se à análise de aminoácidos presentes nos sobrenadantes resultantes da incubação de glúten hidratado com papaína (ECPap 0,1 e ECPap 1,0) e actinidina (EAct 1,0), assim como de um dos três brancos obtidos (B) com o objetivo de estudar a sua composição em termos de aminoácidos em ligação peptídica e livres.

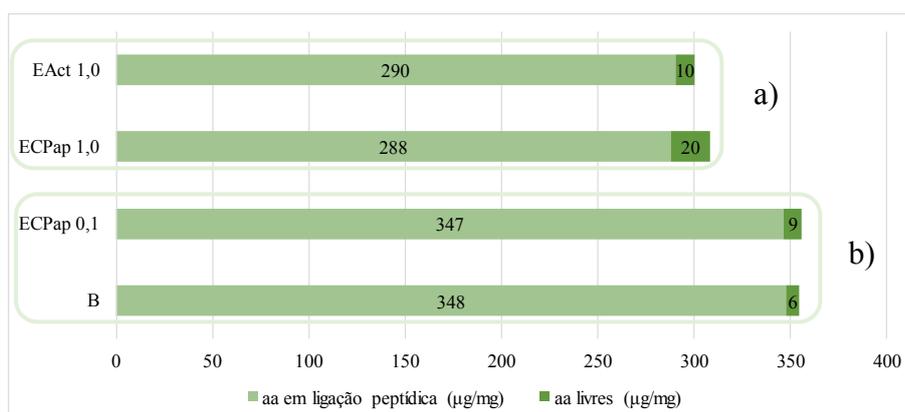


Figura 15 Concentração de aminoácidos (aa) em ligação peptídica e livres presentes nos sobrenadantes obtidos após incubação de glúten hidratado com ECPap 0,1, ECPap 1,0 e com EAct 1,0 durante 22 horas a 37 °C. B: branco.

A composição das amostras e branco encontra-se representada na Figura 15. É possível observar que as amostras são maioritariamente compostas por aminoácidos em ligação peptídica (cerca de 90%) e uma pequena fração de aminoácidos livres. Em termos de aminoácidos totais e em ligação peptídica é possível agrupar as amostras em dois grupos, designados a) e b), em que o grupo a) é representado pelas amostras EAct 1,0 e ECPap 1,0, e o grupo b) pelas amostras ECPap 0,1 e B. A semelhança entre as amostras ECPap 0,1 e B permite supor que neste ensaio não ocorreu hidrólise enzimática na amostra ECPap 0,1. O facto de as amostras do grupo a) representarem ensaios na presença de enzima e diferirem das amostras do grupo b), por outro lado, permite supor a ocorrência de hidrólise enzimática neste grupo. Quanto à concentração de aminoácidos livres, observa-se que as amostras exposta à enzima apresentam concentrações de 9,10 e 20 µg/mg para as amostras ECPap 0,1, EAct 1,0 e ECPap 1,0, respetivamente e de 6 µg/mg na ausência de enzima (B). Os rendimentos obtidos foram de 6,9%, 3,4%, 2,7% e 1,8% para as amostras ECPap 0,1, EAct 1,0 e ECPap 1,0 e B, respetivamente. A presença de aminoácidos livres no B sugere a presença de proteases endógenas na amostra de glúten (69). Tendo em conta estes pressupostos, as amostras foram analisadas em termos de aminoácidos livres, após subtração dos aminoácidos livres quantificados no branco, com o objetivo de eliminar o erro associado à atividade de proteases endógenas.

Na Figura 16 mostra-se a concentração dos aminoácidos livres predominantes (também foram quantificados os aminoácidos Lys, Asx, Ala, Thr, Ser, Tyr e Arg, os quais

não estão representados na figura por serem os aminoácidos minoritários em todas as amostras). Os aminoácidos da amostra B estão representados com o objetivo de comparar

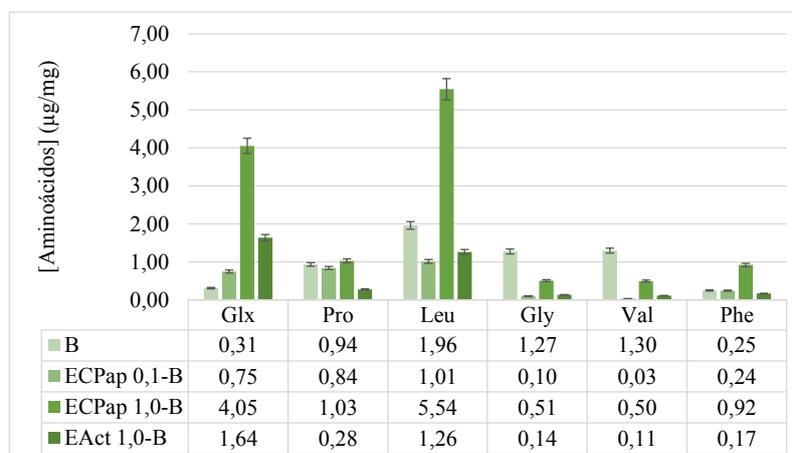


Figura 16 Concentração de aminoácidos livres presentes nos sobrenadantes obtidos após incubação de glúten hidratado com ECPap 0,1, ECPap 1,0 e EAct 1,0 durante 22 horas a 37 °C. B:branco.

esta amostra com as resultantes da incubação de glúten com enzimas proteolíticas. Observa-se que os aminoácidos predominantes no B são a Leu, seguindo-se Val e Gly e Pro, sendo Glx e Phe os aminoácidos minoritários. Quanto às amostras ECPap 0,1-B e ECPap 1,0-B, também se observa predomínio de Leu, seguindo-se Glx e Pro (os quais apresentam concentrações muito próximas na amostra ECPap 0,1 (0,75 µg/mg e 0,85 µg/mg, respetivamente) e predomínio de Glx na amostra ECPap 1,0 (4,05 µg/mg e 1,03 µg/mg para Glx e Pro, respetivamente), sendo os aminoácidos minoritários Phe, Gly e Val. Quanto à amostra EAct, verifica-se predomínio dos aminoácidos Glx e Leu, sendo os aminoácidos minoritários Pro, Phe, Gly e Val. Estes resultados mostram que os aminoácidos livres presentes nos hidrolisados resultantes da incubação com as enzimas proteolíticas apresentam uma composição relativa de aminoácidos diferente da do branco, mostrando alteração da composição em aminoácidos livres após contacto destas enzimas com o glúten. Observa-se que a papaína hidrolisa o glúten com preferência para resíduos próximos de Leu e numa taxa dependente da concentração de enzima, uma vez que a amostra ECPap 1,0 apresenta mais do dobro da concentração de Leu do que a amostra ECPap 0,1, e que a actinidina hidrolisa o glúten, com preferência para resíduos próximos de Glx.

Um estudo realizado em 2009 desenvolveu uma metodologia otimizada para a determinação da composição de aminoácidos do glúten (87) em que se reporta o

predomínio de Glx, seguindo-se Pro e Leu com percentagens molares de 31,9, 14,1 e 7,2, respetivamente, pelo que é normal que estes sejam os aminoácidos predominantes nos hidrolisados obtidos por incubação de glúten com enzimas proteolíticas pouco específicas como são a papaína e a actinidina (29). O facto de o aminoácido livre predominante na amostra EAct 1,0 ser Glx é um resultado importante, tendo em conta a importância do aminoácido Gln na composição do glúten e na reação de desamidação que ocorre na doença celíaca (62,87). Também se observa que na amostra EAct 1,0, a Pro, apesar de ser o segundo aminoácido mais abundante do glúten, surge numa concentração muito reduzida, o que também está de acordo com o descrito na literatura (43). As análises realizadas aos sobrenadantes puderam confirmar que ambas as enzimas têm a capacidade de hidrolisar o glúten, nomeadamente através da presença de aminoácidos livres e em particular dos aminoácidos Leu e Glx (72).

4.3 Análise de proteínas presentes nas frações hidrolisadas de elevado e baixo peso molecular por SDS-PAGE

Analisaram-se os resíduos e sobrenadantes resultantes da digestão de glúten com papaína (ECPap 0,1, ECPap 1,0) e actinidina (EAct 1,0) e os respetivos brancos por eletroforese em gel de poliácridamida em condições não nativas (SDS-PAGE) com o objetivo de observar as alterações no perfil eletroforético das proteínas presentes em cada uma das amostras. Os géis obtidos encontram-se representados na Figura 17. A análise do perfil eletroforético dos resíduos mostra o mesmo perfil para os três brancos, os quais apresentam duas bandas entre os 95 e os 72 kDa, provavelmente devido à presença das gluteninas HMW, duas bandas entre os 55 e os 43 kDa, devido à presença das gliadinas $\omega 5$ e $\omega 1,2$, seguindo-se a banda com maior intensidade entre os 43 e os 34 kDa, muito provavelmente devido à presença das α/β e γ -gliadinas e das gluteninas LMW. No caso do ensaio com ECPap 1,0, quer no B, quer na amostra, se observa uma banda com cerca de 34 kDa, que pode resultar da própria degradação do glúten durante o ensaio realizado ou da presença de proteases endógenas. É possível observar que a amostra ECPap 0,1 não apresenta diferenças relativamente aos brancos, ao contrário do que se observa para as amostras ECPap 1,0 e EAct 1,0. No caso da amostra ECPap 1,0 observa-se um perfil eletroforético bastante distinto das restantes amostras, com desaparecimento de bandas com peso molecular entre 95 e 72 kDa e 43 e 34 kDa, com acumulação de bandas com cerca de 72 kDa, 30 kDa e de péptidos com peso molecular menor ou igual a 20 kDa. No perfil eletroforético da amostra

EAct 1,0 também se observa acumulação de proteína com cerca de 72 kDa e alguma degradação das bandas com peso molecular entre 55 e 43 kDa e 43 e 34 kDa, as quais se encontram presentes, mas apresentam menor intensidade.

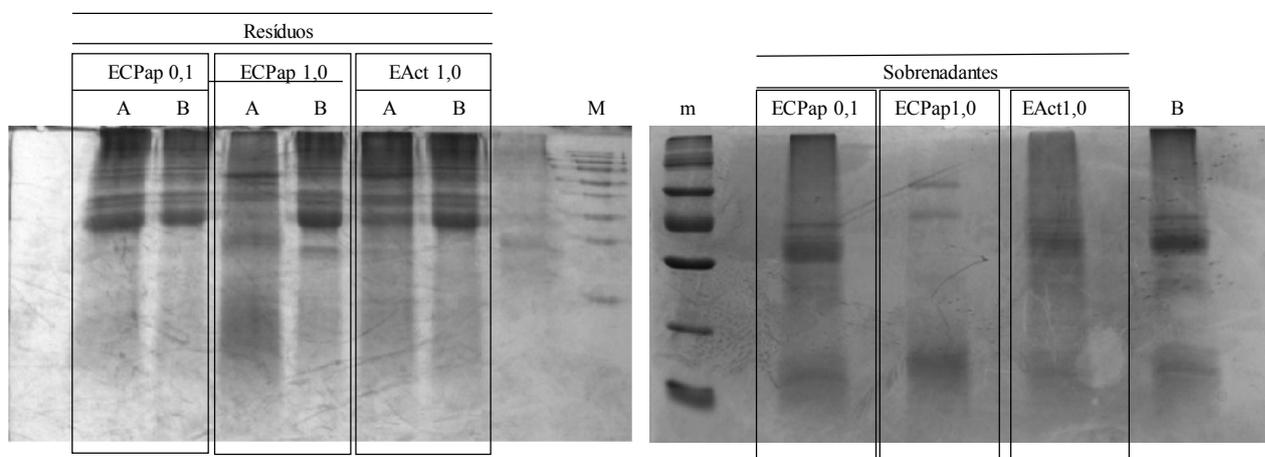


Figura 17 Géis de SDS-PAGE dos resíduos e sobrenadantes das amostras ECPap 0,1, ECPap 1,0 e EAct 1,0. A: amostra; B: branco; M: marcador de peso molecular com 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34 e 26 kDa; m: marcador de peso molecular com 97, 66, 45, 30, 20 e 15 kDa.

No perfil eletroforético dos sobrenadantes não se observam bandas de elevado peso molecular, com exceção da amostra ECPap 1,0 que apresenta duas bandas com cerca de 66 e 45 kDa, respetivamente. A amostra ECPap 0,1 difere do branco apenas na intensidade das bandas, sendo que o branco apresenta bandas com maior intensidade e a amostra ECPap 0,1 bandas mais dispersas, o que sugere que as proteínas presentes no branco representam as α/β e γ -gliadinas e LMW que solubilizaram devido às condições experimentais e/ou à presença de proteases endógenas, mas que as presentes na amostra ECPap 0,1, podem resultar da atividade proteolítica moderada da papaína, uma vez que a sua concentração também é cem vezes inferior à da amostra, ECPap 1,0, a qual, para além das bandas acima referidas, apresenta uma banda adicional com peso molecular inferior a 20 kDa. A amostra EAct 1,0 também apresenta um perfil eletroforético semelhante ao do branco com menor intensidade, nomeadamente entre os 45 e os 30 kDa. Esta amostra também tem alguns péptidos com massa inferior a 20 kDa.

A análise dos géis de SDS-PAGE permite confirmar que a papaína e a actinidina conseguem hidrolisar o glúten, sendo a papaína bastante mais eficiente do que a actinidina (quando presentes na mesma concentração), como seria de esperar (41,44,50), mas que a hidrólise nas condições testadas é praticamente inexistente se a papaína estiver numa concentração de 0,100 mg/mL.

Os resultados da análise eletroforética aos resíduos e sobrenadantes obtidos no ensaio otimizado com ACTsumo apresentam-se na Figura 18. No que diz respeito aos resíduos, é possível observar que os brancos apresentam o mesmo perfil eletroforético do que o glúten, com duas bandas entre os 97 e os 66 kDa e três entre os 45 e os 30 kDa, uma bastante intensa e de menor peso molecular e duas com menor intensidade e maior peso molecular. Estas bandas representam as x-HMW, y-HMW, ω 5-gliadina, ω 1,2-gliadina, sendo a banda mais intensa relativa às gluteninas LMW e γ , α/β -gliadinas. Todos os hidrolisados de elevado peso molecular têm um perfil eletroforético semelhante entre si e muito distinto do glúten e brancos. Confirma-se assim que a actinidina tem a capacidade de hidrolisar o glúten, nomeadamente as gliadinas e LMW, presentes na banda mais intensa e de menor peso molecular (45-30 kDa), e as gluteninas x-HMW, com manutenção de uma banda de 45 kDa,

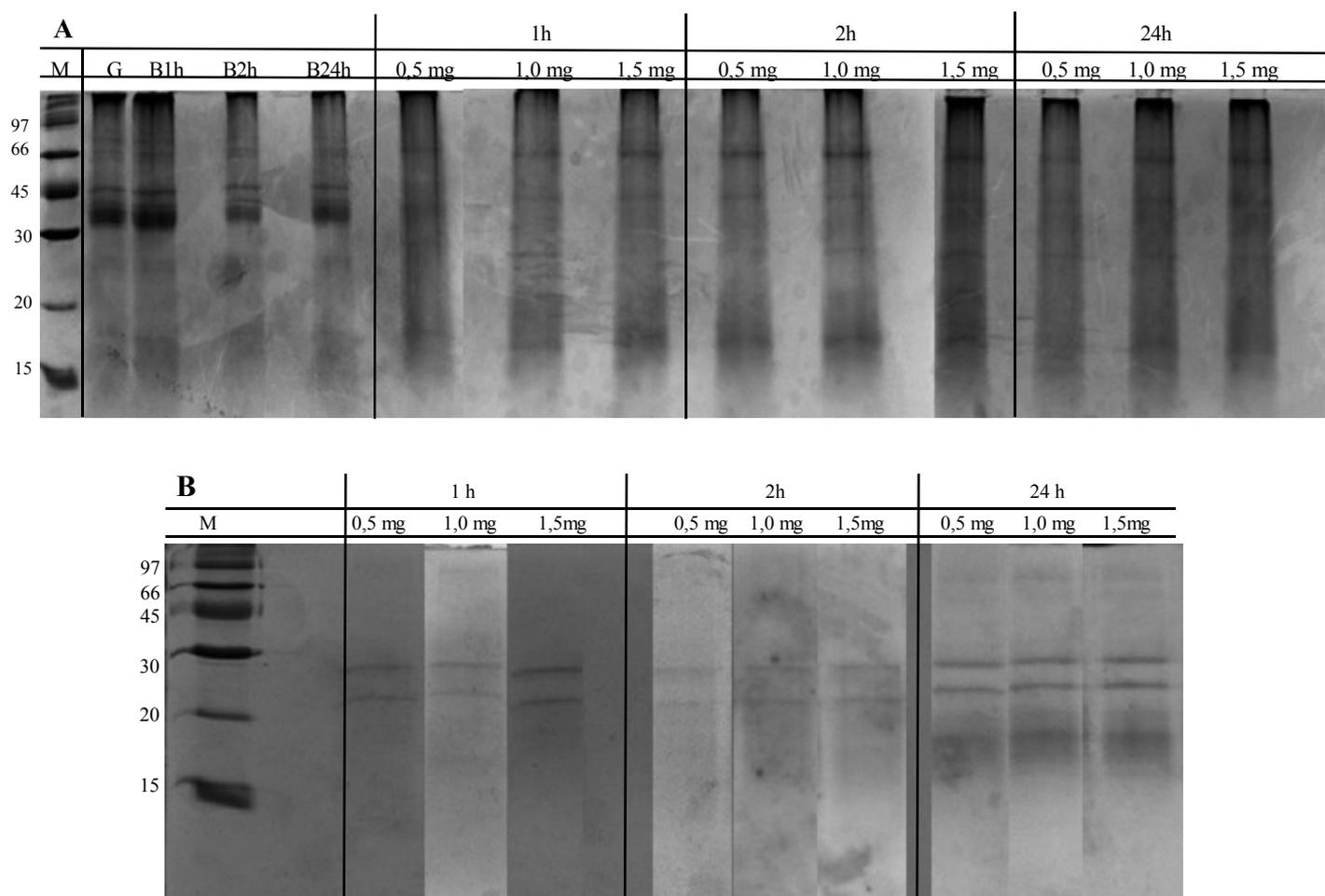


Figura 18 Géis de SDS-PAGE dos hidrolisados proteicos de elevado (A) e baixo (B) peso molecular obtidos após incubação de glúten (G) com actinidina 0,5, 1,0 e 1,5 mg durante 1, 2 e 24 horas. B: branco; M: marcador de peso molecular com 97, 66, 45, 30, 20 e 15 kDa.

provavelmente das ω -gliadinas, e aumento na intensidade da banda com 66 kDa devido à hidrólise parcial das gluteninas x-HMW e manutenção das gluteninas y-HMW. Os resíduos apresentam ainda bandas adicionais relativamente ao glúten, uma entre os 20 e os 30 kDa e outra entre os 20 e os 15 kDa, provavelmente péptidos resultantes da sua degradação. Nas hidrólises de uma e duas horas é possível observar que o aumento da concentração de actinidina resultou em bandas de baixo peso molecular mais intensas, o que na hidrólise de 24 horas não se observa, provavelmente porque o glúten encontra-se praticamente hidrolisado. Quanto aos sobrenadantes, à semelhança do observado para os resíduos, todos os hidrolisados de baixo peso molecular têm o mesmo perfil eletroforético, com duas bandas, entre os 30 e os 20 kDa, sendo que os obtidos por incubação durante 24 horas apresentam uma larga banda adicional entre os 20 e os 15 kDa. As gliadinas e gliadinas LMW mostraram ser mais suscetíveis à hidrólise enzimática.

Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos em que se investigou o efeito da incubação de glúten com proteases. Em 2007 estudou-se o efeito de proteases comerciais (alcalase 2,4L (*Bacillus licheniformis*), pancreatina e tripsina (pâncreas de porco), neutrase (*Bacillus amyloliquefaciens*) e ProtamexTM (*Bacillus subtilis*)) no glúten a diferentes temperaturas e pH, tendo-se observado degradação de bandas de elevado peso molecular, e aparecimento de bandas com peso molecular inferior a 40 kDa (68). Também em 2007 se observou o efeito da hidrólise da papaína no glúten, com solubilização das gliadinas e gluteninas LMW, sendo as gluteninas HMW mais resistentes à hidrólise enzimática. Em ambos os trabalhos a hidrólise de glúten foi mais intensa nas primeiras horas de incubação, com formação de novos péptidos também suscetíveis à hidrólise enzimática. Incubações mais longas resultaram na degradação suave das gluteninas, as quais são mais resistentes à hidrólise enzimática (72).

5 Considerações finais

Avaliaram-se as condições que permitem obter um extrato rico em actinidina e com elevada atividade enzimática em quatro condições distintas. Os resultados de proteína total, atividade enzimática específica e cinética enzimática foram consistentes e mostraram que o extrato que melhor preenche os requisitos definidos é obtido sem adição de solvente, por

simples *salting out* da proteína solúvel presente no sumo do kiwi. O método da azocaseína adaptado a leituras de dez em dez minutos revelou-se uma metodologia útil para comparar o perfil enzimático dos extratos obtidos e confirmar as diferenças observadas no ensaio de atividade enzimática específica.

Realizaram-se ensaios preliminares e otimizados para estudar o efeito da actinidina no glúten. Os resultados obtidos nas análises realizadas por FTIR mostraram que os resíduos são constituídos por glúten, lípidos e amido, os quais não se encontram presentes nos sobrenadantes ricos em proteína e aminoácidos livres (cuja presença foi posteriormente confirmada através da análise de aminoácidos por GC-FID).

Os aminoácidos livres resultantes da hidrólise do glúten pelas cisteína proteases em estudo, com predomínio de Leu nos ensaios com papaína e de Glx nos ensaios com actinidina, o que permite supor que a pré-hidrólise de glúten com actinidina pode resultar numa redução da concentração de Gln nos hidrolisados de elevado peso molecular obtidos. Esta observação pode ter implicações importantes na aplicação da actinidina na produção de alimentos *gluten free*, uma vez que a redução da concentração de Gln também reduz os potenciais locais de desamidação do glúten pela TGt. A presença de aminoácidos livres no branco alertou para a necessidade de trabalhar com glúten desidratado em ensaios futuros e de adicionar um agente inibidor do crescimento microbiano. O predomínio de aminoácidos em ligação peptídica alertou para a necessidade de centrifugação a uma velocidade superior a 1500 rpm para obtenção de sobrenadantes enriquecidos em péptidos e aminoácidos livres provenientes da hidrólise enzimática.

A análise eletroforética dos resíduos e sobrenadantes obtidos nos ensaios preliminares permitiu confirmar que a actinidina consegue hidrolisar o glúten uma vez que se observou acumulação de proteína com cerca de 72 kDa devido à hidrólise moderada nas gluteninas x-HMW e alguma degradação das bandas com peso molecular entre 55 e 43 kDa e entre 43 e 34 kDa (gluteninas LMW e α/β e γ -gliadinas), as quais surgem nos sobrenadantes, juntamente com péptidos de peso molecular inferior a 20 kDa. O predomínio de péptidos nos sobrenadantes, observado na análise de aminoácidos também pôde ser confirmado através da eletroforese. Este ensaio também mostrou a necessidade de adicionar ureia concentrada no tampão de carga dos resíduos com o objetivo de facilitar a sua solubilização (88,89) e posterior migração ao longo do gel de poliacrilamida, o qual

também deve ter menor percentagem de acrilamida, uma vez que deste modo se obtém melhor resolução entre as bandas (78). As análises eletroforéticas realizadas aos hidrolisados obtidos nos ensaios otimizados permitiu confirmar que a actinidina presente no ACTsumo consegue hidrolisar o glúten, nomeadamente as gliadinas e gluteninas LMW, o que vai de encontro ao esperado, já que outros trabalhos já observaram o efeito benéfico da suplementação com actinidina na digestão de proteínas hidrofóbicas como o glúten e da pré-incubação de glúten com outras proteases.

Os hidrolisados obtidos neste e em outros trabalhos não foram sujeitos a ensaios imunológicos com o objetivo de averiguar a sua aplicabilidade na produção de alimentos *gluten free*, no entanto, este ano foi publicado um trabalho em que se testou o efeito de peptidases do trigo, centeio e *Aspergillus niger* no amido de trigo com 110, 1679 e 2070 ppm de glúten tendo-se observado que as peptidases presentes no *A. niger* conseguem hidrolisar o glúten até menos de 20 ppm por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e os resultados confirmados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) (90).

VI. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que é possível obter um extrato enzimático com elevada atividade enzimática através de uma metodologia rápida e simples, sem adição de solventes, recorrendo à precipitação da proteína solúvel do kiwi com sulfato de amónio a 60%, o que pode ser uma mais-valia à sua obtenção para aplicações na indústria alimentar tendo em conta o baixo custo de extração e as características do extrato obtido.

Também foi possível mostrar que a actinidina presente no extrato obtido têm a capacidade de hidrolisar o glúten, nomeadamente as subunidades de baixo peso molecular do glúten, provavelmente as gluteninas LMW e as γ , α/β -gliadinas, com formação de péptidos igualmente suscetíveis à hidrólise enzimática e de dimensões dependentes do tempo de incubação aplicado. Segundo a literatura, esta é a primeira vez que se estuda o efeito do tratamento de glúten com actinidina.

O estudo realizado permite sugerir a valorização do kiwi de baixo calibre através da extração de actinidina e sua aplicação na produção de hidrolisados de glúten.

VII. TRABALHOS FUTUROS

Considera-se importante caracterizar os hidrolisados obtidos quanto à sua imunogenicidade e aplicabilidade na produção de alimentos *gluten free* através de um teste imunológico tipo ELISA R5, assim como proceder à identificação e caracterização das sequências de aminoácidos presentes nos mesmos por espectrometria de massa com o objetivo de perceber quais as sequências enzimaticamente hidrolisadas e a sua relação com a alergia e intolerância ao glúten. Os hidrolisados devem igualmente ser caracterizados quanto às suas propriedades biológicas (se os péptidos formados são bioativos, por exemplo), reológicas (viscosidade, elasticidade) e capacidade emulsionante no sentido de propor aplicações concretas, por exemplo na produção de alimentos *gluten free* e de outro tipo de alimentos, assim como para aplicações farmacêuticas e cosméticas, as quais já utilizam hidrolisados de glúten como ingrediente nas suas formulações (91).

No caso de se comprovar a sua aplicabilidade na produção de alimentos *gluten free*, os testes imunológicos devem ser realizados antes e depois do processamento térmico, já que no caso da alergia o processamento térmico tem um papel decisivo no desenvolvimento da reação alérgica (58), assim como antes e depois da sua digestão gastrointestinal e absorção *in vitro* e simulando condições de intolerância, já que esta reação ocorre quando os péptidos não digeridos de glúten chegam à submucosa intestinal de indivíduos geneticamente predispostos.

A realização deste trabalho permitiu alertar para a necessidade de um artigo de revisão sobre a actinidina. A literatura apresenta-a como uma proteína com peso molecular de 42, 30, 25 ou 23 kDa, na maior parte dos trabalhos não se menciona a presença de actinidina na forma ativa N-preactinidina e também não existe consenso quanto à atividade enzimática das isoformas básicas (ativas ou inativas). A informação disponível deve ser analisada e clarificada no sentido de confirmar a presença de uma leucilaminopeptidase, descrita como sendo uma metaloprotease.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Zhen Y, Li Z, Huang H, Wang Y. Molecular Characterization of Kiwifruit (*Actinidia*) Cultivars and Selections Using SSR Markers. *J AmerSocHortSci*. 2004;129(3):374–82.
2. Huang H, Ferguson AR. Review: Kiwifruit in China. *New Zeal J Crop Hortic Sci*. 2001;29(1):1–14.
3. Ferguson AR. New Temperate Fruits : *Actinidia chinensis* and *Actinidia deliciosa*. *Perspect new Crop new uses*. 1999;1904:342–7.
4. Kiwi. Ministério da Agricultura do Desenvolv Rural e das pescas. 2007;
5. Antunes D, Veloso A, Oliveira A, Curado F, Veloso F, Teixeira M, Neves N, Rodrigues S, Panagopoulos T. Qualidade e conservação de kiwis. *Proj Agro 231*. (Regularidade produtiva, qualidade e conservação dos frutos de actinídea nas regiões de Entre Douro e Minho e Beira Litoral).
6. Lintas C, Adoriso S, Cappelloni M, Monastra E. Composition and nutritional evaluation of kiwifruit grown in Italy. *New Zeal J Crop Hortic Sci*. 1991;19(4):341–4.
7. Tavarini S, Degl’Innocenti E, Remorini D, Massai R, Guidi L. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of 'Hayward' kiwifruit. *Food Chem*. 2008;107(1):282–8.
8. Antunes MDC, Sfakiotakis EM. Changes in fatty acid composition and electrolyte leakage of 'Hayward' kiwifruit during storage at different temperatures. *Food Chem*. 2008;110(4):891–6.
9. Hui YH, Nip W-K, Nollet LML, Paliyath G, Simpson BK. *Food Biochemistry and Food Processing*. 1st ed. Blackwell Publishing; 2008.
10. Sauvageau J, Hinkley SF, Carnachan SM, Sims IM. Characterisation of polysaccharides from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch. “Hort16A”). *Carbohydr Polym*. Elsevier Ltd.; 2010;82(4):1110–5.
11. Sivam AS, Sun-Waterhouse D, Quek S, Perera CO. Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: a review. *J Food Sci*. 2010;75(8):R163–74.
12. Iwasawa H, Morita E, Yui S, Yamazaki M. Anti-oxidant effects of kiwi fruit in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull*. 201;34(1):128–34.
13. Parkar SG, Rosendale D, Paturi G, Herath TD, Stoklosinski H, Phipps JE, Hedderley D, Ansell J. In vitro utilization of gold and green kiwifruit oligosaccharides by human gut microbial populations. *Plant Foods Hum Nutr*. 2012;67(3):200–7.
14. Piombo G, Barouh N, Barea B, Boulanger R, Brat P, Pina M, Villeneuve P. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Fondamental*. 2006;13:195–9.
15. Nishiyama I, Yamashita Y, Yamanaka M, Shimohashi A, Fukuda T, Oota T. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. *J Agric Food Chem*. 2004;52(17):5472–5.

16. Fiorentino A, D'Abrosca B, Pacifico S, Mastellone C, Scognamiglio M, Monaco P. Identification and assessment of antioxidant capacity of phytochemicals from kiwi fruits. *J Agric Food Chem.* 2009;57(10):4148–55.
17. Du G, Li M, Ma F, Liang D. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2009;113(2):557–62.
18. Gavrovic-jankulovic M, Polovic N, Prusic S. Food and Agricultural Immunology Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development. *Food Agric Immunol.* 2007;16(2):117–28.
19. Afshar-Mohammadian M, Rahimi-Koldeh J, Sajedi RH. The comparison of protease activity and total protein in three cultivars of kiwifruit of Northern Iran during fruit development. *Acta Physiol Plant.* 2010;33(2):343–8.
20. Grozdanovic MM, Burazer L, Gavrovic-Jankulovic M. Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *Int Dairy J. Elsevier Ltd;* 2013;32(1):46–52.
21. Larocca M, Rossano R, Riccio P. Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward') proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry. *J Sci Food Agric.* 2010;90(14):2411–8.
22. Tuppo L, Giangrieco I, Palazzo P, Bernardi ML, Scala E, Carratore V, Tamburrini M, Mari A, Ciardiello MA. Kiwellin, a Modular Protein from Green and Gold Kiwi Fruits : Evidence of in Vivo and in Vitro Processing and IgE Binding. *J Agric Food Chem.* 2008;56:3812–7.
23. Rush EC, Patel M, Plank LD, Ferguson LR. Kiwifruit promotes laxation in the elderly. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2002;11(2):164–8.
24. Maddumage R, Nieuwenhuizen NJ, Bulley SM, Cooney JM, Green S a, Atkinson RG. Diversity and relative levels of actinidin, kiwellin, and thaumatin-like allergens in 15 varieties of kiwifruit (*Actinidia*). *J Agric Food Chem.* 2013;61(3):728–39.
25. Ciardiello MA, Meleleo D, Saviano G, Crescenzo R, Carratore V, Camardella L, Gallucci E, Micelli S, Tancredi T, Picone D, Tamburrini M. Kissper, a kiwi fruit peptide with channel-like activity: Structural and functional features. *Journal of Peptide Science.* 2008;742–54.
26. Fiorentino A, Mastellone C, D'Abrosca B, Pacifico S, Scognamiglio M, Cefarelli G, Caputo R, Monaco P. δ -Tocomononol: A new vitamin E from kiwi (*Actinidia chinensis*) fruits. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2009;115(1):187–92.
27. Gabinete de planeamento e políticas. Newsletter Frutos frescos - conjuntura semanal - mercados de produção. 2013;1–10.
28. Nieuwenhuizen N, Beuning L, Sutherland P, Sharma N, Cooney J, Bieleski L, Schröder R, MacRae EA, Atkinson RG. Identification and characterisation of acidic and novel basic forms of actinidin , the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Funct Plant Biol.* 2007;34:946–61.
29. Praekelt UM, McKee R a, Smith H. Molecular analysis of actinidin, the cysteine proteinase of *Actinidia chinensis*. *Plant Mol Biol.* 1988;10(3):193–202.
30. Grozdanovic M, Popovic M, Polovic N, Burazer L, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Linder B, Petersen A, Gavrovic-Jankulovic M. Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy. *Food Chem Toxicol. Elsevier Ltd;* 2012;50(3-4):1013–8.

31. Boyes S, Strübi P, Marsh H. Actinidin Levels in Fruit of Actinidia Species and Some Actinidia arguta Rootstock – Scion Combinations. *Leb u-Technol.* 1997;30:379–89.
32. Premarathne AAA, Leung DWM. Characterization of Activity of a Potential Food-Grade Leucine Aminopeptidase from Kiwifruit. *Enzyme Research.* 2010;2010:2–7.
33. Katsaros GI, Katapodis P, Taoukis PS. Modeling the effect of temperature and high hydrostatic pressure on the proteolytic activity of kiwi fruit juice. *J Food Eng. Elsevier Ltd;* 2009;94(1):40–5.
34. Baker EN. The structure of actinidin at 5.5Å resolution. *J Mol Biol.* 1976;101(2):185–96.
35. Baker EN. Structure of actinidin, after refinement at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1980;141(4):441–84.
36. Bhattacharya S, Ghosh S, Chakraborty S, Bera a K, Mukhopadhyay BP, Dey I, Banerjee A. Insight to structural subsite recognition in plant thiol protease-inhibitor complexes : understanding the basis of differential inhibition and the role of water. *BMC Struct Biol.* 2001;1:4.
37. Carne A, Moore CH. The Amino Acid Sequence of the Tryptic Peptides from Actinidin , a Proteolytic Enzyme from the Fruit of Actinidia chinensis. *Biochem J.* 1978;173:73–83.
38. Boland MJ, Hardman MJ. Kinetic studies on the thiol protease from Actinidia chinensis. *FEBS Lett.* 1972; 27(2):282–4.
39. Boland MJ, Hardman MJ. The actinidin-catalysed hydrolysis of N- α -benzylocarbonyl-L-lysine p-nitrophenil ester pH dependence and mechanism. *Eur J Biochem.* 1973;36:575–82.
40. <http://www.nostatic.com/proteins/Actinadin/ActStruc.htm>.
41. Pickersgill RW, Goodenough PW, Sumner IG, Collins ME. The electrostatic fields in the active-site clefts of actinidin and papain. *Biochem J.* 1988;254:235–8.
42. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967;27(2):157–62.
43. Morimoto K, Furuta E, Hashimoto H, Inouye K. Effects of high concentration of salts on the esterase activity and structure of a kiwifruit peptidase, actinidain. *J Biochem.* 2006;139(6):1065–71.
44. Baker EN, Boland MJ, Calder PC, Hardman MJ. The specificity of actinidin and its relationship to the structure of the enzyme. *Biochem Biophys Acta.* 1980;616:30–4.
45. Brocklehurst K, Baines BS, J.P.G. M. Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centres of actinidin and papain. *Biochem J.* 1981;197:739–46.
46. Aminlari M, Shekarforoush SS, Gheisari HR, Golestan L. Effect of actinidin on the protein solubility, water holding capacity, texture, electrophoretic pattern of beef, and on the quality attributes of a sausage product. *J Food Sci.* 2009;74(3):C221–6.
47. Christensen M, Tørngren MA, Gunvig A, Rozlosnik N, Lametsch R, Karlsson AH, Ertbjerg P. Injection of marinade with actinidin increases tenderness of porcine M. biceps femoris and affects myofibrils and connective tissue. *J Sci Food Agric.* 2009;89(9):1607–14.
48. Toohey ES, Kerr MJ, van de Ven R, Hopkins DL. The effect of a kiwi fruit based solution on meat traits in beef M. semimembranosus (topside). *Meat Sci. Elsevier B.V.;* 201;88(3):468–71.

49. Majdinasab M, Aminlari L, Aminlari M, Niakosari M. Effect of Actinidin on the Solubility and Sds-Page Pattern of Soymilk Proteins. *J Food Biochem.* 2010;34(6):1172–85.
50. Chalabi M, Khademi F, Yarani R, Mostafaie A. Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward') on different fibrous and globular proteins: a comparative study of actinidin with papain. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;172(8):4025–37.
51. Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed using an in vitro gastric digestion model. *J Agric Food Chem.* 2010;58(8):5068–73.
52. Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using an in vitro digestion model. *J Agric Food Chem.* 2010;58(8):5074–80.
53. Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J Mol Catal B Enzym. Elsevier B.V.;* 2013;90:1–11.
54. Rutherford SM, Montoya C a., Zou ML, Moughan PJ, Drummond LN, Boland MJ. Effect of actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward') on the digestion of food proteins determined in the growing rat. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2011;129(4):1681–9.
55. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007;24(2):115–9.
56. Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357(1418):133–42.
57. Tanebe S, Arai S, M. W. Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Biosc Biotech Biochem.* 1996;60(8):1269–72.
58. Simonato B, Pasini G, Giannattasio M, Peruffo a D, De Lazzari F, Curioni A. Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb, and crust. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5668–73.
59. Teixeira N. Doença Celíaca Atualizada. Universidade da Beira Interior; 2012.
60. Gentile V, Violante V, D'Amico B, Illiano M, Luongo A. Tissue transglutaminase and coeliac disease pathogenesis: potential molecular mechanisms for other human diseases. *Neurochem Int.* 2002;40(1):79–83.
61. Hoffmann K, Alminger M, Andlid T, Chen T, Olsson O, Sandberg A-S. Blocking peptides decrease tissue transglutaminase processing of gliadin in vitro. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(21):10150–5.
62. Vader LW, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YMC, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med.* 2002;195(5):643–9.
63. Berti C, Roncoroni L, Falini ML, Caramanico R, Dolfini E, Bardella MT, Elli L, Terrani C, Forlani F. Celiac-related properties of chemically and enzymatically modified gluten proteins. *J Agric Food Chem.* 2007;55(6):2482–8.
64. Bergamo P, Maurano F, Mazzarella G, Iaquinto G, Vocca I, Rivelli AR, De Falco E, Gianfrani C, Rossi M. Immunological evaluation of the alcohol-soluble protein fraction from gluten-free grains in relation to celiac disease. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(8):1266–70.

65. Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Codex Stan 118-1979. 2008;3–5.
66. Eggert K, Rawel HM, Pawelzik E. In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases. *Eur Food Res Technol.* 2011;233:697–705.
67. Rizzello CG, Curiel JA, Nionelli L, Vincentini O, Di Cagno R, Silano M, Gobbetti M, Coda R. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiol. Elsevier Ltd;* 2014;37:59–68.
68. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* 2007;102:759–63.
69. Stenman SM, Venäläinen JI, Lindfors K, Auriola S, Mauriala T, Kaukovirta-Norja A, Jantunen A, Laurila K, Qiao SW, Sollid LM, Männistö PT, Kaukinen K MM. Enzymatic detoxification of gluten by germinating wheat proteases: implications for new treatment of celiac disease. *Ann Med.* 2009;41(5):390–400.
70. Messer M, Anderson CM, Hubbard L. Studies on the Mechanism of Destruction of the Toxic Action of Wheat Gluten in Coeliac Disease By Crude Papain. *Gut.* 1964;5:295–303.
71. Caputo I, Lepretti M, Martucciello S, Esposito C. Enzymatic strategies to detoxify gluten: implications for celiac disease. *Enzyme Res.* 2010;1–9.
72. Wang J-S, Zhao M-M, Zhao Q-Z, Bao Y, Jiang Y-M. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *J Food Sci.* 2007;72(2):C103–7.
73. Bergamo P, Gogliettino M, Palmieri G, Cocca E, Maurano F, Stefanile R, Balestrieri M, Mazzarella G, David C, Rossi M. Conjugated linoleic acid protects against gliadin-induced depletion of intestinal defenses. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55 Suppl 2:S248–56.
74. Sigma-Aldrich. Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit-Technical bulletin. p. 1–6.
75. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
76. Charney J, Tomarelli R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol Chem.* 1947;171:501–5.
77. Bisswanger H. *Practical Enzymology.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004.
78. Amado F, Domingues P, Domingues MR, Ferreira R, Vitorino R. *Análise de proteínas - Guia do laboratório.* Aveiro, Portugal: 100luz; 2013.
79. Zumwalt RW, Absheer JS, Kaiser FE, Gehrke CW. Acid hydrolysis of proteins for chromatographic analysis of amino acids. *J Assoc Off Anal Chem.* 1987;70(1):147–51.
80. MacKenzie SL. Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluorobutyl isobutyl esters. *J Assoc Off Anal Chem.* 1987;70(1):151–60.
81. Nelson D, Cox M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. W. H. Freeman; 2004
82. Smith DM. *Food Analysis.* 4th ed. Nielsen SS, editor. West Lafayette, USA: Springer; 2010.

83. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
84. Paul W, Amiss J, Try R, Praekelt U, Scott R, Smith H. Correct Processing of the Kiwifruit Protease Actinidin in Transgenic Tobacco Requires the Presence of the C-Terminal Propeptide. *Plant Physiol*. 1995;108:261–8.
85. Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman DI. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev*. 2008;43(2):134–79. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767(9):1073–101.
86. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767(9):1073–101.
87. Rombouts I, Lamberts L, Celus I, Lagrain B, Brijs K, Delcour J a. Wheat gluten amino acid composition analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *J Chromatogr A*. 2009 17;1216(29):5557–62.
88. Correia I, Nunes A, Barros AS, Delgadillo I. Comparison of the effects induced by different processing methods on sorghum proteins. *J Cereal Sci*. 2010;51(1):146–51.
89. Nunes A, Correia I, Barros A, Delgadillo I. Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Agric Food Chem*. 2005;53(3):639–43.
90. Walter T, Wieser H, Koehler P. Production of gluten-free wheat starch by peptidase treatment. *J Cereal Sci*. Elsevier Ltd; 2014;60(1):202–9.
91. Bouchez-Mahiout I, Pecquet C, Kerre S, Snégaroff J, Raison-Peyron N, Laurière M. High molecular weight entities in industrial wheat protein hydrolysates are immunoreactive with IgE from allergic patients. *J Agric Food Chem*. 2010;58(7):4207–15.