

# Interação molecular entre os polifenóis e um alergénio de origem animal: digestão e resposta imune às proteínas do ovo

Francisco Manuel Santos Duarte  
Fernandes

Mestrado em Bioquímica  
Departamento de Química e Bioquímica  
2021/2022

**Susana Soares**

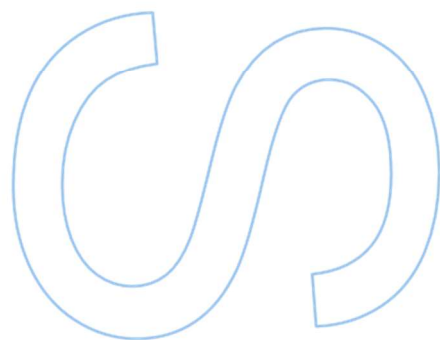
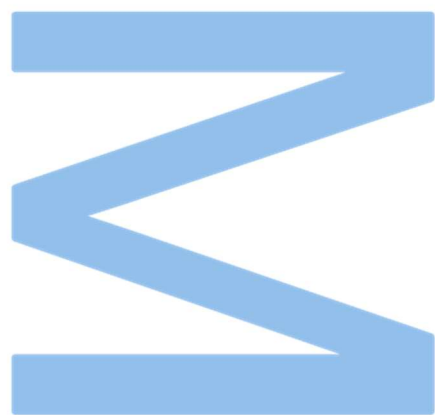
Susana Isabel Pinto Teixeira Pereira Soares, Orientador,  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Maria Rosa Pérez Gregorio**

Maria Rosa Perez Gregorio, Co-orientador, Faculdade de Ciências  
da Universidade do Porto

**Vitor Freitas**

Victor Armando Pereira Freitas, Co-orientador, Faculdade de  
Ciências da Universidade do Porto

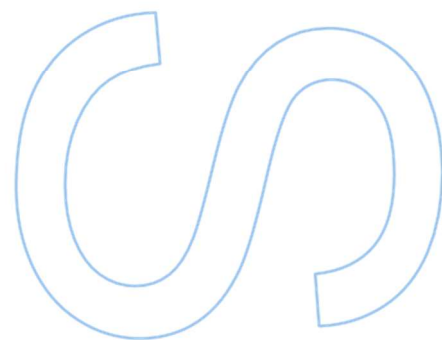
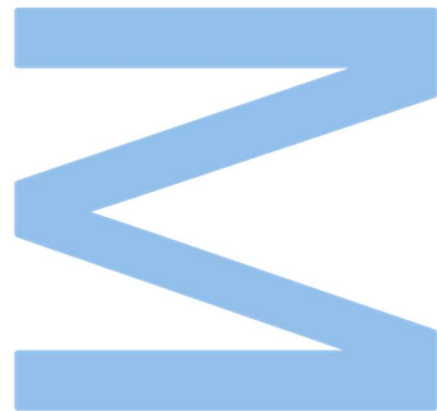


**U.**PORTO



**U.**PORTO

**FC** FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO





## Declaração de Honra

Eu, Francisco Manuel Santos Duarte Fernandes, inscrito no Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo da presente dissertação reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar esta dissertação, declaro, ainda, que a mesma é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados na presente dissertação/relatório de estágio/projeto [indicar o aplicável] quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Francisco Manuel Santos Duarte Fernandes

[Porto, 28-09-2022]

## Agradecimentos

Devido à pandemia que a todos afetou em 2020, este projeto foi a minha primeira experiência com trabalho laboratorial autónomo, logo não sabia muito bem o que esperar.

Hoje, penso na sorte que eu tive. Penso na equipa do REQUIMTE que tão bem me acolheu e me ensinou tudo o que podia não tendo essa obrigação, no trabalho colaborativo que desenvolvemos e que, acredito, se transformará em boas amizades.

Penso especialmente, nas minhas excelentes orientadora Susana Soares e co-orientadora Maria Rosa Gregório e ser-lhes-ei eternamente grato pelo apoio e disponibilidade em me acompanharem neste processo. Por estes dias, em que a escrita não flui com a rapidez que gostaria, e o fim, por vezes, fica mais longe é a presença atenta da minha orientadora que me impulsiona e me foca no que é importante.

Um especial agradecimento à minha família e amigos que me apoiaram e me ensinaram “paciência na tormenta e alegria na conquista”.

## Resumo

Avanços científicos permitiram ao Homem alterar fundamentalmente a sua relação com o que consome, de algo só necessário para sobreviver para algo que afeta a nossa saúde. O uso dos nutrientes para tratar e prevenir doenças ganhou popularidade sendo hoje uns dos maiores fatores que influencia a escolha do consumidor. Entre estas, as alergias alimentares destacam-se devido à sua crescente taxa de incidência juntamente com a ausência de métodos de prevenção eficazes. Neste projeto foi alvo de especial atenção a alergia ao ovo devido à sua prevalência em populações vulneráveis como crianças, afetando seriamente o seu estilo de vida. Foi explorado o potencial de polifenóis de chá verde e mirtilo na modulação da resposta imunológica a este alergénio, devido ao seu já documentado potencial anti-inflamatório procurando melhor elucidar o seu efeito juntamente com matriz alimentar na bioacessibilidade, biodisponibilidade e potencial inflamatório das proteínas do ovo. Para tal foram realizados estudos de digestão (oral, gástrica e intestinal) na presença e ausência de polifenóis sendo os péptidos analisados por LC-MS. Após a digestão, foi também analisado os efeitos dos polifenóis na bioacessibilidade com recurso a ensaios celulares Transwell usando-se linhas celulares do epitélio intestinal (Caco-2) dos péptidos. Por fim, foi analisado os níveis de interleucinas libertados juntamente com a interação entre proteína e polifenol por estudos de extinção de fluorescência. No geral, os polifenóis tiveram um efeito significativo da digestão do alergénio, quer por facilitar a sua clivagem durante a digestão diminuindo a quantidade de proteína intacta que atinge o lúmen intestinal e por suprimir a capacidade dos péptidos imunogénicos de se deslocarem através das células. Concluindo, o consumo de polifenóis revelou-se como uma possível estratégia na atenuação dos sintomas da alergia a proteínas do ovo.

Palavras-chave: Nutracêutica, Polifenóis, Alergias Alimentares, Ovalbumina

# Índice

|                                                                           |      |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| Lista de tabelas.....                                                     | vii  |
| Lista de figuras .....                                                    | viii |
| Lista de abreviações .....                                                | xii  |
| 1. Introdução                                                             |      |
| 1.1-Humanidade e alimentação: mais que uma necessidade fisiológica.....   | 1    |
| 1.1.1-Evolução da relação entre Homem e alimentação.....                  | 1    |
| 1.1.2- Nutrição- alimentação e os seus efeitos na saúde.....              | 2    |
| 1.2-Nutracêutica- Uma nova área de investigação.....                      | 4    |
| 1.2.1- Polifenóis- O que são e os seus efeitos no organismo.....          | 6    |
| 1.2.2- Chá verde como fonte de polifenóis.....                            | 10   |
| 1.2.3- Mirtilos como fontes de polifenóis.....                            | 12   |
| 1.3- Alergias Alimentares.....                                            | 13   |
| 1.3.1- Alergia ao ovo.....                                                | 17   |
| 1.4- Polifenóis e alergias alimentares.....                               | 19   |
| 2. Objetivos.....                                                         | 21   |
| 3.Métodos.....                                                            | 22   |
| 3.1- Preparação de extrato de chá verde.....                              | 22   |
| 3.2- Preparação de extrato de mirtilo.....                                | 23   |
| 3.3- Extração da proteína do ovo.....                                     | 23   |
| 3.4- Digestão de ovo.....                                                 | 24   |
| 3.4.1- Preparação de digestos para os ensaios celulares.....              | 25   |
| 3.5- Análise da digestão de ovo por eletroforese.....                     | 26   |
| 3.6- Manutenção e crescimento de culturas celulares.....                  | 27   |
| 3.7- Biodisponibilidade e bioacessibilidade de péptidos imunológicos..... | 27   |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.8- Libertação de citocinas pró-inflamatórias IL-8.....                     | 28 |
| 3.9- Caracterização da interação proteína-polifenol.....                     | 28 |
| 4.Resultados e Discussão.....                                                | 30 |
| 4.1-Preparação e caracterização de extratos de chá verde e mirtilo.....      | 30 |
| 4.2- Preparação de extrato de proteína de ovo.....                           | 34 |
| 4.3- Digestibilidade das proteínas na presença de diferentes polifenóis..... | 36 |
| 4.4- Biodisponibilidade dos péptidos imunogénicos.....                       | 42 |
| 4.4.1- Transporte transepitelial de péptidos imunogénicos.....               | 48 |
| 4.5- Secreção de IL-8 pelas células Caco-2.....                              | 54 |
| 4.6- Caracterização da interação proteína-polifenol.....                     | 55 |
| 5. Discussão.....                                                            | 59 |
| 6.Perspetivas Futuras.....                                                   | 60 |
| 6.Referências.....                                                           | 61 |



## Lista de Tabelas

Tabela 1-Quantidade de proteína num ovo de classe A

Tabela 2- Quantidade de polifenol numa dose de chá verde e de mirtilo

Tabela 3. Identificação dos compostos presentes no extrato de chá com indicação do tempo de retenção, do  $m/z$  molecular e do respetivo padrão de fragmentação.

Tabela 4. Identificação dos compostos presentes no extrato de mirtilo com indicação do tempo de retenção, do  $m/z$  molecular e do respetivo padrão de fragmentação.

Tabela 5- - Determinação da concentração de ovalbumina nos extratos de clara e gema

Tabela 6- Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de clara; efeitos da digestão com polifenóis na produção destes

Tabela 7- Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de gema; efeitos da digestão com polifenóis na produção destes

Tabela 8 Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de clara; efeitos da digestão com polifenóis na sua bioacessibilidade

Tabela 9- Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de gema; efeitos da digestão com polifenóis na sua bioacessibilidade

Tabela 10- Constantes de Stern-Volmer para a interação de albumina sérica humana com diversas catequinas e antocianinas

## Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas químicas dos polifenóis

Figura 2- Estruturas químicas dos flavonóides

Figura 3- Mecanismo de tolerância e de reação alérgica. Imagem obtida com recurso ao programa *BioRender*.

Figura 4- Cromatograma de extrato de chá verde analisado por HPLC-MS a 280 nm; os picos presentes estão numerados sendo a sua identificação efetuada na Tabela 3.

Figura 5- Cromatograma de extrato de mirtilo analisado por HPLC-MS a 5200 nm; os picos presentes estão numerados sendo a sua identificação efetuada na Tabela 4.

Figura 6- Representação gráfica (à esquerda) da absorvância a 595 nm em função da concentração de ovalbumina (tabela) e apresentação da respetiva regressão linear (à direita)

Figura 7- Gel de eletroforese da digestão de extrato e clara liofilizada na presença e ausência de polifenóis.

Figura 8- Gel de eletroforese da digestão de extrato e gema liofilizada na presença e ausência de polifenóis.

Figura 9- Cromatogramas dos digestos de: gema isolada analisado por HPLC-MS a 280 nm (a preto); gema + GTE (a vermelho); gema + BBE (a verde).; em modo *Mass range* [1112.6612-1114.5612, 753.0014-755.0014] (A); [1145.4937, 1147.4937] (B); [719.9713-721.9713] (C); [830.4697-832.4697, 738.9701-740.9701] (D). Identificação dos picos na tabela 7

Figura 10- Influência da digestão de polifenóis na produção de péptidos imunogénicos da gema de ovo

Figura 11- Cromatogramas dos digestos de: gema isolada analisado por HPLC-MS a 280 nm (a preto); gema + GTE (a vermelho); gema + BBE (a verde).; em modo *Mass range* [1112.6612-1114.5612, 753.0014-755.0014] (A); [1145.4937, 1147.4937] (B); [719.9713-721.9713] (C); [830.4697-832.4697, 738.9701-740.9701] (D). Identificação dos picos na tabela 7

Figura 12- Influência da digestão de polifenóis na produção de péptidos imunogénicos da gema de ovo

Figura 13- Cromatogramas de digestos de clara analisados por HPLC-MS a 280 nm antes de absorção (a preto); fase apical do digesto de clara após ensaio de bioacessibilidade (a vermelho); fase apical do digesto de clara + GTE após ensaio de bioacessibilidade (a verde); fase apical do digesto de clara + BBE após ensaio de bioacessibilidade (a azul). em modo *Mass range*: [829.9181, 831.9181, 565.3115-567.3115] (A); [929.5011-931.5011, 672.333-674.333] (B); [579.7940-581.7940] (C); [625.7794-627.7794]. Identificação dos picos efetuada na Tabela 8.

Figura 14- Influência da digestão de polifenóis na bioacessibilidade de péptidos imunogénicos da clara de ovo. Resultados estatisticamente diferentes estão assinalados com letras diferentes

Figura 15- Cromatogramas de digestos de gema analisados por HPLC-MS a 280 nm antes de absorção (a preto); fase apical do digesto de gema após ensaio de bioacessibilidade (a vermelho); fase apical do digesto de gema + GTE após ensaio de bioacessibilidade em modo *Mass range* [1112.6612-1114.5612, 753.0014-755.0014] (A); [1145.4937, 1147.4937] (B); [719.9713-721.9713] (C); [830.4697-832.4697, 738.9701-740.9701] (D). Identificação dos picos na tabela 9

Figura 16- I Influência da digestão de polifenóis na bioacessibilidade de péptidos imunogénicos da gema de ovo. Resultados estatisticamente diferentes estão assinalados com letras diferentes.

Figura 17- Ensaio de libertação de IL-8 após exposição a péptidos imunogénicos. As duas primeiras filas correspondem aos standards.

Figura 18- Espectro de emissão de fluorescência (exc= 290 nm) de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de polifenóis de chá verde.

Figura 19- Espectro de emissão de fluorescência (exc= 290 nm) de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de polifenóis de mirtilo.

Figura 20- Equações de Stern- Volmer para a interação de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) com quantidades crescentes de polifenóis de chá verde

Figura 21- Equações de Stern- Volmer para a interação de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) com quantidades crescentes de polifenóis de chá verde

## Lista de Abreviações

|      |                                                       |
|------|-------------------------------------------------------|
| FCUP | <b>FACULTY OF SCIENCES OF THE UNIVERSITY OF PORTO</b> |
| UP   | UNIVERSITY OF PORTO                                   |
| C    | CATEQUINA                                             |
| EC   | EPICATEQUINA                                          |
| EGC  | EPIGALHOCATEQUINA                                     |
| EGCG | EPIGALHOCATEQUINA GALHATO                             |
| ECG  | EPICATEQUINA GALHATO                                  |
| GTE  | <i>GREEN TEA EXTRACT</i>                              |
| BBE  | BLUEBERRY EXTRACT                                     |

# 1. Introdução

## 1.1-Humanidade e alimentação: mais que uma necessidade fisiológica

Na segunda metade do séc. XX, o filósofo americano Abraham Maslow publicou a obra “*Theory of Human Evolution*”, onde apresentou pela primeira vez a “Pirâmide das Necessidades Humanas”. Nesta ilustração ordenou numa estrutura hierárquica as diferentes necessidades humanas de acordo com a sua importância para a vida de um indivíduo, sendo que a alimentação foi colocada na base da pirâmide, ao lado de outras necessidades fisiológicas.

Esta relação entre Homem e alimentação é de extrema importância e, como veremos adiante, tem sofrido alterações ao longo do tempo.

### 1.1.1-Evolução da relação entre Homem e alimentação

No início da nossa história como espécie, o Homem não tinha a capacidade de escolher o que comer, a sua preocupação era encontrar o suficiente para sobreviver, por isso este período de tempo é caracterizado por uma grande variabilidade das dietas dos indivíduos, intercalando períodos de fartura com períodos de escassez de alimento (1); mais ainda estes períodos estavam fora do controlo do Homem sendo maioritariamente influenciados por fatores geográficos e meteorológicos. Os indivíduos deste tempo, apesar disso, possuíam uma dieta equilibrada com alto teor de alimentos de origem vegetal, proveniente de sementes e outras plantas comestíveis que encontrassem, e alimentos de origem animal proveniente dos animais que estivessem próximos do local que habitavam. Esta dieta, rica em proteínas e pobre em gorduras manteve-se praticamente inalterada até, aproximadamente 10 000 anos atrás, a revolução agrícola (2). Esta revolução permitiu um aumento da estabilidade das dietas do Homem, e ainda uma alteração do seu conteúdo; a dieta que apresentava previamente um equilíbrio entre alimentos de origem vegetal e animal passou a ter um excesso de alimentos de origem vegetal. Este rácio nunca voltou a ser totalmente restaurado, mas a introdução da criação de gado voltou a induzir mudanças significativas na dieta do ser humano.

Muito à frente, a Revolução Industrial voltou a causar alterações no perfil alimentar do Homem. A introdução de técnicas de processamento de alimentos modernas permitiram que produtos como cereais refinados e óleos vegetais passassem a ser mais procurados que as alternativas não processadas, e o desenvolvimento de melhores métodos de transporte e técnicas de preservação de alimentos levaram a uma possibilidade de seleção nunca antes vista e que se tinha agora tornado independente dos fatores que a tinham antes constringido.

Mais ainda, a reprodução selecionada que se foi realizando ao longo dos séculos quer na agricultura, como a procura de espécies capazes de produzir mais e mais resistentes a fatores externos, quer na criação de gado(3), como a procura de espécies capazes de acumular maiores teores de gordura; permitiram o selecionamento de características desejáveis e eliminação das indesejáveis.

Entrou-se num período nunca antes visto, com uma seleção de alimentos diversos e com a capacidade de se escolher o que se quisesse, quando se quisesse. Longe estavam os tempos em que a alimentação era só uma necessidade fisiológica.

Assim, ao mesmo tempo que o desenvolvimento de novas técnicas e áreas permitiam ao Homem não ter de se voltar a preocupar mais com a comer só para sobreviver, abriu-se a possibilidade de se perceber melhor quais os efeitos da dieta de um indivíduo na sua qualidade de vida.

### 1.1.2- Nutrição- alimentação e os seus efeitos na saúde

Antes do conceito de nutrição ser sequer estabelecido, sociedades civilizadas sempre tiveram especial atenção à composição e integridade daquilo que consumiam. Pensadores como Hipócrates teorizavam que existia uma ligação entre alimentação e saúde, e durante muito tempo, o tratamento aceite para várias doenças consistia numa alteração da alimentação do doente. Além disso, alquimistas, na sua constante busca pelo “*elixir vitae*”, procuravam estudar alimentos de forma a melhor perceber as suas propriedades (4).

Em 1913, Cassimir Funk e a sua equipa de descendentes modernos de alquimistas, propuseram a ideia de uma “amina vital” ou vitamina presente no arroz baseada na observação que consumo de arroz não processado protegia uma população de galinhas contra a doença beribéri. Esta amina, foi posteriormente isolada em 1926 e denominada tiamina e sintetizada em 1936 sendo aí denominada de vitamina B1. Ao mesmo tempo,

em 1932, a vitamina C foi também pela primeira vez isolada, e o seu efeito protetor contra escorbuto documentado (5).

Já pela segunda metade do séc. XX, várias vitaminas tinham sido identificadas, e as suas capacidades de prevenir determinadas doenças documentada. Tal facto levou à criação de suplementos destes nutrientes e a sua venda como prevenção a várias doenças. Ao mesmo tempo, o enriquecimento de alimentos como cereais processados com micronutrientes revelou-se uma estratégia para assegurar a nutrição adequada de populações e a prevenção de doenças como anemia (com suplementos de ferro), raquitismo (com suplementos de vitamina D) e bócio (com suplementos de iodo).

Com tais descobertas, observou-se uma queda de casos de malnutrição em diversos países (6), sendo a estratégia de suplementação de alimentos comuns como cereais processados com micronutrientes implementada ainda hoje.

A descoberta de vitaminas e a sua influência na saúde do consumidor serviu para reafirmar que o que um indivíduo consome afeta a sua qualidade de vida. Tal possibilitou um maior investimento nesta área emergente permitindo-se depois a descoberta da relação entre certas doenças como as doenças coronárias e alta ingestão de gorduras ou ainda de consumo excessivo de açúcares e incidência de diabetes tipo 2.

Ao longo do tempo, foi também descoberto que grande parte dos efeitos observados na saúde de um indivíduo não se deviam à presença ou ausência de nutrientes específicos, mas à dieta na sua globalidade. Tal levou a que dietas como a dieta mediterrânea fossem destacadas pelos seus efeitos cardioprotetores enquanto que outras dietas como as dietas modernas fossem apontadas como a causa de várias doenças crónicas que afetam uma percentagem crescente da população dos países desenvolvidos (7).

Assim, em 1989, a Fundação por Inovação na Medicina em Nova Iorque criou o termo “nutracêutica” atribuindo um nome a esta área de investigação biomédica que apresentou um crescimento significativo na segunda metade do séc. XX. Passou a definir-se como nutracêuticos qualquer substância que pode ser considerada como alimento ou parte de alimento e que é responsável por efeitos benéficos na saúde do consumidor.

O estudo destes nutracêuticos e dos seus efeitos revela-se importante para satisfazer as novas necessidades da população, que agora, deixando de se preocupar com a



questão de ter ou não alimento suficiente para sobreviver, passa a se focar na qualidade do que consome e de potenciais efeitos na sua saúde.

## 1.2-Nutracêutica- Uma nova área de investigação

Com cada vez uma maior percentagem da população mundial a usufruir de “segurança alimentar”, definido como a capacidade de um dado consumidor ter acesso físico, social e económico a uma grande variedade de alimentos saudáveis e de qualidade pela *CFS*, “Committee on Food Security”, a maior preocupação de um consumidor atual passou a ser a qualidade de um dado produto e os efeitos que o consumo deste poderiam ter na sua saúde, de tal modo, o próprio consumidor, agora mais informado sobre a importância da nutrição na sua saúde passou a dar mais importância a fatores como a qualidade do alimento e os seus potenciais efeitos benéficos na saúde tornando-se estes fatores tão importantes na escolha de um produto como o seu preço, sabor e global apresentação(8).

Assim, tem dependido da Nutracêutica responder a este aumento de procura da população geral, tendo esta indústria emergente sido avaliada em 454.55 mil milhões de USD sendo ainda previsto uma taxa de crescimento anual composta de 9% (9).

A classificação de compostos como nutracêuticos é flexível, mas são atualmente definidos como compostos naturais bioativos que, para além do valor nutritivo *per se*, apresentam propriedades medicinais, ou capacidade de prevenir certas doenças. Podem ainda ser divididos em diferentes categorias de acordo com a sua origem podendo ser compostos bioativos alimentares ou compostos bioativos provenientes de plantas; podem ainda ser derivados de outras fontes e caso tenham c funções específicas como por exemplo perda de peso, culturismo ou ainda outras, são classificados como suplementos alimentares (10).

A primeira classe, engloba vários compostos comuns, conhecidos pela população geral como nutrientes. Por exemplo os carboidratos, que possuem um papel vital no organismo devido às suas propriedades fisiológicas ou funções importantes na regulação de atividade metabólica, já são estudados com o objetivo da sua inclusão em “functional foods”, alimentos que possuem benefícios para a saúde para além do seu valor nutricional (11). Exemplificando, o consumo de carboidratos, especialmente polissacarídeos, com alto teor de fibras e baixo teor de açúcares que apresentam uma

digestão lenta tem sido relacionado com a prevenção de desenvolvimento de doenças como cancro e diabetes; por outro lado, oligossacarídeos têm revelado uma capacidade promotora do desenvolvimento da flora intestinal permitindo assim uma prevenção da proliferação de espécies nocivas.

Também pertencentes à primeira classe de nutracêuticos, as propriedades cardio protetoras dos lípidos, especialmente do ácido ecosapentenóico, EPA, e ácido docosahexenóico, DHA pertencentes à família dos ómega-3 levou a que vários estudos tenham sido realizados de forma a elucidar o mecanismo pelo qual estes compostos afetam a saúde coronária. Este facto juntamente com a sua capacidade anti-inflamatória leva a que atualmente seja aconselhado um maior consumo desta família de lípidos quando comparadas com outras como a família dos ómega-6 (12).

Outros nutracêuticos também importantes são as vitaminas (13, 14) com conhecidas propriedades antioxidantes e outras papéis importantes na saúde. O consumo destes nutracêuticos é essencial não só para indivíduos que apresentem deficiências destas vitaminas, sendo que estas deficiências podem ser provenientes de dietas específicas como a dieta vegetariana ou determinadas escolhas de vida como fumar, mas também para prevenção de doenças crónicas, por exemplo, o consumo de dietas ricas em vitaminas como a vitamina C, tem sido relacionado a uma diminuição da incidência de cancro do estômago e o consumo acrescido de vitamina A leva a uma redução de sintomas da doença de Alzheimers.

Outros nutracêuticos também pertencentes à primeira categoria como os probióticos e prebióticos também demonstram resultados promissores, sendo os seus efeitos na flora intestinal e consequentemente na modulação de processos inflamatórios de especial importância (16).

A segunda classe de nutracêuticos engloba aqueles que têm origem botânica (9), sendo o mais antigo elemento deste grupo as plantas medicinais, estudadas já há séculos. Para além de possuírem um papel vital na preservação da saúde humana, muitas são hoje usadas como fármacos; alguns exemplos serão a morfina (*Papaver somniferum L.*) e fisostigmina (*Physostigma venenosum*).

Outros elementos do grupo de nutracêuticos de origem botânica são as antraquinonas, com o seu forte efeito laxativo, saponinas, importantes no tratamento de hipoglicemia, alcaloides, muito utilizados como fármacos devido à sua grande amplitude de usos, incluindo uso no tratamento da malária e ainda alguns tipos de cancro.

Por fim, e de especial importância para este projeto, destacam-se os polifenóis (16), com especial atenção dada aos taninos, um grupo de compostos fenólicos que devido ao seu efeito nos tecidos e proteínas funcionais do organismo atuam como adstringentes, e que apresentam ainda propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras e os flavonoides, compostos também com estrutura fenólica provenientes de frutas e vegetais com efeitos conhecidos na modulação da resposta alérgica, manutenção da saúde coronária entre outros.

Devido às suas propriedades e efeitos benéficos para a saúde, o consumo de nutracêuticos tem sido visto como uma maneira de combater o aumento de doenças crónicas como diabetes (17), doenças cardiovasculares (18), osteoporose (19) e cancro (20). Porém, tem sido difícil estabelecer uma relação entre consumo de suplementos destes compostos e um efeito acrescido na saúde (21). Mais ainda, o consumo de certos nutracêuticos numa quantidade superior ao normal pode causar lesões no organismo, como por exemplo, certos metabolitos do tanino epigallocatequina galato (ECGC) causam lesões no fígado (22).

Assim, avanços na área da Nutracêutica devem continuar a ser feitos de forma a perceber melhor o mecanismo pelo qual estes compostos bioativos afetam o organismo de forma a maximizar os seus efeitos benéficos e minimizar os seus efeitos prejudiciais.

### 1.2.1- Polifenóis- O que são e os seus efeitos no organismo

Em anos recentes, tem havido um aumento de interesse pelos investigadores no estudo de polifenóis. Isto deve-se ao facto que estes compostos, muito abundantes na nossa dieta, revelaram ter propriedades anti oxidativas, anti-inflamatórias e anti neurodegenerativas. Assim, um estudo sobre estes compostos é necessário pois um conhecimento mais aprofundado sobre a estrutura destes compostos e a forma como são metabolizados pelo organismo permitirá perceber melhor a relação entre consumo destes nutracêuticos e os seus efeitos no organismo.

Os polifenóis são compostos que apresentam um ou mais grupos hidroxilo ligados a um ou mais anéis aromáticos. São normalmente metabolitos secundários de plantas com função protetora contra radiação UV, entre outras (23).

De acordo com a sua estrutura, isto é, de acordo com o número de anéis fenólicos que possuem e a natureza dos grupos substituintes destes anéis, os polifenóis podem ser

divididos em não flavonóides, que inclui os ácidos fenólicos, estilbenos e lignanos e os flavonóis (24).

Os flavonoides podem ainda ser divididos em flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis. Mais ainda, os polifenóis podem encontrar-se ligados a outras moléculas, como por exemplo diversos carboidratos e ácidos orgânicos.

Existem duas classes de ácidos fenólicos (25), derivados do ácido benzoico e derivados do ácido cinâmico. Os ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico, como o ácido gálico, estão presentes maioritariamente em frutos vermelhos e são um componente essencial do chá, podendo chegar a valores de 4,5 g por kg de folhas de chá. Os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico, como o ácido cafeico, raramente estão presentes na sua forma livre estando mais frequentemente associados a ácido quínico formando ácido clorogénico, comum em diversos tipos de fruta.

Os lignanos (26), são maioritariamente encontrados na linhaça e são metabolizados pela flora intestinal e os estilbenos, presentes em quantidades muito baixas na dieta são encontrados no vinho sob a forma de resveratrol; foi proposto que este polifenol apresenta propriedades anti carcinogénicas, mas devido à sua baixa concentração será difícil atingir os valores necessários para se observarem estes efeitos numa dieta normal.

Dentro dos flavonoides (27), os flavonóis são os mais comuns sendo as principais fontes cebola, brócolos e mirtilo; os seus principais representantes são a quercetina e o kaempferol que podem se apresentar também na forma glicosilada. As flavonas como a luteolina e apigenina são menos comuns e as suas principais fontes são salsa e couve-de-folhas. Já as flavanonas, como a naringenina e hesperetina, são encontradas em

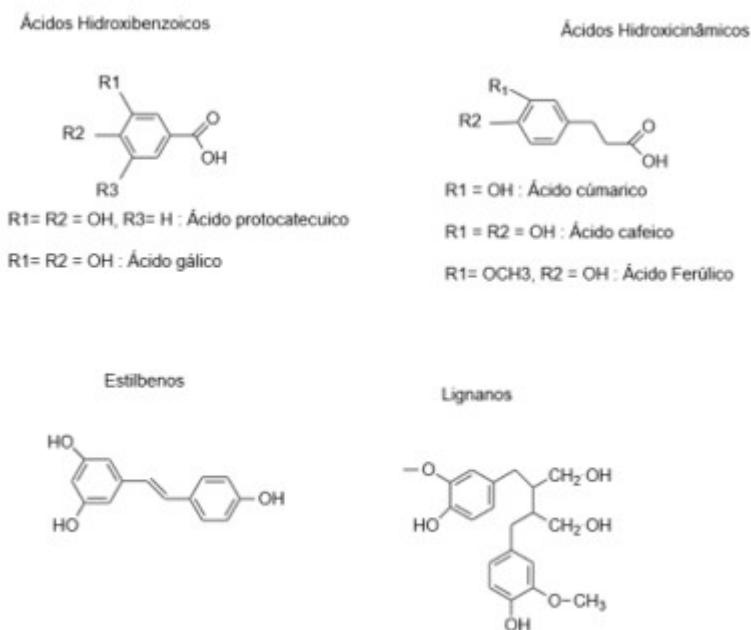


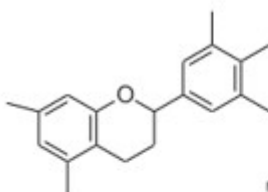
Figura 1- Estruturas químicas dos polifenóis

tomates, citrinos e certas plantas aromáticas como a menta, e apresentam-se também sob forma glicosilada.

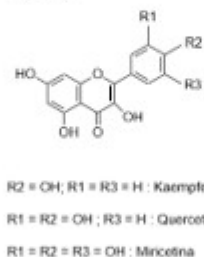
Isoflavonas (28) são encontradas maioritariamente em plantas leguminosas e os seus principais exemplos são a genisteína e gliciteína. Devido à sua semelhança estrutural com estrogénio possuem propriedades pseudohormonais podendo até ligar-se aos recetores de estrogénio do organismo.

Os flavanóis (29) podem existir como monómeros, catequinas, e sob a forma de polímeros, as proantocianidinas. As catequinas são encontradas maioritariamente em vinho tinto, mas a sua concentração em chá verde e chocolate é também considerável; galhocatequina e epigalhocatequina e epigalhocatequina galato são as formas principais do chá, enquanto que catequina e epicatequina são as formas principais de frutas. Ao contrário de outros

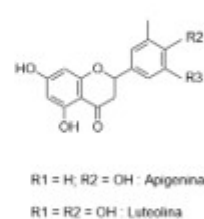
#### Flavonoides



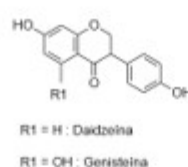
#### Flavonóis



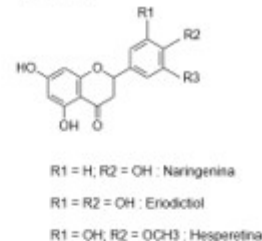
#### Flavonas



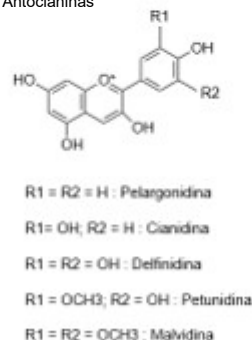
#### Isoflavonas



#### Flavanonas



#### Antocianinas



#### Flavan-3-ols

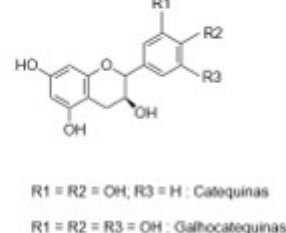


Figura 2- Estruturas químicas dos flavonóides

flavonóides, não costumam ser glicosiladas. Proantocianidinas, também denominadas de taninos condensados, são polímeros de catequinas com ligações C4 e C8 ou ainda

C4 e C6; formam complexos com proteínas salivares sendo responsáveis pela sensação de adstringência característica do vinho e fruta não madura.

Por fim, as antocianinas (30) são pigmentos com de cor entre o vermelho e o azul variando de acordo com o pH do meio. São produzidos na seiva vacuolar de frutas e são encontradas normalmente associadas a outras flavonoides ou ligadas a vários compostos orgânicos de forma a impedir a sua degradação. A cianidina-3-glucósido é a antocianina mais comum e na dieta humana estão maioritariamente presentes no vinho e frutos silvestres como os mirtilos, amoras e morangos.

Um ser humano irá obter a maior parte dos polifenóis da sua dieta a partir de frutas vegetais ou bebidas derivadas (31). A quantidade de polifenóis presentes nestes alimentos varia muito entre espécies diferentes e mesmo dentro da mesma espécie sendo que fatores como a exposição solar e tipo de solo podem afetar seriamente a quantidade de polifenol presente numa peça de fruta. Mais ainda, o próprio processo de preparação do alimento para consumo, como por exemplo o ato de cortar a casca da fruta, diminui a quantidade de polifenóis que um indivíduo consome e alimentos como tomates ou cebolas perdem grande parte do seu teor de polifenóis após ferver. Certos métodos de preparação de alimentos podem ser utilizados de forma a preservar o valor nutricional dos alimentos, por exemplo, cozinhar os vegetais com vapor leva a uma manutenção dos polifenóis que se perdem durante a preparação dos alimentos.

Processos fora do controlo do indivíduo, como o processamento industrial podem também afetar o valor nutricional do alimento.

As quantidades de polifenóis consumido variam entre diferentes regiões e mesmo o tipo de polifenol consumido principalmente pode também ser diferente. Por exemplo, países asiáticos (32), devido ao seu alto consumo de soja vão ter um elevado consumo de isoflavonas quando comparados com outras regiões como a Europa ou Américas, onde o consumo de soja não é tão popular. Países onde o consumo de vinho é comum terão um maior consumo de catequinas e proantocianidinas. Estas variações de consumo de polifenóis podem mesmo ser detetadas dentro de populações mais pequenas, sendo justificadas pelos diferentes estilos de vida de cada um; indivíduos que consumam café com frequência terão uma taxa de consumo de ácidos fenólicos superior a indivíduos que optem por outras bebidas e indivíduos que optem por consumir mais fruta consumirão mais polifenóis do que aqueles que não o façam.

Após consumo, a quantidade de polifenóis que é efetivamente absorvida pelo indivíduo difere da quantidade consumida (33). Isto deve-se ao facto de que a absorção de

polifenóis não é linear e é afetada por diversas interações tanto a nível da matriz alimentar como dentro do próprio organismo. Enquanto que polifenóis na sua forma mais simples podem ser absorvidos diretamente no intestino delgado, a grande maioria dos polifenóis mais complexos chega ao intestino e sofre metabolização por ação de enzimas digestivas e em certos casos, da própria flora intestinal ocorrendo só depois a absorção (34, 35); após este processo de absorção, os polifenóis são conjugados em reações do metabolismo de fase II ou no fígado ou no intestino delgado. No geral, a absorção de diferentes polifenóis depende de vários fatores sendo que os polifenóis que chegam ao intestino na sua forma mais simples são absorvidos com mais facilidade enquanto que aqueles que chegam glicosilados têm uma taxa de absorção inferior. De todos os polifenóis, as proantocianidinas têm a absorção mais dificultada devido à sua massa molecular superior quando comparada com outros compostos.

Pouco se sabe do mecanismo pelo qual os polifenóis são capazes de passar a membrana celular das células do trato intestinal. Entre os diversos tipos de transporte temos a difusão passiva, que é pouco provável devido ao tamanho e hidrofília dos polifenóis, e também o transporte ativo e facilitado por transportador (36).

Os polifenóis após absorvidos sofrem uma de três reações de conjugação, metilação sulfonação ou glucuronidação e são transportadas no sangue associados a proteínas plasmáticas até chegarem ao tecido alvo; a proteína principal responsável por esta ligação é a albumina sérica humana (HSA).

Os metabolitos resultantes dos polifenóis podem ser excretados pela via urinária ou pela via biliar; propõe-se que os metabolitos de maiores dimensões são excretados pela via biliar enquanto que aqueles de menores dimensões serão excretados pela via urinária (37).

### 1.2.2- Chá verde como fonte de polifenóis

Vários alimentos podem ser apontados como fontes ricas em polifenóis, sendo por isso o seu consumo aconselhado às populações; o chá, especialmente chá verde, destaca-se devido à sua popularidade, sendo a bebida mais consumida imediatamente a seguir à água e conseguindo ultrapassar alternativas como café e bebidas refrigeradas (38). A acessibilidade e oferta existente torna o chá um produto fácil de encontrar em qualquer

estabelecimento; e a simplicidade de preparação do produto garante que qualquer indivíduo seja capaz de adquirir o produto e também de o preparar e consumir.

O chá pode ser categorizado em três categorias distintas, todas preparadas a partir da planta *Camellia Sinensis*, sendo que a classificação depende do grau de fermentação das folhas utilizadas; chá verde utiliza folhas não fermentadas, chá oolong utiliza folhas parcialmente fermentadas enquanto que chá preto utiliza folhas totalmente fermentadas.

O segredo para os benefícios para a saúde por detrás do consumo de chá verde consiste no facto de este possuir uma grande quantidade de polifenóis, sendo os seus constituintes principais os flavanóis epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigallocatequina galato (EGCG). Os altos teores de EGCG presentes no chá verde comparando com os outros tipos de chá são devido ao processo de preparação; ao contrário das duas outras alternativas, na preparação deste chá, as folhas são cozidas a vapor impedindo assim que ocorra oxidação das catequinas (39).

Atualmente, estudos científicos conseguiram demonstrar uma ligação entre o consumo de chá verde e uma grande diversidade de efeitos benéficos na saúde, à semelhança do conhecido “Paradoxo Francês” (40). O “Paradoxo Francês” propõe que a razão pela qual a população francesa tinha uma menor incidência de doenças coronárias quando comparada com outras populações como a americana apesar de ambas possuírem uma dieta com níveis de gordura semelhantes, devia-se ao facto de a primeira população consumir muito mais vinho tinto que a segunda. No caso do chá, a baixa incidência de doenças coronárias nas populações asiáticas deve-se ao seu alto consumo de chá verde, por exemplo. Tal facto pode ser justificado pela capacidade de o consumo de chá verde promover saúde coronária ao diminuir os níveis de colesterol endógeno, ao aumentar os níveis de colesterol excretado, e diminuindo os níveis de colesterol absorvido.

.

Para além do seu papel na redução dos níveis endógenos de colesterol, também estão propriedades anti carcinogénicas do chá verde. A deteção de níveis de incidência de cancro mais baixos em populações com alto de consumo de chá verde levou à realização de estudos com o intuito de confirmar se existia ou não uma ligação entre estes dois acontecimentos. Tais estudos permitiram concluir que a EGCG possuía um



papel importante na inibição da proliferação de diferentes tumores (41); tal deve-se ao facto que níveis altos deste polifenol não só inibiam a libertação do fator de necrose tumoral alfa, TNF- $\alpha$ , que se teoriza ser responsável pela estimulação do desenvolvimento tumoral, mas também, níveis altos de EGCG inibiam a ligação de promotores de proliferação de tumores aos seus recetores.

Por fim, o consumo de chá verde está também associado a uma melhoria da saúde da pele (ao protege-la de danos induzidos por luz UV) a uma diminuição de peso, e ainda à regulação de processos inflamatórios.

### 1.2.3- Mirtilos como fontes de polifenóis

Introduzidos como uma espécie de “superfruta”, os mirtilos foram ganhando fama pelos seus efeitos benéficos na saúde: aqueles que os consumissem observariam melhorias na sua saúde cardiovascular; e foram também reportados, os seus efeitos na prevenção de diabetes e na prevenção da neurodegeneração. Por fim, outra é que estes efeitos benéficos na saúde eram alcançados mesmo com um consumo de uma quantidade moderada de fruta (42).

Um dos principais problemas é que os mirtilos são uma fruta frágil que após colheita necessita de ser preservada. Tal pode ser alcançado quer ao congelar a fruta quer ao secá-la, sendo que ambos os processos não reduzem significativamente o valor nutricional do alimento. Após preservação podem ser processados de forma a se obter uma grande variedade de alimentos como sumos, compotas e outros, porém durante o processo de processamento ocorre perda de algum teor polifenólico.

Os mirtilos são uma planta arbustiva pertencente à família *Ericaceae* nativos da Eurásia (43). São uma planta de pequeno porte cujo fruto é uma baga que quando madura adquire uma cor azul arroxeada com sabor ácido-doce. Devido ao facto de se adaptar bem em diversos climas, tanto zonas húmidas como zonas secas, são cultivada numa grande variedade de sítios e consumida por um grande número de pessoas. O seu maior exportador são os Estados Unidos da América com uma produção anual de aproximadamente 294.000 toneladas. Portugal é também um dos maiores exportadores produzindo cerca de 15420 toneladas em 2020 (44).

Os mirtilos destacam-se pelo seu alto teor em antocianinas, cerca de 60%, sendo que adquirem a maioria destes compostos durante o amadurecimento da fruta. Possuem

também outros polifenóis como proantocianidinas e compostos não fenólicos como o ácido clorogénico (45).

A associação entre mirtilos e saúde coronária está já bem estudada, com vários estudos a demonstrar uma relação entre consumo desta fruta e uma redução de aproximadamente 25% no risco de ocorrência de doenças cardiovasculares (46). Tal relação é justificada pelos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos polifenóis presentes nos mirtilos; consumo desta fruta está relacionada a um efeito positivo nos níveis de lípidos presentes no plasma e no metabolismo da glucose e um efeito protetor geral na saúde dos vasos sanguíneos. Propõe-se que este efeito será causado por alterações no metabolismo de óxido nítrico (NO) e na composição da membrana lipídica.

Outros efeitos benéficos de consumo de mirtilos é numa diminuição na incidência de diabetes tipo 2 (47), devido aos seus efeitos no metabolismo da glucose e na flora intestinal ao favorecer o desenvolvimento de bactérias produtoras de mucinas capazes de proteger o trato intestinal. Foram também explorados os efeitos do consumo de mirtilos na saúde de neurónios encontrando-se uma relação entre o consumo desta fruta e uma diminuição da neurodegeneração. Por fim, outros estudos permitiram elucidar os efeitos do consumo de mirtilos na saúde ocular e qualidade de visão (48).

### 1.3- Alergias Alimentares

Conhecimentos mais aprofundados sobre os efeitos de diferentes alimentos na saúde humana juntamente com uma abundância de alimentos nunca antes vista levou a alterações no tipo de doenças que mais afetam as populações. Enquanto que doenças devido a insuficiências nutricionais como raquitismo, escorbuto entre outras, tornam-se cada vez menos comuns em países desenvolvidos, esta mesma facilidade de adquirir diferentes alimentos para consumo está por detrás do aumento da incidência de doenças crónicas como diabetes, obesidade e ainda alergias alimentares (49).

Dentre estas, a incidência das alergias alimentares tem aumentado significativamente nas últimas décadas representando agora uma porção significativa dos gastos na saúde

pública dos países desenvolvidos, foram gastos aproximadamente 24.8 mil milhões de dólares ou 4184 dólares por indivíduo afetado em 2013 (50).

De forma a combater este problema crescente, vários avanços quer na deteção de possíveis alergénios usando-se alergénios recombinantes, quer no conhecimento do mecanismo responsável por esta reação permitiram um aumento da qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Porém, o método mais eficaz de combater alergias alimentares, continua a ser evitar a exposição ao alergénio, sendo que os tratamentos atuais tendem a se focar mais na redução de sintomas do indivíduo após exposição ao alergénio. Assim, estudos que se foquem em descobrir métodos de atenuar sintomas após exposição ou até prevenir completamente o seu aparecimento mostram-se cada vez mais relevantes.

Alergias alimentares englobam um conjunto de diversos mecanismos imunológicos que são induzidos após ingestão de alergénios (51, 52, 53). Na sua forma mais comum, esta doença caracteriza-se por uma hipersensibilidade em que diversos anticorpos IgE se ligam a mastócitos e basófilos levando à libertação de vários mediadores que induzem respostas fisiológicas em vários tecidos. Em alergias alimentares, a maioria das respostas é mediada pelos anticorpos IgE sendo este tipo de alergia alimentar também denominado de alergia alimentar tipo 1. Alergias alimentares podem também

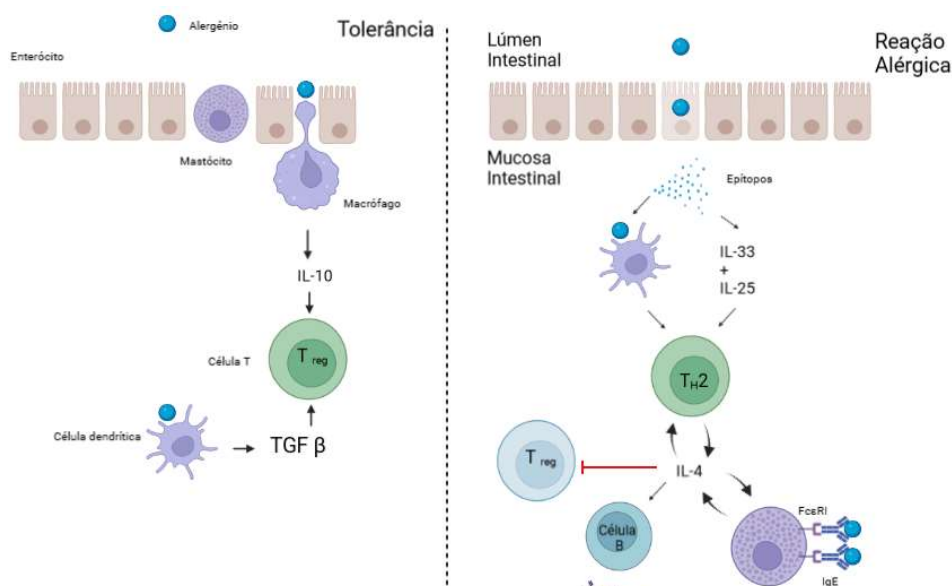


Figura 3- Mecanismo de tolerância e de reação alérgica. Imagem obtida com recurso ao programa *BioRender*.

manifestarem-se cronicamente sendo que aqui a ativação de mastócitos é feita maioritariamente por células-T.

Tal reação ocorre caso o organismo seja incapaz de distinguir proteínas inofensivas provenientes de diversos alimentos de patogéneos incluindo parasitas. Em indivíduos hipersensíveis após absorção os alergénios irão interagir com IgE e o seu recetor de alta afinidade FCER1 presente em mastócitos da mucosa e em basófilos em circulação. É desencadeada então uma cascata de sinalização que é iniciada pela enzima tirosina-proteína quinase, codificada pelo gene SYK que leva à exocitose de grânulos contendo histamina e à síntese *de novo* de lípidos como ácido araquidónico e prostaglandinas. Estes mediadores irão desencadear então uma série de respostas fisiológicas incluindo vasodilatação, aumento de permeabilidade dos vasos sanguíneos, e ativação de nervos que sinalizam a sensação de urticária entre outros.

A ativação de mastócitos e basófilos induz também a transcrição de citocinas como a IL-4 e IL-13 que promovem a atividade de células  $T_H^2$  e inibem a atividade de células T reguladoras.

Normalmente, os sintomas aparecem alguns minutos após ingestão e mais raramente após algumas horas e caso não sejam tratados, podem induzir anafilaxia. A ativação contínua dos mediadores de resposta alérgica pode causar urticária, em que o plasma se acumula na derme superficial e ocorre acumulação de fluídos no trato intestinal. Caso seja no intestino, esta acumulação pode causar dores e obstrução do trânsito intestinal; caso seja na laringe pode obstruir completamente as vias respiratórias impedindo o indivíduo de respirar. Choque anafilático está mais associado ao consumo de nozes, amendoins e marisco, mas pode ocorrer após consumo de diversos alimentos como leite e ovos em crianças.

A indução de resposta alérgica depende da capacidade do organismo de tolerar a presença de antígenos. Num organismo saudável, os mecanismos vistos anteriormente, como a indução da atividade de mastócitos e produção de anticorpos IgE específicos, são regulados por células  $T_H^2$   $CD4^+$  sendo a supressão destes mesmos processos regulados por células T reguladoras; a ativação destas células é dependente das células apresentadoras de antígenos, APC, que ingerem antígenos e os inserem em complexos MHC. Normalmente, um antígeno é capaz de passar o lúmen gastrointestinal quer ao transitar entre enterócitos ou ao ser transportado por recetores específicos. Ao mesmo tempo, células capazes de sentir a presença destes antígenos,

como macrófagos que possuam dendrites inseridas entre enterócitos ou células dendríticas induzem a atividade de células T reguladoras através da produção de IL-10 e do fator TGF- $\beta$  respetivamente. Após absorção, os alergénios são transportados para o sistema da veia-porta onde entram em contacto com as células responsáveis pela produção de tolerância imunológica.

Em indivíduos hipersensíveis, ou em indivíduos que possuem o epitélio intestinal danificado, os macrófagos e células dendríticas referidas anteriormente adquirem um fenótipo que leva a uma ativação preferencial de células T-Helper,  $T_H^2$ , que após ativação pelos agora alergénios levam à produção de IL-4 que desencadeia os vários mecanismos da resposta alérgica; entre eles a indução de uma alteração do fenótipo IgE, expansão de mastócitos e, num sistema de feedback positivo, produção de novas células  $T_H^2$ . Ao mesmo tempo, IL-4 é capaz também de inibir a função das células tolerogénicas T reguladoras e converte estas em células linfoides inatas, ILC2, que são mais uma fonte de IL-4 assim como de IL-13 e são capazes também de inibir células T-reguladoras.

Esta indução de atividade das células  $T_H^2$  e supressão da atividade de células T reguladoras, é também afetada pelo estado da microbiota e dos metabolitos por esta produzidos.

Como anteriormente referido, os tratamentos atuais para as alergias alimentares consistem maioritariamente numa estratégia de evitar o alergénio após prévia identificação com testes como testes (54, 55). Entre os testes mais comuns temos os testes cutâneos onde a capacidade do indivíduo de produzir anticorpos IgE ligados a mastócitos cutâneos é avaliada pela presença de pequenos inchaços vermelhos e que causam comichão após exposição a antígenos, ou a eliminação de certos alimentos de acordo com o historial clínico dos indivíduos e das suas famílias. Caso estejamos perante um caso em que já ocorreu exposição a alergénios, o tratamento de conjuntivite e urticária com anti histamínicos é aconselhado e em indivíduos em possível choque anafilático, uma injeção de adrenalina é necessária, devido à sua capacidade de inverter os efeitos dos mediadores de resposta alérgica ou melhorar a função do miocárdio através da sua interação com os recetores adrenérgicos  $\beta_1$  e o seu efeito broncodilatador através da sua interação com os recetores adrenérgicos  $\beta_2$ . Para casos em que a resposta alérgica é de longa duração, o tratamento com corticosteroides é utilizado devido aos seus efeitos mais lentos, mas de longa duração.

### 1.3.1- Alergia ao ovo

A seguir à alergia ao leite, a alergia ao ovo é a segunda alergia alimentar mais comum em bebés e crianças (56). Estima-se que aproximadamente 2% da população infantil sofre desta alergia, porém, aproximadamente 70% dessa população deixará de manifestar esta doença até aos 16 anos. Esta alergia manifesta-se maioritariamente na segunda metade do primeiro ano de vida após primeira exposição ao alergénio. Estima-se que 4% dos indivíduos afetados percam esta doença aos 4 anos, 12% aos 6 anos, 37% aos 10 anos e aproximadamente 70% aos 16 anos. Indivíduos que possuam tolerância a proteína de ovo desnaturada por calor têm uma maior probabilidade de ultrapassar a doença.

Em crianças hipersensíveis, os sintomas mais comuns são o aparecimento rápido de urticária, aproximadamente 2 minutos após digestão, e apesar de menos comuns, reações que envolvam o trato gastrointestinal foram também reportadas. Em pacientes imuno-comprometidos, especialmente aqueles com asma, choque anafilático é uma possibilidade sendo por isso a exposição a este alergénio possivelmente fatal. Esta alergia alimentar, tal como as outras, pode causar choque anafilático sendo por isso os pacientes aconselhados a terem consigo um injetor de adrenalina juntamente com um plano de emergência (57).

Devido à sua taxa de incidência significativa e mais importantemente ao facto de ovos serem não só um alimento extramente comum e benéfico para a saúde devido ao seu alto teor de proteína animal, mas também ao papel importante de ingredientes derivados de ovos como a proteína ovalbumina em medicação como vacinas (58) como a do vírus *influenza*, capazes de atingir valores de 45 µg/mL; estudos mais aprofundados sobre esta alergia são essenciais para uma melhor qualidade de vida de indivíduos afetados.

A alergia ao ovo consiste num conjunto de reações adversas induzidas por proteínas de ovo.

Foram identificadas 5 proteínas nos ovos da galinha comum (59), *Gallus domesticus*, capazes de desencadear resposta alérgica: estas são a ovomucóide (glicoproteína com 28 kDa e 186 resíduos de aminoácidos), também denominada de Gal d 1, a ovalbumina (Gal d 2, 45 kDa e uma sequência de 385 resíduos de aminoácidos), a ovotransferrina (Gal d 3, 77 kDa e 686 resíduos de aminoácidos), a lisozima (Gal d 4, 14.3 kDa e 129 resíduos de aminoácidos) todas presentes na clara e a α-livetina (Gal d 5) presente na gema. Apesar da ovalbumina ser a proteína mais abundante, correspondendo a cerca de 54% do total de proteínas da clara de ovo, foi demonstrado que a ovomucóide que

corresponde a cerca de 11% do total de proteínas da clara de ovo desencadeia uma resposta alérgica mais significativa. Para além do elevado conteúdo proteico, o ovo é também uma fonte de gorduras bem como vitaminas do complexo B, A e D sendo que o consumo de um ovo por dia corresponde a 40% das necessidades diárias recomendadas de biotina e 20% de riboflavinas. São também uma boa fonte de sais minerais, porém possuem uma quantidade de ferro relativamente baixa.

Esta alergenicidade das proteínas do ovo deve-se principalmente à sua resistência ao calor e às enzimas digestivas (56). De forma a dar origem a uma resposta imune, um alergénio deve estimular tanto células T como B. A porção do alergénio responsável por esta estimulação designa-se de epítopo podendo estes ser sequenciais ou conformacionais dependendo dos aminoácidos que os formam. As estruturas formadas por epítomos conformacionais são suscetíveis ao calor, enquanto que as formadas por epítomos sequenciais são mais estáveis; assim, e devido à capacidade de IgEs específicas para as proteínas do ovo de diferenciar entre estes dois tipos de epítomos, epítomos diferentes estão associados a respostas alérgicas diferentes, com epítomos sequenciais a serem associados a resposta alérgica persistente e epítomos conformacionais a uma resposta alérgica transiente.

Quanto às proteínas do ovo, a proteína ovomucóide é especialmente resistente ao calor e à ação de proteases devido à presença de fortes ligações dissulfureto entre os resíduos de cisteína capazes de estabilizar esta proteína. Por outro lado, a ovalbumina é suscetível ao calor sendo que crianças que apresentam alergia maioritariamente a esta proteína são capazes de tolerar proteína desnaturada por temperaturas elevadas, mas em certos casos, as propriedades alergénicas desta proteína mantêm-se mesmo após desnaturação. Já na gema de ovo, a  $\alpha$ -livetina é o alergénio principal sendo também resistente ao calor e à ação de enzimas digestivas tendo por isso uma absorção lenta e difícil pelo organismo.

Em adultos é ainda possível associar esta alergia a outras alergias não-alimentares mediadas por IgEs; por exemplo em trabalhadores em indústrias que processam ovos ou padeiros que estejam expostos a proteína de ovo aerossolizada é possível detetar um número superior de casos de asma.

O diagnóstico desta alergia pode ser efetuado após análise do historial do paciente bem como testes físicos como testes cutâneos. As crianças que são diagnosticadas com esta alergia são educadas de forma a saber evitar os alimentos que possam desencadear uma resposta alérgica e a saber tratar dos seus sintomas caso ocorra exposição

acidental. Devido à prevalência do ovo em diversos alimentos e ao seu valor nutricional a exclusão deste e dos seus derivados pode causar algumas deficiências nutricionais, assim pacientes diagnosticados com esta alergia costumam ser acompanhados por um nutricionista.

Mais ainda, devido à possibilidade de “*cross-contamination*” mesmo alimentos que não sejam preparados com ovos possuem na mesma a possibilidade de apresentar alguns alérgenos caso sejam preparados no mesmo sítio. Certos alimentos como sopas, vinhos e ainda pão não possuem ovos na sua constituição, no entanto fazem uso da clara de ovo no seu processamento.

Devido à abundância de ovo e dos seus derivados na nossa dieta, e da sua importância como fonte de proteína animal, juntamente com o facto de que existem indivíduos que irão manter esta doença ao longo da sua vida, é necessário o desenvolvimento de novos tratamentos de forma a melhorar a qualidade de vida destes. Atualmente não existem ainda tratamentos que provoquem remissão a longo prazo de alergia a ovo, porém várias terapias são alvo de estudo. Por exemplo, a imunoterapia oral apresenta resultados promissores, porém devido a reações adversas não é ainda aconselhada para uso clínico; por outro lado, a incorporação de proteína de ovo aquecida na dieta pode também funcionar como uma forma de imunoterapia.

## 1.4- Polifenóis e alergias alimentares

Como referido anteriormente, para o tratamento de alergias alimentares, atualmente as opções terapêuticas consistem no tratamento de sintomas através da administração de medicamentos como corticosteroides ou anti-histamínicos ou em alterações na dieta do indivíduo procurando-se evitar o mais possível os alimentos que causem reações adversas (60).

Em anos recentes, vários estudos clínicos demonstraram uma ligação entre o consumo de compostos bioativos como vitaminas, lípidos e polifenóis e alterações nos processos de sensibilização alérgica e uma atenuação de sintomas.

Dependendo da classe de polifenol, vários efeitos na modulação da resposta imune foram já descritos (61): alguns como o ácido cafeico têm um papel importante na fase de sensibilização alérgica, ao formarem complexos insolúveis com alérgenos enquanto que outros possuem a capacidade de reduzir afetar a apresentação de antígenos por células dendríticas ou ao inibirem a expressão do complexo MHC-II ou ao reduzirem a



produção de citocinas. Já em indivíduos sensibilizados, os efeitos dos polifenóis foram também descritos com catequinas e os seus derivados a inibirem a produção de citocinas TH<sub>2</sub>

Urticária é um sintoma comum de ingestão de alergénios caracterizado pela infiltração de mastócitos, eosinófilos e células T em locais onde ocorreu inflamação. A aplicação por via tópica de extratos ricos em flavanóis como extratos de chá verde revelou-se como um tratamento eficiente desta condição. Das catequinas presentes neste extrato, a epigalocatequina galhato tem uma ação conhecida na CD4 impedindo a ligação desta com os seus ligandos, impede a migração de células T circundantes para os locais inflamados e reduz ainda a libertação de histaminas por mastócitos e basófilos (62).

O consumo de polifenóis foi também relacionado a uma redução dos sintomas de alergia alimentar. Os ácidos fenólicos, ácido cafeico e clorogénico, têm um efeito significativo na redução dos sintomas da alergia ao amendoim (63) ao se ligarem irreversivelmente aos alergénios Ara h 1 e Ara h 2 tornando-os hipoalergénicos, por outro lado, foi demonstrado que polifenóis de maçã são capazes de complexar com o alergénio ovoalbumina, tendo os complexos resultantes um menor potencial alergénico.

Em outros estudos, polifenóis como a quercetina e rutina demonstraram capacidade de inibir a passagem do alergénio através de uma monocamada de células Caco-2.

Outros efeitos como a aliviação da inflamação das vias respiratórias devido à diminuição do recrutamento dos linfócitos e eosinófilos ou a uma redução da produção de muco permitem reafirmar a relação existente entre polifenóis e alergia sendo um melhor conhecimento entre os mecanismos por detrás destas interações essencial para melhor combater esta crescente ameaça (64).

## 2-Objetivos

Como referido anteriormente, a incidência de alergias alimentares tem vindo a aumentar e, em particular a alergia ao ovo é uma das mais prevalentes sobretudo em crianças. Esta alergia acarreta tanto um peso económico bem como uma diminuição da qualidade de vida dos indivíduos. De facto, o ovo e algumas das suas proteínas são um alimento nutricionalmente importante e com uma versatilidade de aplicação muito importante tanto na indústria alimentar como farmacêutica, respetivamente.

Devido à sua alta incidência juntamente com a ausência de bons métodos de tratamento é urgente o estudo de novas abordagens que previnam ou eliminem a alergia ao ovo. O uso de nutracêuticos têm-se revelado como potencial no combate a outras alergias alimentares e, entre os vários tipos de diferentes nutracêuticos, os polifenóis têm-se destacado não só pelo seu potencial anti-alergénico como também pelos seus diversos benefícios na saúde. Deste modo, este trabalho visou o estudo de dois alimentos amplamente consumidos (chá verde e mirtilo) e ricos em polifenóis,

O alergénio escolhido foi a proteína de ovo devido também à elevada ocorrência desta alergia em crianças que devido ao diferente uso de ovo, quer como alimento próprio ou ingrediente no processamento de outros, quer como constituinte de certos medicamentos; têm a sua qualidade de vida severamente afetada.

Para a avaliação da bioacessibilidade, procurou-se estudar os efeitos que o consumo de polifenóis de duas classes distintas (flavanóis do chá verde e antocianinas dos mirtilos) têm na digestão do ovo, bem como caracterizar a interação proteína-polifenol dando-se especial atenção aos efeitos da quantidade de polifenol nesta. Para a avaliação da biodisponibilidade, foi estudado o transporte dos diferentes péptidos provenientes da digestão de ovo na ausência e presença dos polifenóis. Por fim, foi avaliada a resposta imunológica gerada por estes péptidos por avaliação da resposta inflamatória após exposição a estes.

## 3. Métodos

### 3.1- Preparação de extrato de chá verde

De forma a se obter um extrato de chá verde, GTE, rico em polifenóis, foram primeiro pesados 20 g de folhas trituradas de *Camelia sinensis* de origem portuguesa (Açores). Estas folhas foram extraídas usando-se 500 mL de uma solução 50% (v/v) etanol e durante 30 minutos a temperatura ambiente sendo este processo repetido três vezes. Entre extrações, as amostras foram centrifugadas a 12 000xg durante 20 minutos a 4°C recolhendo-se o sobrenadante. O solvente orgânico foi depois removido com recurso a um evaporador rotativo usando-se pressão reduzida. Em seguida, de forma a remover clorofilas e metilxantinas, adicionou-se 750 mL de clorofórmio à solução; após separação em duas fases, separou-se a fase que continha o solvente orgânico repetindo-se este processo três vezes. De seguida foi então adicionado etil acetato na mesma quantidade de forma a extrair os polifenóis da amostra, sendo este processo também repetido três vezes. Após evaporação do solvente, o resíduo agora rico em polifenóis, foi carregado em cartuchos C18 (*Oasis PRIME HLB 12mL*) sendo lavado com 5% metanol de forma a remover açúcares e outros compostos polares; a fração fenólica foi depois eluída com 50% (v/v) de metanol lavando-se no fim o cartucho com uma solução de metanol/acetonitrilo 50:50. Posteriormente, o solvente orgânico foi evaporado sendo o extrato obtido liofilizado (65).

De forma obter o perfil polifenólico do extrato, o GTE foi sujeito a análise de cromatografia líquida com sistema HPLC (*Jasco LC-4000*, equipado com uma coluna C-18 de fase reversa). Os solventes utilizados foram A: 0,1% de ácido fórmico em água e B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo; gradiente linear (0 min, 10% eluente B a 50 min, 28% eluente B); de 0.5 mL min<sup>-1</sup> e deteção a 280 nm, usando um detetor photo diode array (MD-4010). De forma a identificar os compostos presentes, o GTE foi analisado por LC-MS (*Finnigan DECA XP PLUS*) sendo os compostos identificados baseados nos dados de espectros de massa, tempos de retenção, e padrão de fragmentação sendo esses dados comparados com literatura e outros recursos como a base de dados *Phenol-Explorer*.

### 3.2- Preparação de extrato de mirtilo

De forma a se obter um extrato de mirtilo, BBE, 250 g de mirtilo Beira Baga® de origem portuguesa, foram homogenizados em 80% etanol (v/v). Após 30 minutos em agitação, a mistura foi filtrada seguindo-se a evaporação do solvente orgânico. A solução resultante foi aplicada numa coluna de gel de sílica de fase reversa C18, procedendo-se a uma lavagem com água de forma a remover açúcares e outros compostos polares; a recuperação da fração fenólica foi alcançada com recurso a uma eluição com metanol acidulado com 1% de ácido clorídrico. De seguida, o solvente orgânico foi evaporado, e o extrato obtido foi liofilizado (66).

O BBE foi também analisado com sistema HPLC (*Jasco LC-4000*, equipada com uma coluna C-18 de fase reversa). Os solventes utilizados foram A: 10% ácido fórmico em água e B: 10% ácido fórmico em 30% acetonitrilo (v/v); gradiente linear (0 min, 10% eluente B a 50 min, 28% eluente B); fluxo de 0.5 mL min<sup>-1</sup> e deteção a 520 nm, usando um detetor photo diode array (MD-4010). De forma a identificar os compostos presentes, o BBE foi analisado por LC-MS (*Finnigan DECA XP PLUS*) sendo os compostos identificados baseados nos dados de espectros de massa, tempos de retenção e padrão de fragmentação sendo esses dados comparados com literatura e outros recursos como a base de dados *Phenol-Explorer*.

### 3.3- Extração da proteína do ovo

Extratos de proteína de ovo foram obtidos a partir de ovos de classe M de origem portuguesa adquiridos num supermercado total. A clara e gema de ovo foram manualmente separadas sendo guardadas em frascos distintos e posteriormente liofilizadas.

Os liofilizados foram extraídos com etanol gelado com 10% TCA (v/v) e 0.07% DTT (v/v). Após incubação a -20°C durante uma hora, a mistura resultante foi centrifugada a 10 000xg durante 15 minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi lavado com solução de etanol gelado com 0.07% DTT (v/v) e centrifugado também a 10 000xg durante 15 minutos a 4°C sendo este processo repetido três vezes. O *pellet* resultante foi separado da solução e liofilizado (68, 68, 69, 70).

As proteínas de ovo obtidas a partir da extração foram quantificadas através do método de Bradford, utilizando o *Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermofisher)* e albumina de clara de ovo, OVA, numa gama de 0-3000 µg/mL como padrão. Foram pesadas duas replicas de 1.0 mg cada dos extratos obtidos de gema e clara de ovo sendo depois diluídas em 1.0mL de água. Retirou-se 150 µL de cada solução e adicionou-se 50 µL de reagente de Bradford num poço de uma placa de 96 poços. Procedeu-se do mesmo modo para a reta padrão. Após a preparação de todas as amostras a placa foi agitada manualmente e incubada à temperatura ambiente, durante 15 minutos no escuro. De seguida foram lidas as absorvâncias num leito de placas (Biotek) com recurso ao *software Gen 5*.

### 3.4- Digestão de ovo

Foi efetuada a digestão de clara e gema liofilizada, extrato de proteínas de clara e extrato de proteínas de gema, na ausência e na presença de GTE ou BBE. De forma a garantir a relevância dos resultados para uma situação de co-ingestão alimentar, foi primeiro calculada a quantidade de proteína de ovo, polifenóis de chá e polifenóis de mirtilo presentes numa dose de cada alimento, permitindo-se assim utilizar rácios proteína:polifenol o mais próximo possível daquilo que aconteceria numa refeição. Assim, calculou-se a quantidade de proteína presente num ovo de classe A ( $\cong 50g$ ) e a quantidade de polifenol presente numa dose de chá verde e numa dose de mirtilos (Tabelas 1 e 2):

Tabela 1-Quantidade de proteína num ovo de classe A

| Alimento     | Quantidade de proteína |
|--------------|------------------------|
| Clara de ovo | 3.18 g                 |
| Gema de ovo  | 7. 63 g                |

Tabela 2- Quantidade de polifenol numa dose de chá verde e de mirtilo

| Alimento | Quantidade de polifenol |
|----------|-------------------------|
|----------|-------------------------|

|         |          |
|---------|----------|
| Chá     |          |
| verde   | 0.2136 g |
| Mirtilo | 0.8604 g |

Com estes valores, foi possível calcular que o rácio presente numa refeição: por cada 1 mg de chá verde seriam consumidos aproximadamente 12 mg de clara de ovo e 14 mg de gema de ovo e por cada 1 mg de mirtilo seriam consumidos 3.14 mg de clara de ovo e aproximadamente 4 mg de gema de ovo.

As digestões *in vitro* de proteína foram realizadas seguindo o método harmonizado INFOGEST (71,72), preparando-se três soluções de fluído simulado de acordo com o descrito na literatura, separando-as de acordo com a etapa da digestão salivar (*simulated salivary fluid*, *SSF*), gástrica (*SGF*) e intestinal (*SIF*) incluindo as enzimas digestivas aí presentes. As enzimas foram adicionadas de acordo com a sua atividade específica.

Para iniciar a digestão, a 15 mg de alimento, podendo este ser extrato de proteína ou liofilizado de ovo na ausência ou presença de extrato de polifenóis foram adicionados 150 µL de *SSF* previamente preparada e 165 µL de água milipore. Após 2 min removeram-se alíquotas de 60 µL e procedeu-se à adição de *SGF* até se obter uma razão 1:1 (vol:vol); deixou-se a mistura resultante durante 2 horas a agitar levemente. Em seguida, foram recolhidas alíquotas de 120 µL das várias condições antes de se adicionar *SIF* até se atingir mais uma vez uma razão 1:1 (vol:vol), deixando as amostras a agitar levemente mais 2 horas. Todas as etapas foram realizadas a uma temperatura de 37°C.

Após finalização da etapa intestinal, procedeu-se à inativação térmica das enzimas digestivas seguida de uma última recolha de alíquotas de 240 µL. Todas as alíquotas recolhidas foram guardadas a -40° C para posterior análise.

### 3.4.1- Preparação de digestos para os ensaios celulares

De forma a remover os sais presentes nas amostras possibilitando assim seu uso em culturas celulares, os liofilizados das digestões de extrato de clara e gema e de gema liofilizada na ausência ou presença de polifenóis foram diluídos em 2 mL de H<sub>2</sub>O sendo depois aplicados em colunas de cromatografia (*Oasis PRIME HLB 6mL*). Após

aplicação, foram lavadas com H<sub>2</sub>O, e de seguida eluídos com uma solução de 50:50 metanol/água e uma solução de 90:10 metanol/acetonitrilo, sendo recolhidas as duas eluições para análise.

As diferentes frações foram analisadas por eletroforese como explicado no ponto seguinte. Os péptidos estavam presentes na fração correspondente à eluição com 50:50 metanol/água.

As amostras foram depois colocadas no *Speed Vacuum Concentrator* com o objetivo de reduzir o metanol e acetonitrilo presente. Por fim, as amostras foram liofilizadas sendo armazenadas a -80°C até utilização.

### 3.5- Análise da digestão de ovo por eletroforese

De forma a observar os efeitos da presença de polifenóis de diferentes origens na digestão do ovo foram realizadas eletroforeses de forma a visualizar as alterações no perfil proteico após digestão. Assim, em condições redutoras, foi utilizado o *MiniProtean System (Bio-Rad)* e géis de poliacrilamida a 12% (*Running Gel*: 3.31 mL H<sub>2</sub>O milipor; 4 mL Acrilamida; 2.5 mL; Tris-HCl pH 8.8; 100 µL SDS 10%; 100 µL APS 10%; 10 µL TEMED e *Stacking Gel* 3.71 mL H<sub>2</sub>O milipor; 1.4 mL Acrilamida; 1.75mL; Tris-HCl pH 6.8; 70 µL SDS 10%; 70 µL APS 10%; 7 µL TEMED).

Das alíquotas recolhidas após digestão intestinal liofilizou-se 100 µL e o liofilizado resultante foi diluído com tampão de amostra (DTT 1M, Ureia 8M, e 2× *Sample Buffer (NZYTech)*), para uma concentração de 15 µg/µL. Antes da corrida, estas amostras foram desnaturadas a 90°C durante 5 minutos de forma a desnaturar as proteínas.

Em cada poço aplicaam-se 20 µL de amostra exceto no poço onde se injetou marcador de peso molecular (3 a 245 kDa, *Fisher BioReagents*). O tampão usado durante a corrida foi o tampão Tris-glicina 1x. Após corrida, os géis foram fixados com solução de fixação 1 (50% metanol, 10% ácido acético) durante 30 minutos, solução de fixação 2 (5% metanol, 7% ácido acético) durante 30 minutos e corados com *Coomassie Brillante Blue R-250* durante 5 minutos. Por fim, os géis foram descorados com solução descorante (10% ácido acético, 20% metanol)

### 3.6- Manutenção e crescimento de culturas celulares

Neste estudo foram utilizadas células Caco-2 (ATCC, clone HTB-37), pertencentes ao adenocarcinoma colorretal humano (passagem 46-50). Esta linha celular foi mantida em DMEM, “*Dulbecco’s modified Eagle’s medium*” suplementado com 1% de antibiótico/antimitótico, 1% aminoácidos não essenciais e 10% soro bovino fetal (FBS). Foram incubadas a uma temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os meios foram trocados a cada três dias e quando as células atingiam confluência, eram subcultivadas usando-se tripsina. O meio de cultivo era primeiramente retirado sendo as culturas lavadas com uma solução de tampão fosfato-salino (*PBS*), sendo depois adicionada tripsina; após 5 minutos a uma temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> era de novo adicionado meio de cultivo de forma a inativar a tripsina.

### 3.7- Biodisponibilidade e bioacessibilidade de péptidos imunológicos

Para os ensaios de biodisponibilidade dos digestos foi utilizado o sistema Transwell® de 24 poços. Em cada poço, de 0,4 µm e com área de crescimento 0.33 cm<sup>2</sup>, foram semeadas células Caco-2 com densidade 5×10<sup>5</sup> células cm<sup>-2</sup>. As culturas foram mantidas durante 21 dias usando condições de cultura descrita no ponto anterior (ponto 2.6) permitindo o estabelecimento de uma monocamada celular diferenciada em barreira. A integridade desta monocamada foi avaliada medindo-se a resistência elétrica transepitelial, TEER, com o aparelho MilliCell-ERS, esperando-se valores acima dos 300 Ω\*cm<sup>2</sup>.

No dia anterior ao ensaio, trocou-se o meio de cultura para DMEM sem FBS. No dia do ensaio, as amostras liofilizadas (ponto 2.4.1) foram diluídas em “*Hanks balanced salt solution*”, HBBS, numa concentração de 1 mg/mL. Cada amostra foi aplicada em duplicado, e foram realizados vários controlos: dois poços só com HBBS, mais 2 poços contendo só GTE e 2 poços contendo só BBE.

Adicionaram-se 600 µL de HBBS à fase basolateral de cada poço e 100 µL à fase apical; a placa foi incubada nas mesmas condições de crescimento referidas no ponto 2.6. Foram recolhidas alíquotas de 60 µL do instante zero, bem como após 30, 60, e 120 minutos e 120 µL aos 180 minutos do lado basolateral, repondo-se sempre o volume removido. No fim do ensaio, foram também recolhidos 60 µL da fase apical. Os 120 µL recolhidos no final serão também utilizados com o intuito de avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias aí presentes.



As amostras obtidas foram analisadas por cromatografia em fase líquida acoplada a espetometria de massa (LC-MS) usando um *Thermo Scientific™ Orbitrap Exploris™ 120*. As amostras foram eluídas num gradiente 100% de solvente A (H<sub>2</sub>O com 0.1% v/v HCOOH) até atingir 80 % solvente B (ACN com 0.1% v/v HCOOH) durante 4.5 min a um fluxo de 0.350 mL/min; cada corrida demorou nove minutos e a temperatura da coluna foi de 45°C.

A aquisição das amostras foi feita em modo *Full Scan* e utilizando filtros específicos para determinados intervalos de massa correspondentes a péptidos imunogénicos anteriormente descritos. A identificação e quantificação dos péptidos foi feita utilizando o software *Xcalibur*.

### 3.8- Libertação de citocinas pró-inflamatórias IL-8

Ensaio ELISA *sandwich* foram aplicados de forma a avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias aquando do ensaio de transwell. No dia anterior ao ensaio, foi preparada uma placa de 96 poços que foi deixada a adsorver anticorpo de captura durante a noite a temperatura ambiente. No dia do ensaio foi utilizada a placa agora embebida com anticorpo capaz de reconhecer e interagir com IL-8, seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante, *R & D SYSTEMS*, pertencentes a *Biotechne®*; No dia anterior ao ensaio, preparou-se a placa a utilizar ao revesti-la com *Coating Buffer* deixando-se a incubar durante a noite a 4°C; no dia seguinte após lavagem com *Wash Buffer* bloquearam-se os poços com *ELISA/ELISPOT* deixando-se a incubar à temperatura ambiente durante uma hora; preparam-se os *standards* sendo este adicionados à placa juntamente com as amostras deixando-se depois a placa a incubar durante 2 horas; ao fim do período de incubação adicionou-se o anticorpo de deteção e após uma hora de incubação adicionou-se avidina de peroxidase de rabano (HRP) e, após 30 minutos a temperatura ambiente, adicionou-se solução TMB lendo-se a absorvância dos poços ao fim de 15 minutos. Entre cada passo, antes da adição de uma nova solução procedeu-se sempre à lavagem da placa com *Wash Buffer* repetindo-se este processo três vezes cada lavagem.

### 3.9- Caracterização da interação proteína-polifenol

Ensaio de *quenching* de fluorescência foram aplicados de forma a melhor elucidar a interação entre proteína de ovo e os diferentes polifenóis (73).

Antes de se iniciar o ensaio, procurou-se primeiro procurar a concentração de proteína de ovo ideal que não absorvesse acima de 0.1 no comprimento de onda analisado. Para isso, espectros de absorção de soluções com concentrações crescentes de proteína de clara de ovo foram tirados com recurso a um *Evolution Array*, pertencente a *Thermo Scientific®*.

Após definida a concentração de proteína a utilizar (0.4 mg/mL) as leituras de fluorescência foram feitas usando um espectralfluorómetro HORIBA *FLUOROMAX 4*. As amostras foram preparadas em microtubos de 0.600 mL adicionando-se a uma solução de proteína de ovo volumes crescentes de uma solução stock de polifenóis fresca preparada no dia; analisou-se a interação proteína:polifenol a um rácio proteína:polifenol de 8µg:1 µg; 4:1; 2.7:1; 2:1; 1.6:1; 1.3 µg:1 µg. Após adição e homogeneização, 15 µL de solução foram retirados da solução e colocados numa cuvete de quartzo. O comprimento de onda de excitação usado foi de 290 nm com janela de emissão de 300 nm a 450 nm a uma velocidade de 120 nm/min e com um intervalo de 1 nm. Para os cálculos de extinção de fluorescência, foi usado o valor de intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão máximo (340 nm). Entre medições, a cuvete foi sempre lavada com água e seca. Foram analisadas as alterações de fluorescência na presença de polifenol sendo cada ensaio realizado em triplicado.

As expressões utilizadas para analisar os resultados de fluorescência foram aplicados de acordo com a literatura. As equações utilizadas foram as seguintes:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

$F_0$  – Intensidade de fluorescência antes da adição de *quencher* (polifenol)

$F$  – Intensidade de fluorescência após adição de *quencher* (polifenol)

$k_q$  – Constante de quenching biomolecular

$\tau_0$  – Tempo de vida do fluoróforo na ausência de *quencher*

$[Q]$  – Concentração de *quencher*

$K_{SV}$  – Constante de Stern- Volmer

A equação 1 foi aplicada de forma a determinar  $K_{SV}$  por regressão linear de uma função de  $F_0/F$  em função de  $[Q]$ .

## 4- Resultados e Discussão

### 4.1-Preparação e caracterização de extratos de chá verde e mirtilo

Com o intuito de preparar dois extratos com diferente composição em polifenóis foram escolhidas as matrizes chá verde e mirtilos, pois são amplamente conhecidas por apresentarem um teor elevado destes compostos. O processo de extração de cada matriz incluiu diversos passos de extração: no caso do chá verde, a extração foi efetuada com metanol precedida a uma pre-purificação com clorofórmio que permitiu a separação de pigmentos interferentes como clorofilas. No caso dos mirtilos, a extração direta com metanol permitiu a extração de vários compostos polares junto com os compostos fenólicos. Em ambos os casos, a purificação por cartuchos em extração em fase sólida-SPE contendo sílica de fase reversa C18 permitiu a remoção de carboidratos e outras sustancias interferentes.

Os extratos obtidos, foram analisados por LC-MS de forma a se caracterizar o perfil de compostos polifenólicos presentes em cada um (74, 75).

Para ambos os extratos, foi aplicado um método de HPLC utilizando uma coluna de sílica de fase reversa C18. O método utilizado (solventes, programa de eluição, deteção) haviam sido previamente otimizados. Os programas utilizados foram escolhidos de forma a maximizar a separação dos flavonóis no caso do chá e das antocianinas no caso do extrato de mirtilo. A monitorização foi efetuada a 280 nm no caso do chá e a 520 nm no caso do extrato de mirtilo pois este é o valor em que a absorção dos polifenóis é máximo em cada caso.

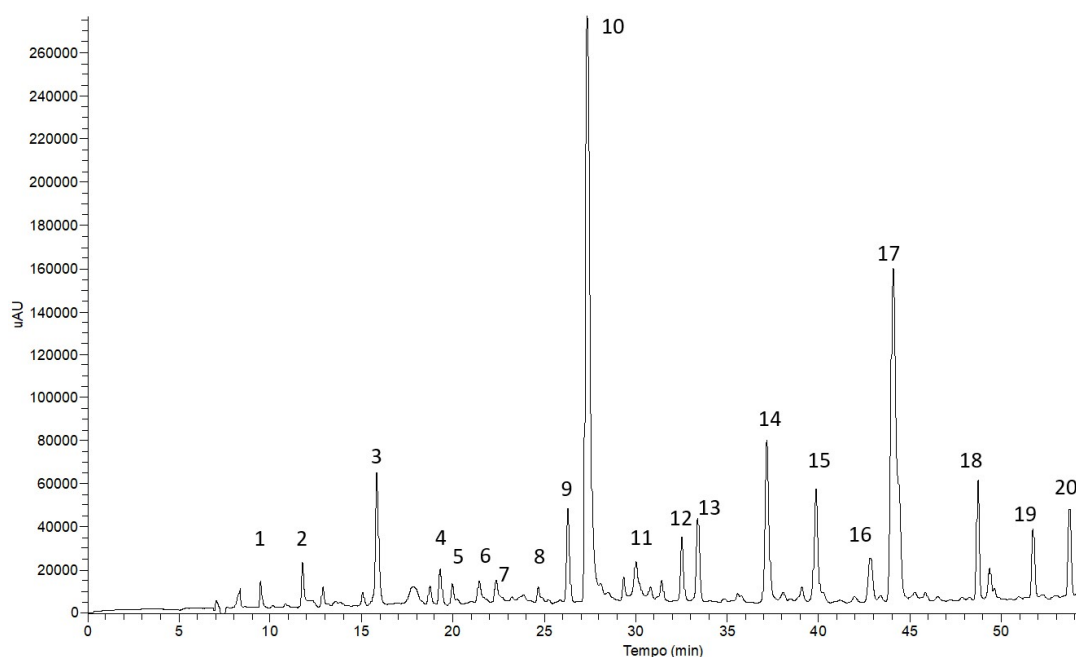


Figura 4-Cromatograma de extrato de chá verde analisado por HPLC-MS a 280 nm; os picos presentes estão numerados sendo a sua identificação efetuada na Tabela 3.

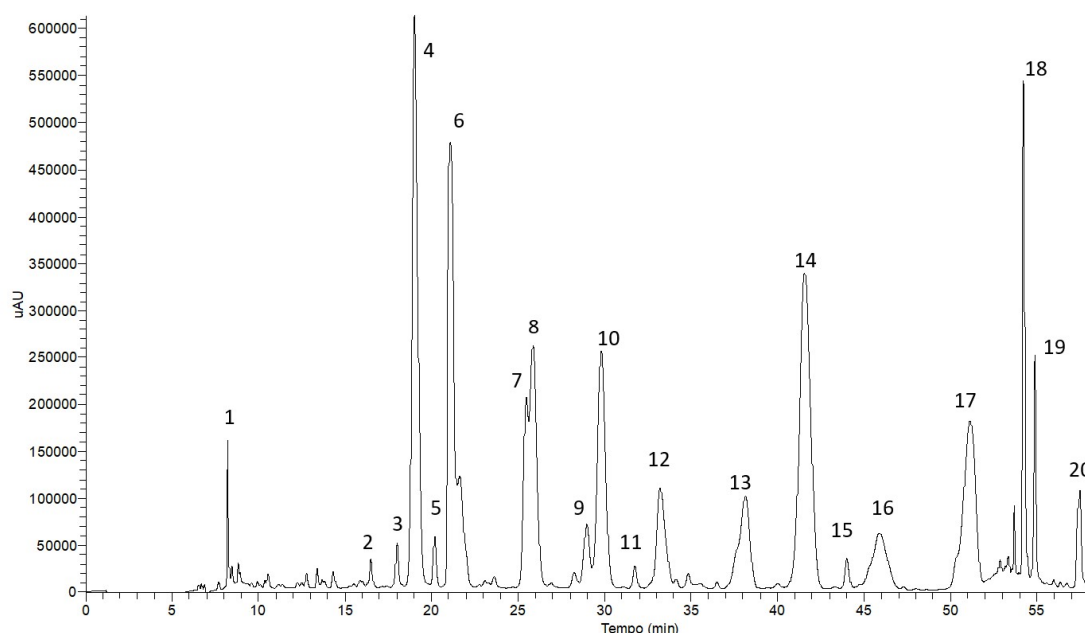
**Tabela 3.** Identificação dos compostos presentes no extrato de chá com indicação do tempo de retenção, do íão molecular e do respetivo padrão de fragmentação.

| Pico | Composto                                 | RT    | [M] <sup>-</sup> | [MS] <sup>2</sup> |
|------|------------------------------------------|-------|------------------|-------------------|
| 1    | Não identificado                         | -     | -                | -                 |
| 2    | Galhocatequina                           | 11.89 | 305.67           | 179.00; 221.20    |
| 3    | Epigalhocatequina                        | 15.98 | 305.4            | 179.13; 220.20    |
| 4    | Prodelfinidina B-2 (ou 4) 3-O-galhato    | 18.02 | 761.33           | 592.87; 574.87    |
| 5    | Epicatequina                             | 20.12 | 289.47           | 245.29            |
| 6    | Não identificado                         | -     | -                | -                 |
| 7    | Não identificado                         | -     | -                | -                 |
| 8    | Não identificado                         | -     | -                | -                 |
| 9    | Catequina                                | 26.42 | 289.47           | 245.22; 205.24    |
| 10   | Epigalhocatequina galhato                | 27.51 | 457.27           | 169.13; 304.93    |
| 11   | Galhocatequina galhato                   | 30.18 | 457.53           | 169.20; 331.20    |
| 12   | B2g                                      | 32.64 | 729.27           | 576.87            |
| 13   | Mircitina-3-O-glucosido                  | 33.56 | 479.47           | 316.12; 271.20    |
| 14   | Epigalhocatequina-3-O-(3-Ometil) galhato | 37.33 | 471.27           | 183.19; 305.20    |
| 15   | Quercetina-3-rutinósido                  | 40.12 | 609.60           | 301.16; 179.11    |
| 16   | Não identificado                         | -     | -                | -                 |

|    |                                    |       |        |                |
|----|------------------------------------|-------|--------|----------------|
| 17 | Epicatequina galhato               | 44.25 | 441.33 | 289.16; 331.01 |
| 18 | Kaempferol-3-Hexosildeoxilhexosido | 48.9  | 589.53 | 285.13; 257.27 |
| 19 | Não identificado                   | -     | -      | -              |
| 20 | Não identificado                   | -     | -      | -              |
| 21 | Epicatequina galhato-3-metil       | 53.88 | 455.27 | 289.2; 183.13  |

Após análise por LC-MS (Figuras 4 e 5), os espectros de massa foram analisados de forma se proceder à identificação dos picos presentes. Com recurso à informação obtida pelo software Xcalibur dados referentes ao ião molecular, padrão de fragmentação, rácio massa/carga e ainda tempo de retenção (Tabelas 3 e 4) e sua comparação com bibliografia existente tornou-se possível a identificação do polifenol presente em cada pico.

No caso do extrato do chá verde, identificou-se os seguintes polifenóis: (Figura 4, Tabela 3): galhocatequina (GC), epigalhocatequina (EGC), epicatequina (EC). Catequina (C), epigalhocatequina galhato (EGCG), galhocatequina galhato (GCG) e epicatequina galhato (EGC) correspondendo ao já esperado tendo em conta a literatura. De facto, o flavonol presente em maior qualidade é o EGCG, sendo este facto também corroborado pela literatura existente.



**Tabela 4.** Identificação dos compostos presentes no extrato de mirtilo com indicação do tempo de retenção, do íão molecular e do respetivo padrão de fragmentação.

| Pico | Composto                                            | RT    | [M] <sup>+</sup> | [MS] <sup>2</sup> |
|------|-----------------------------------------------------|-------|------------------|-------------------|
| 1    | Não identificado                                    | -     | -                | -                 |
| 2    | Não identificado                                    | -     | -                | -                 |
| 3    | Não identificado                                    | -     | -                | -                 |
| 4    | Delfinidina -3-O-galactosido/glucósido              | 19.10 | 465.73           | 303.21; 303.18    |
| 5    | Não identificado                                    | -     | -                | -                 |
| 6    | Delfinidina -3-O-galactosido/glucósido              | 21.69 | 465.47           | 303.21; 257.14    |
| 7    | Cianidina-3-glucosido/galactósido                   | 25.6  | 449.40           | 287.20; 259.19    |
| 8    | Delfinidina-3-arabinosido/delfinidina-3-O-pentosido | 25.94 | 435.67           | 303.19; 303.18    |
| 9    | Cianidina-3-glucosido/galactósido                   | 29.11 | 449.4            | 287.20; 287.27    |
| 10   | Petunidina-3-glucósido/galactósido                  | 29.86 | 479.6            | 317.79; 302.07    |
| 11   | Não identificado                                    | -     | -                | -                 |
| 12   | Cianidina-3-O-arabinósido/pentóxido                 | 33.32 | 419.47           | 287.20; 287.27    |
| 13   | Petudinina-3-O-arabinósido                          | 38.34 | 449.33           | 317.33; 302.13    |
| 14   | Malvidina-3-galactósido/glucósido                   | 41.74 | 493.67           | 331.20; 331.13    |
| 15   | Não identificado                                    | -     | -                | -                 |
| 16   | Malvidina-3-galactósido/glucósido                   | 46.03 | 493.33           | 331.00; 316.00    |
| 17   | Malvidina-3-arabinósido                             | 51.43 | 463.53           | 331.07; 315.93    |
| 18   | Delfinidina-3-galactósido/glucósido                 | 54.38 | 465.67           | 303.21; 257.08    |
| 19   | Delfinidina-3-galactósido/glucósido                 | 55.00 | 465.8            | 303.00; 257.00    |
| 20   | Delfinidina-3-arabinósido/Delfinidina-3-O-pentosido | 57.59 | 435.47           | 303.13; 257.14    |

No caso do extrato de mirtilos, o perfil cromatográfico está apresentado na Figura 5. No caso deste extrato verificou-se a presença de várias antocianinas (Tabela 4), características do extrato de mirtilo destacando-se a delfinidina-3-O-glucósido. Estes resultados estão de acordo com a literatura existente (66)

## 4.2- Preparação de extrato de proteína de ovo

O ovo de galinha, para além de ser um alimento rico em proteína animal tem presentes altas quantidades de outros nutrientes. Segundo dados obtidos pela USDA, por cada 100 g de ovo, 12,6g correspondem a proteína, 10,6 g correspondem às gorduras totais e 1,1g correspondem a carboidratos. Como destes compostos, só as proteínas são de interesse num contexto imunológico, procedeu-se à separação destas do resto dos componentes do ovo; adicionalmente, devido às diferentes composições da clara e gema de ovo, clara e gemas foram analisadas individualmente.

Assim, após separação manual da gema e da clara, ambas as matrizes foram lavadas com uma solução de TCA (10%) e DTT (0.07%) que levavam à precipitação das proteínas permitindo assim a sua separação do resto dos compostos.

A eficiência da extração, e por tanto, a quantificação de proteína no extrato, foi avaliada com recurso ao método de Bradford (76). Este método baseia-se no facto do reagente azul de *Coomassie* alterar a sua absorvância de 465 nm para 595 nm (adquirindo por isso uma cor azul em vez da sua típica cor acastanhada) devido à sua interação com resíduos aromáticos presentes nas proteínas. É possível determinar a concentração de proteína presente numa amostra, após construção de uma reta padrão com concentração conhecida de proteína (normalmente albumina sérica bovina) e leitura da absorvância a 595 nm. O limite de deteção deste método é entre 20 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Neste projeto, a proteína utilizada para construir a reta padrão foi um padrão de ovalbumina de clara de ovo (*Sigma-Aldrich*), permitindo assim uma comparação direta entre a concentração do padrão de ovalbumina e a concentração de ovalbumina presente na clara e na gema de ovo.

O doseamento de proteína foi estudado em 2.5mg de extrato de proteína de clara de ovo e em 2 mg de extrato de proteína de gema.

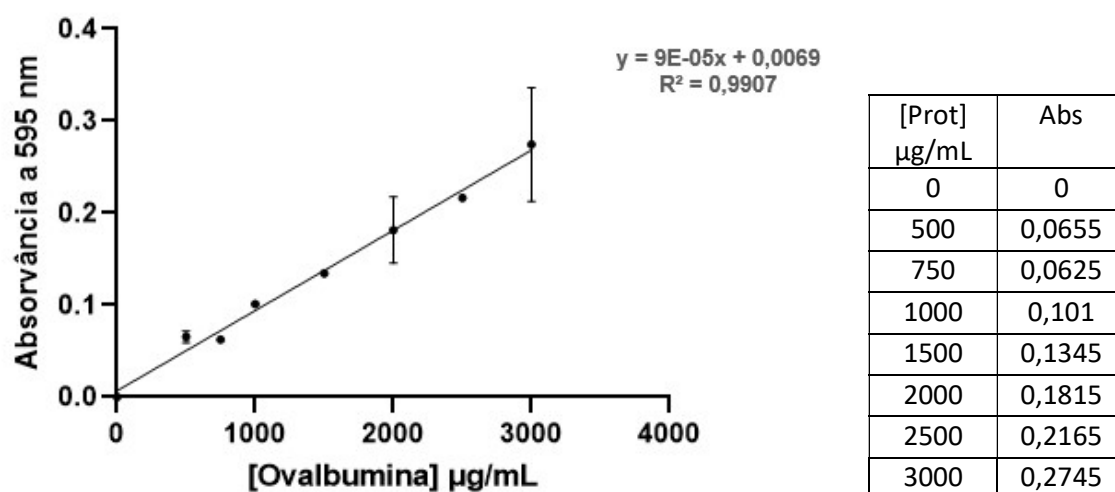


Figura 7- Representação gráfica (à esquerda) da absorvância a 595 nm em função da concentração de ovalbumina (tabela) e apresentação da respetiva regressão linear (à direita)

Efetuada uma regressão linear obteve-se a seguinte equação:

$$y = 9E - 05x + 0,0069 \quad (2)$$

Assim tornou-se possível calcular a quantidade de ovalbumina existente em ambos os extratos:

Tabela 5- Determinação da concentração de ovalbumina nos extratos de clara e gema

|           | Massa (mg) | Absorvância | % Proteína |
|-----------|------------|-------------|------------|
| Ext clara | 2.5        | 0,384       | 82.0%      |
| Ext gema  | 2.0        | 0,098       | 40.6%      |



Observando os resultados apresentados na Tabela 5, é possível comentar a eficácia da extração descrita no ponto 3.3; enquanto que o extrato de proteína de gema apresenta valores altos indicativos de uma extração eficiente, os valores de proteína do extrato de gema apontam para uma extração mais ineficiente. Tal pode ser devido ao baixo teor proteico da gema, correspondendo apenas a 40% do seu peso, podendo a matriz ter afetado a capacidade da proteína precipitar ou a perdas de proteína durante o processo de lavagem do extrato.

#### 4.3- Digestibilidade das proteínas na presença de diferentes polifenóis

Tendo como objetivo estudar os efeitos da matriz e da presença de polifenóis na bioacessibilidade de proteína de ovo, foram realizadas digestões da clara e gema liofilizados, bem como dos respetivos extratos proteicos na ausência e presença de extratos de polifenóis preparados previamente.

A digestibilidade das proteínas de ovo foi inicialmente monitorizada por eletroforese em condições desnaturantes (Figuras 7 e 8).

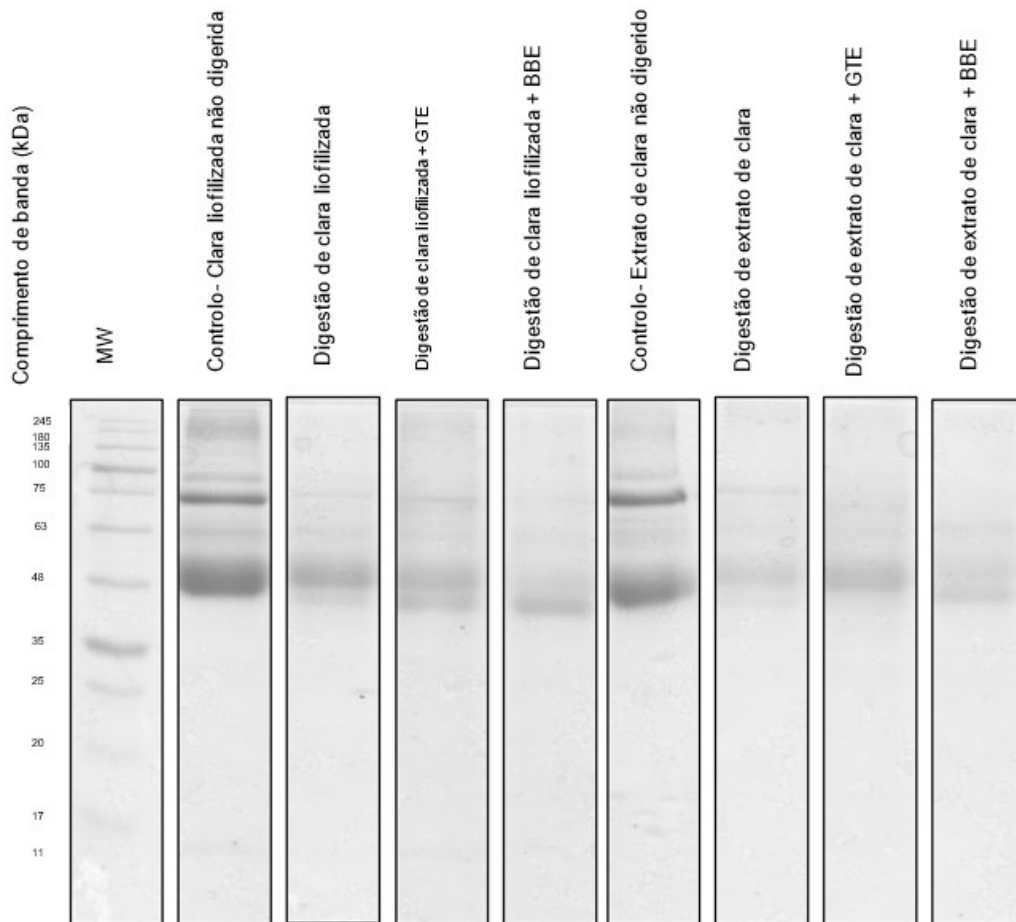


Figura 7-Gel de eletroforese SDS-PAGE (12% acrilamida) da digestão de extrato e clara liofilizada na presença e ausência de polifenóis

Na Figura 7, estão apresentadas as *lanes* controlo referentes à clara liofilizada não-digerida e ao extrato de clara não-digerido. Comparando as *lanes* controlo pode observar-se que o perfil de proteínas é similar. No entanto, verifica-se que as bandas com peso molecular entre 245-100 kDa (as bandas na parte superior do gel) estão menos intensas no perfil do extrato de clara não-digerido. Isto pode ser explicado devido a algumas perdas proteicas que possam ocorrer aquando do processo de extração.

Nessas mesmas lanes é possível observar a presença de duas bandas bem acentuadas. Usando como referência os pesos moleculares descritos na literatura (56) é possível inferir a sua identificação: a banda superior e mais pesada corresponderá à ovotransferrina, com um peso molecular de 77 kD a banda inferior e mais leve

corresponderá à ovoalbumina (45 kDa) que compreende a aproximadamente 50% do total proteico da clara de ovo. As bandas correspondentes à lisozima (14.3 kDa) e ovomucóide (28 kDa) não são visíveis pois correspondem a uma porção pequena da proteína total da clara de ovo, aproximadamente 10% cada.

Adicionalmente, estão apresentadas na figura 7, as *lanes* relativas à análise da digestão da fase intestinal de proteína de clara e clara liofilizada na ausência e na presença de extrato de chá verde e de extrato de mirtilo.

Observando-se as *lanes* das diferentes condições é possível inferir que de facto ocorreu digestão em todas as condições, porém a extensão desta difere de condição para condição. Comparando-se a digestão de clara liofilizada com extrato de proteínas de clara constata-se que a digestão é mais extensa no extrato de proteínas. Isto indica-nos que a digestão é mais extensa na ausência de matriz da clara, nomeadamente gorduras insaturadas, juntamente com vitaminas no complexo B e ferro. Comparando-se as condições em que se digeriu clara liofilizada com condições em que se digeriu a clara liofilizada na presença de polifenóis é possível observar que: na presença de GTE, existem algumas diferenças entre as duas sobretudo nas proteínas de elevado peso molecular, que tinham desaparecido na digestão de clara liofilizada sozinha e reaparecem na digestão de clara liofilizada com GTE; na presença de BBE, verificam-se diferenças mais significativas, com uma digestão mais extensa. De facto, na presença de BBE a banda correspondente à proteína ovotransferrina aparece diminuída bem como as duas bandas com pesos moleculares mais reduzidos, isto é, resultantes da hidrólise.

Observando-se as condições em que se digeriu extrato de proteína de clara na presença dos extratos de polifenóis, os efeitos dos polifenóis são também evidentes. Na condição em que se digeriu a proteína de clara com GTE, o efeito do GTE na digestão parece ser dependente da proteína em questão: a digestão é menos extensa para a proteína ovoalbumina mas mais extensa para a proteína ovotransferrina. Adicionalmente, o efeito do GTE na digestão é diferente na clara liofilizada e no extrato de proteína de clara. Isto indica que a matriz da clara influencia de alguma forma a ação do GTE. De facto, a influência dos polifenóis na digestão pode ocorrer por duas hipóteses: interação dos polifenóis com as enzimas digestivas como amplamente reportado na literatura (77) e/ou interação dos polifenóis com a matriz alimentar, incluindo as proteínas, e essa interação afecta a maneira como as proteínas são digeridas. Neste caso, os resultados parecem apontar para a segunda hipótese, em que os polifenóis do GTE interagem com as proteínas da clara e essa interação é afetada pela presença da matriz da clara. Deste

modo, o perfil proteico da digestão é diferente na clara liofilizada do extrato de proteína de clara. Adicionalmente, parece haver uma inibição seletiva da digestão de algumas proteínas (com MW de aproximadamente 40 kDa) e isto poderá estar relacionado com uma maior interação dos polifenóis do GTE com essas proteínas.

Em relação à digestão com o BBE, a digestão de clara liofilizada parece ser mais extensa na presença deste extrato do que sozinha, sobretudo para a proteína ovotransferrina, mas parece inibir a digestão da proteína ovoalbumina. O mesmo acontece na digestão do extrato de clara na presença de BBE. Deste modo, tal como para o GTE, uma das hipóteses no caso do BBE será os polifenóis presentes interagirem com as proteínas da clara afetando a sua digestão. Daí a especificidade para algumas proteínas. Adicionalmente, o perfil de digestão da clara na presença de BBE quer para a clara liofilizada quer para o extrato de proteína de clara é muito similar.

Os resultados apresentados na Figura 7 permitem o estabelecimento de duas hipóteses acerca dos efeitos dos polifenóis e da matriz na digestão de clara; por um lado, a matriz apresenta um claro efeito supressor da digestão com as condições em que se usou extrato de proteína de clara a apresentar uma digestão mais significativa; por outro, os polifenóis apresentam um efeito distinto, enquanto que o GTE não causa diferenças muito significativas na digestão de proteína de clara exceto numa proteína em que aparenta inibir a sua digestão, o BBE tem um claro efeito pró-digestivo pois as lanes correspondentes a digestões em que se usou este extrato apresentam bandas mais claras que as alternativas, uma evidência de que nestas condições a digestão foi suplementada.

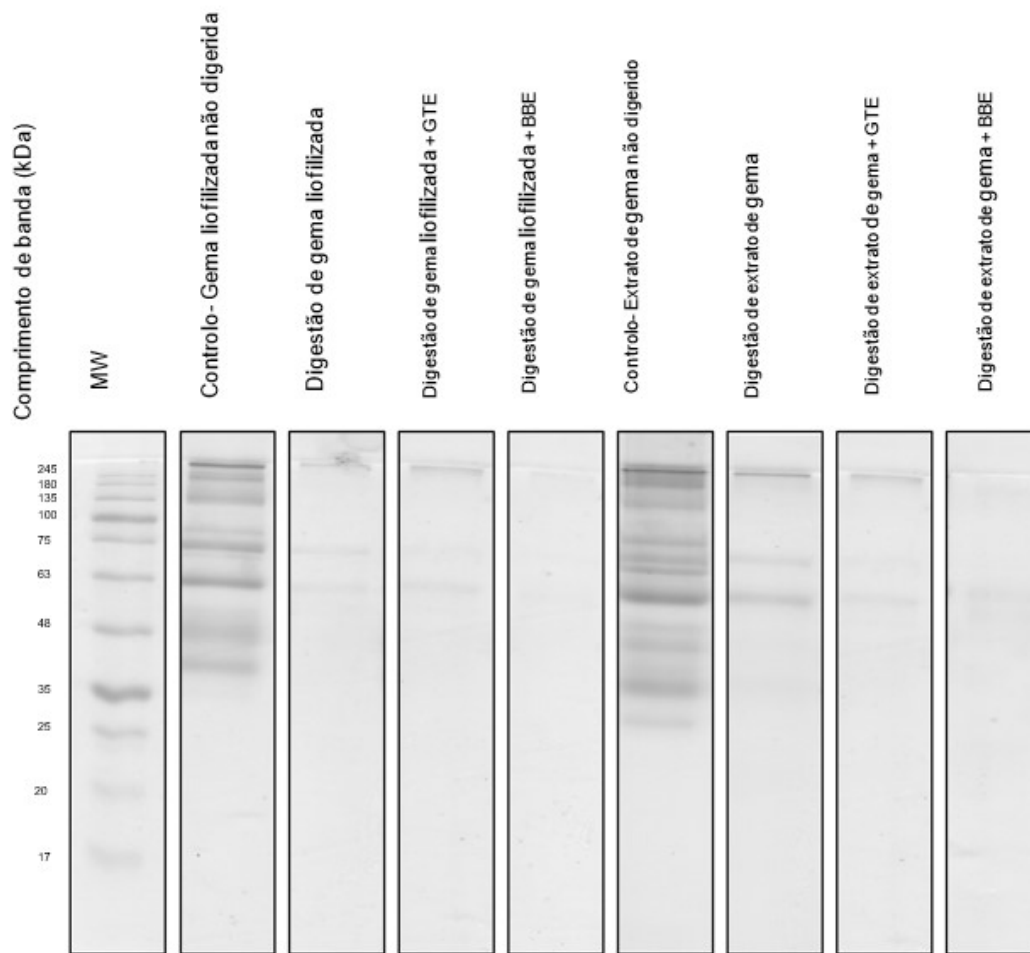


Figura 8-Gel de eletroforese SDS-PAGE (12% acrilamida) da digestão de extrato e clara liofilizada na presença e ausência de polifenóis

Na Figura 8 estão apresentadas as *lanes* controlo referentes à gema liofilizada não-digerida e ao extrato de gema não-digerido. Na lane correspondente à gema liofilizada não-digerida observa-se a existência de várias bandas, sendo que no extrato de gema não digerido verifica-se um enriquecimento tanto do número de bandas como da intensidade. Deste modo, podemos inferir que o protocolo de extração de proteína de gema foi eficiente. Na gema a principal proteína é a  $\alpha$ -livetina (70 kDa), sendo que as outras bandas corresponderão a outras proteínas também existentes na gema como  $\beta$ -livetina (42 kDa), apolivetina (20 kDa),  $\delta$ -livetina (200 kDa) e  $\gamma$ -livetina (150 kDa).

Na figura 8, estão também apresentadas as condições relativas à fase intestinal da digestão de gema na presença ou ausência de GTE e BBE. Mais uma vez, é possível observar a ocorrência de digestão em todas as condições, porém, desta vez as condições em que se digeriu gema liofilizada apresentam uma digestão mais significativa do que as condições em que se digeriu extrato de proteína de gema. Deste modo, no caso da gema a presença da matriz parece favorecer a digestão. A matriz de gema está descrita como tendo uma alta concentração de gorduras como colesterol na sua composição. Neste caso, o efeito dos extratos de polifenóis apresenta uma diferença significativa: na presença de GTE, uma das proteínas não-digeridas ( $MW \cong 70$  kDa) na gema liofilizada e no extrato de proteína de gema é digerida enquanto a outra proteína ( $MW \cong 40$  kDa) continua resistente à digestão; na presença de BBE, a digestão das proteínas na gema liofilizada e no extrato de proteína de gema é total. Deste modo, mais uma vez a ação do GTE parece ser específica e dependente da proteína em causa, enquanto que a ação do BBE, no caso da gema, é transversal a todas as proteínas presentes na gema.

É de interesse realçar todas as condições acima apresentadas se referem apenas à fase intestinal da digestão. Tal deve-se ao facto de que as proteínas de ovo sofrem uma digestão mais lenta que proteínas de outros alimentos devido à sua estabilidade: em específico proteínas como a ovomucóide e a  $\alpha$ -livetina são conhecidas pela sua resistência às enzimas digestivas das fases orais e gástricas sofrendo a maior parte da sua digestão no intestino (56); adicionalmente, a absorção dos polifenóis é realizada maioritariamente no trato intestinal; mais ainda, como a sua biodisponibilidade é baixa (36), grande parte dos polifenóis ingeridos ficaram presentes no lúmen intestinal sendo esta etapa da digestão a mais importante analisar para melhor perceber os efeitos que os polifenóis têm na digestão de proteínas de ovo bem como a modulação da resposta imune a estas.

Assim, é possível constatar que os polifenóis têm um efeito na digestão de proteínas de ovo. Estas, normalmente conhecidas pela sua estabilidade aparentam ser melhor digeridas na presença de polifenóis, porém, estes efeitos são não só dependentes do tipo de proteína que falamos, com proteínas como a  $\alpha$ -livetina (78) e ovotransferrina a sofrerem um aumento de digestão enquanto que outras como a  $\beta$ -livetina a terem a sua digestão maioritariamente inalterada. O tipo de polifenóis utilizado é também um fator importante nos efeitos destes na digestão com os polifenóis do extrato de mirtilo a se destacarem pelos seus efeitos benéficos na digestão; tal deve-se à sua composição, com o extrato de chá verde a ser constituído maioritariamente por catequinas, sendo a

sua capacidade de interagir com proteínas bem documentada na literatura (79), enquanto que as antocianinas, constituinte maioritário do extrato de mirtilo, não são conhecidas por esta capacidade. Logo, a maior interação das catequinas do extrato de chá com as enzimas digestivas pode ser a justificação pela digestão por vezes inalterada ou até mesmo inibida de proteínas verificada nas Figuras 7 e 8.

#### 4.4- Biodisponibilidade dos péptidos imunogénicos

Após a digestão, foi realizado um ensaio in vitro de transporte transepitelial com o intuito de avaliar a biodisponibilidade. Para isso, as amostras foram tratadas de forma a poderem ser utilizadas em ensaios com culturas celulares. Nomeadamente, foi realizado um processo de limpeza e remoção de sais dos fluidos simulados, saes biliares e enzimas digestivos por SPE-C18. Foram realizadas três digestões distintas sendo por isso também realizados três ensaios distintos de biodisponibilidade, de forma a assegurar a reprodutibilidade e significância dos resultados obtidos.

Após o ensaio de biodisponibilidade, as amostras recolhidas foram analisadas de forma a identificar os péptidos imunogénicos definidos nas Tabela 3 e 4. Foi analisada não só a quantidade de péptidos libertados após digestão, mas também a capacidade desses péptidos de se translocarem através da barreira do epitélio intestinal.

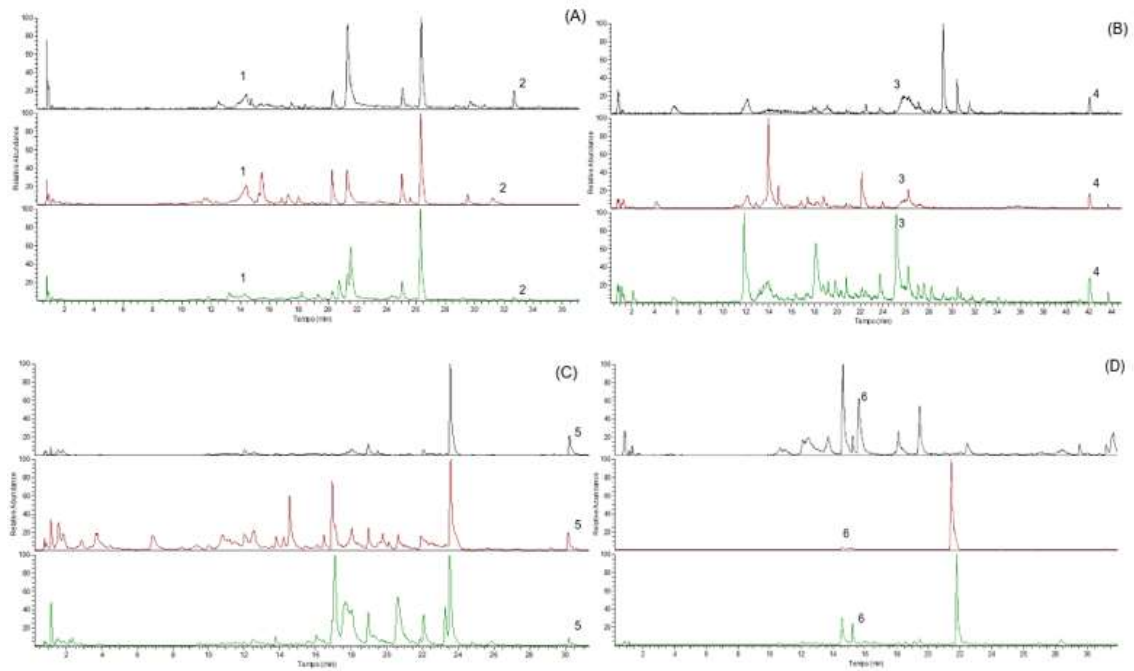


Figura 9- Cromatogramas dos digestos de: clara isolada analisado por HPLC-MS a 280 nm (a preto); clara + GTE (a vermelho); clara + BBE (a verde) em modo *Mass range*: [829.9181, 831.9181, 565.3115-567.3115] (A); [929.5011-931.5011, 672.333-674.333] (B); [579.7940-581.7940] (C); [625.7794-627.7794]. Identificação dos picos efetuada na Tabela 6.

Tabela 6- Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de clara; efeitos da digestão com polifenóis na produção destes

| Pico | Composto | Fórmula           | M/z      | RT    | 0'+GTE<br>/0' | 0'+BBE<br>/0' |
|------|----------|-------------------|----------|-------|---------------|---------------|
| 1    | OVA      | LYRGGLEPIN        | 566.3115 | 14.4  | 159%          | 33%           |
| 2    | OVA      | QARELINSWVESQT    | 830.9181 | 32.69 | 53%           | 36%           |
| 3    | OVA      | NVLQPSSVDSQTA     | 673.3333 | 25.21 | 134%          | 131%          |
| 4    | OVA      | KHIATNAVLFFGRCVSP | 930.5011 | 42.05 | 245%          | 166%          |
| 5    | OVA      | QAVHAAHAEIN       | 580.794  | 30.25 | 70%           | 63%           |
| 6    | OVA      | AFKDEDTQAMP       | 626.7794 | 15.63 | 40%           | 13%           |



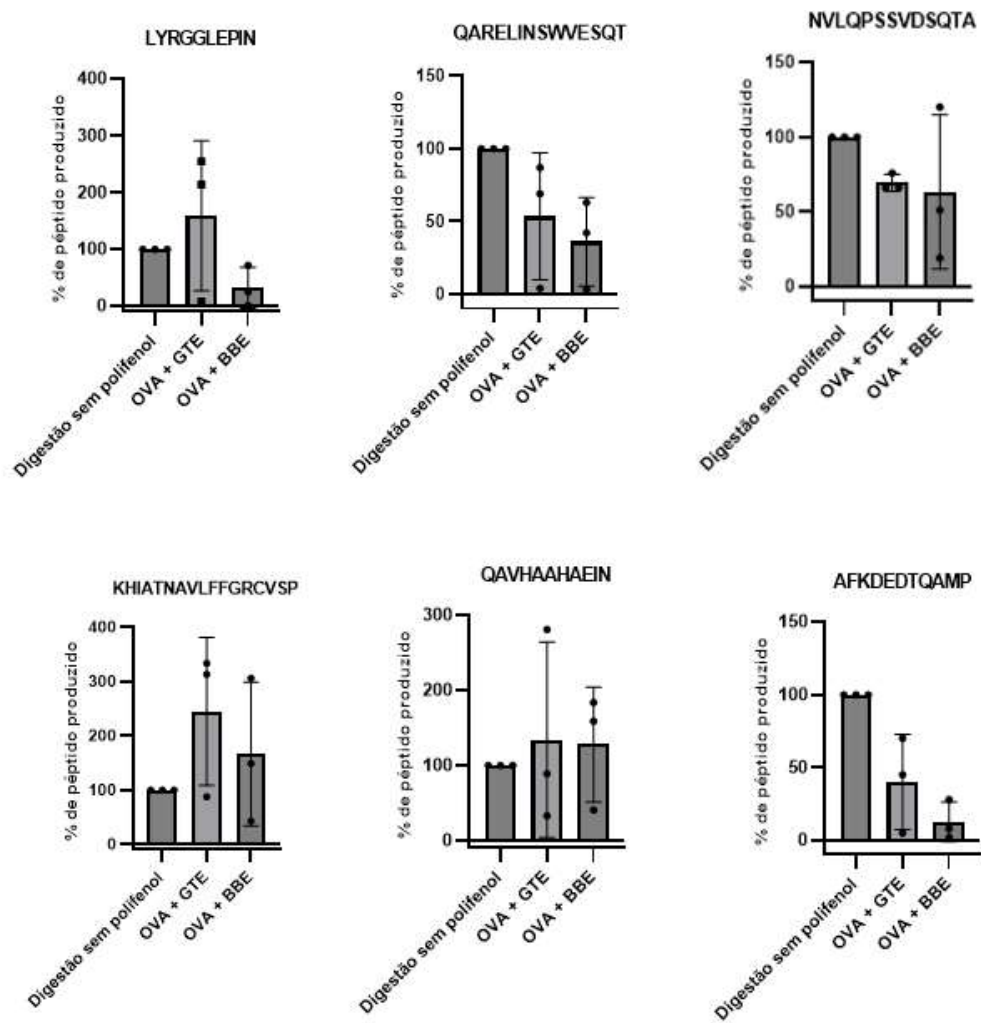


Figura 10- Influência da digestão de polifenóis na produção de péptidos imunogénicos da clara de ovo

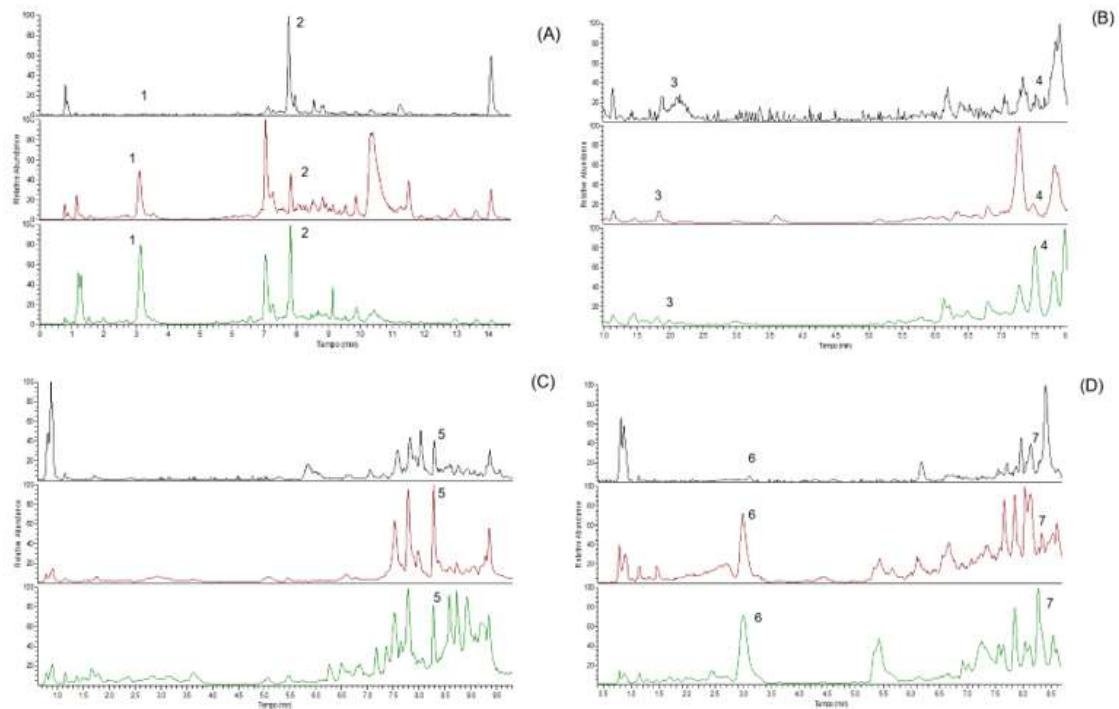


Figura 11-- Cromatogramas dos digestos de: gema isolada analisado por HPLC-MS a 280 nm (a preto); gema + GTE (a vermelho); gema + BBE (a verde).; em modo *Mass range* [1112.6612-1114.5612, 753.0014-755.0014] (A); [1145.4937, 1147.4937] (B); [719.9713-721.9713] (C); [830.4697-832.4697, 738.9701-740.9701] (D). Identificação dos picos na tabela 7

Tabela 7-Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de gema; efeitos da digestão com polifenóis na produção destes

| Pico | Composto | Fórmula              | M/z       | RT   | 0'+GTE/<br>0' | 0'+BBE/<br>0' |
|------|----------|----------------------|-----------|------|---------------|---------------|
| 1    | Gald5    | DMFSFDEKLCSAPAEEREV  | 754.0014  | 3.15 | 1256%         | 5138%         |
| 2    | Gald5    | TGKKMTTIGTKCCQLGED   | 1113.5612 | 7.85 | 1844%         | 7911%         |
| 3    | Gald5    | CCKTDNPAECYANAQEQ    | 748.3102  | 2.15 | 234%          | 276%          |
| 4    | Gald5    | HDTCKRQETTPINDNVSC   | 1146.4937 | 7.53 | 534%          | 3130%         |
| 5    | Gald5    | VDKCCCKQSDINTCFGEEGA | 720.9713  | 8.28 | 901%          | 286%          |
| 6    | Gald5    | RSDYGAMADCCSKADPE    | 739.9701  | 3.11 | 1579%         | 5862%         |
| 7    | Gald5    | DFLKSILIRYTKMPQVVP   | 831.4697  | 8.4  | 46%           | 396%          |

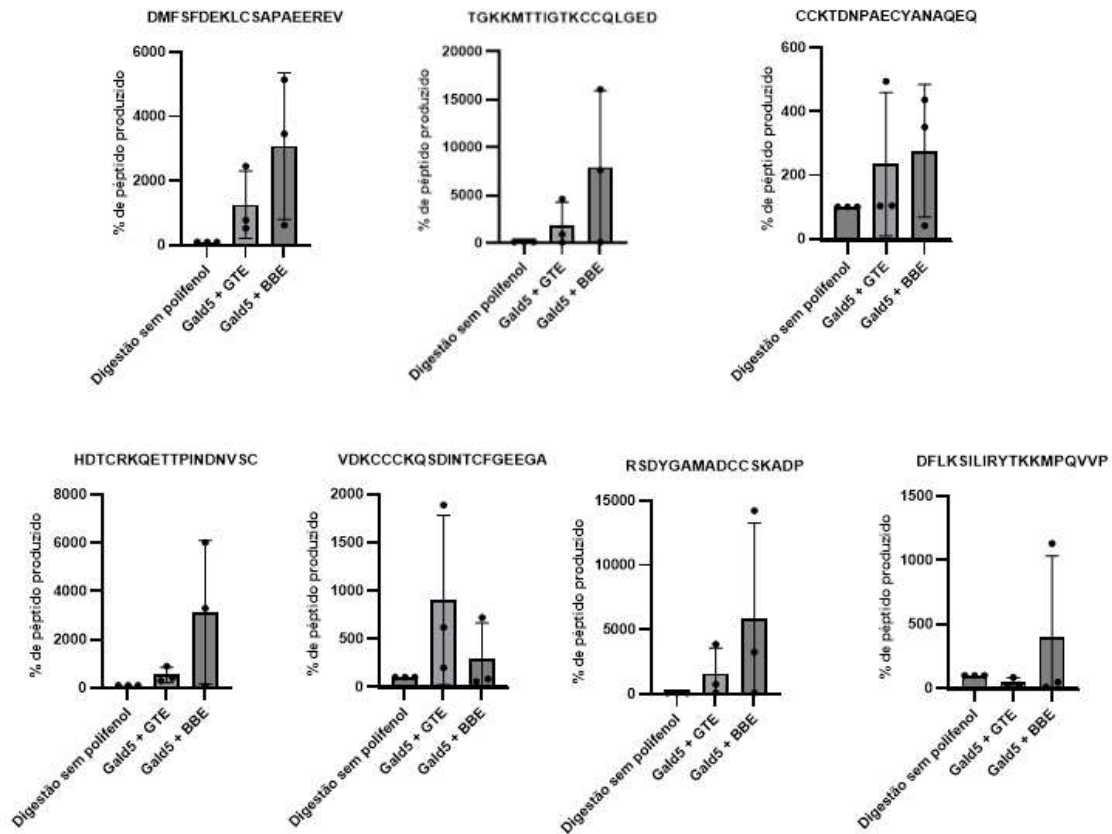


Figura 12- Influência da digestão de polifenóis na produção de péptidos imunogénicos da gema de ovo

Nas figuras 9 e 11 estão representados os espectros de massa obtidos após análise dos digestos de clara e gema obtidas por HPLC-MS sendo possível observar os efeitos dos polifenóis na produção de péptidos imunogénicos.

As figuras 9 e 10 representam o espectro de massa das amostras em que se digeriu clara isolada, clara e GTE e clara e BBE, e a variação da produção de péptidos imunogénicos induzida pela introdução de polifenóis na digestão. É possível observar que os polifenóis induziram um efeito na digestão do conhecido alergénio ovalbumina levando a níveis de péptidos libertados distintos da condição base.

Estas variações são, no entanto, distintas entre péptidos com alguns como o péptido QARELINSWVESQT e o péptido NVLQPSSVDSQTA a sofrerem aparentes reduções nos seus níveis de produção consequentes de uma digestão menos intensa enquanto que outros como o péptido KHIATNAVLFFGRGVSP são produzidos em maior quantidade quando na presença de polifenóis. No entanto após análise ANOVA de um fator, a grande maioria dos resultados observados não apresenta diferença significativa.

Já as figuras 11 e 12 apresentam o espectro de massa das amostras em que se digeriu gema isolada, gema e GTE e gema e BBE, e a variação da produção de péptidos imunogénicos induzida pela introdução de polifenóis na digestão. Aqui a proteína alvo de análise é a  $\alpha$ -livetina visto que o potencial alérgico da gema de ovo está largamente associado a esta proteína. Aqui, mais uma vez ocorre alterações na produção de péptidos na presença de polifenóis distintas dependendo do péptido produzido; no entanto, a produção de péptidos provenientes da  $\alpha$ -livetina apresenta uma clara tendência: a presença de polifenóis é benéfica para a sua produção, sendo tal facto verificado após análise ANOVA de um fator.

Assim, o efeito observado dos polifenóis na digestão de proteínas do ovo apresenta claras distinções dependendo da matriz abordada.

Na clara, os efeitos dos polifenóis são mais variáveis e específicos para cada péptido, enquanto que péptidos como LYRGGLEPIN e KHIATNAVLFFGRGVSP sofrem um aumento quando a digestão é feita na presença de polifenol de chá, péptidos como o AFKDEDTQAMP sofrem uma diminuição na sua produção; tal pode ser um fator importante na determinação da resposta imune das diferentes condições visto que diferentes péptidos terão diferente potencial alérgico.

Já na clara, apesar de os valores continuarem a apresentar elevada variabilidade, é possível observar uma tendência sendo esta que na presença de polifenóis, a produção dos péptidos imunogénicos aumenta: péptidos como VDKCCCKQSDINTCFGEEGA apresentam uma produção máxima na presença de polifenóis de extrato de chá verde enquanto que os restantes apresentam produção máxima na presença de extrato de polifenóis de mirtilo. Tais resultados vão de acordo com o observado no ponto 4.3 com a digestão a ser promovida na presença de extrato de mirtilo. Este aumento da digestibilidade das proteínas da gema pode estar relacionado a uma diminuição do seu potencial alérgico visto que este é dependente da quantidade de proteína intacta que chega ao intestino (78).

#### 4.4.1- Transporte transepitelial de péptidos imunogénicos

A capacidade dos péptidos de se deslocarem através da monocamada celular foi avaliada ao se comparar a área do sinal dos péptidos presentes na fase apical no instante zero do ensaio, ou seja, antes absorção; com a área do sinal dos mesmos péptidos presentes na fase apical após três horas. Inicialmente pretendia-se também um estudo da cinética deste transporte, observando-se a passagem dos péptidos após 30, 60, 120 e 180 minutos para a fase basolateral dos transwell; porém, o sinal resultante da passagem destes péptidos não foi detetado. Tal pode ser devido às quantidades reduzidas de proteína utilizada durante a digestão que resultou numa quantidade demasiado baixa de péptidos tornando-se impossível a sua deteção, ou a possíveis alterações no seu transporte, sendo uma hipótese a possibilidade de os péptidos terem sido transportados eficientemente para o meio intracelular, mas não serem transportados deste para a fase basolateral do transwell.

Assumiu-se que a quantidade de péptido em cada condição era diretamente proporcional à área do pico que correspondia a este. Assim, uma maior área correspondia a uma maior quantidade de péptido em solução.

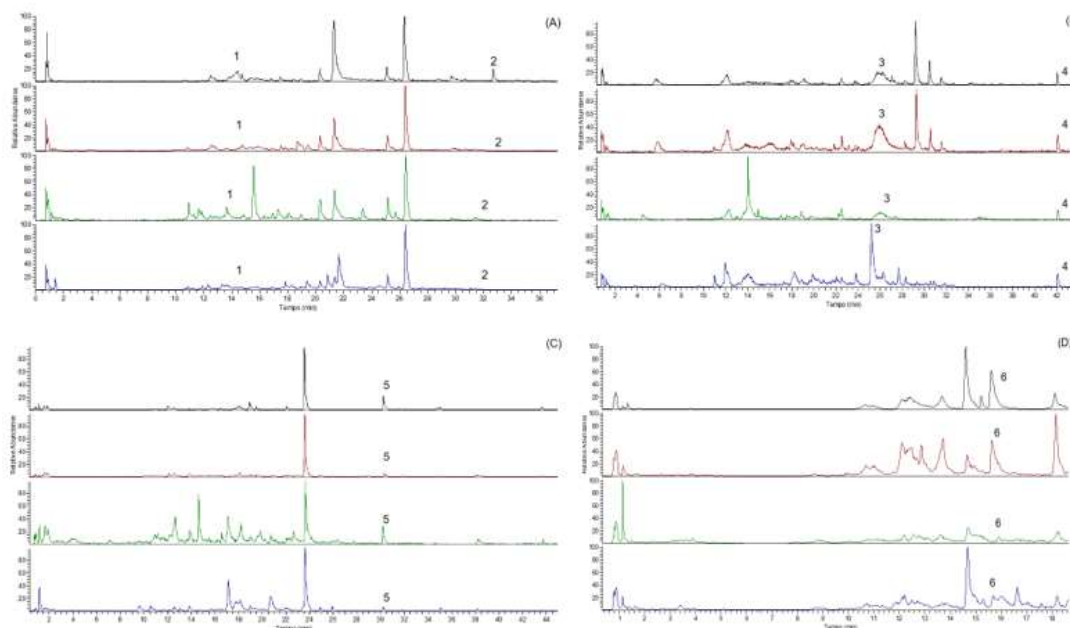


Figura 13- Cromatogramas de digestos de clara analisados por HPLC-MS a 280 nm antes de absorção (a preto); fase apical do digesto de clara após ensaio de bioacessibilidade (a vermelho); fase apical do digesto de clara + GTE após ensaio de bioacessibilidade (a verde); fase apical do digesto de clara + BBE após ensaio de bioacessibilidade (a azul). em modo *Mass range*: [829.9181, 831.9181, 565.3115-567.3115] (A); [929.5011-931.5011, 672.333-674.333] (B); [579.7940-581.7940] (C); [625.7794-627.7794]. Identificação dos picos efetuada na Tabela 8.

As áreas foram tiradas com recurso ao programa *Xcalibur*. As figuras 13 e 14 correspondem aos espectros de massa das digestões de clara e gema respetivamente.

Tabela 8-Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de clara; efeitos da digestão com polifenóis na sua bioacessibilidade

| Pico | Composto | Fórmula           | M/z      | RT    | A 3h /0' | A+ GTE 3h /0' | A+BBE 3h /0' |
|------|----------|-------------------|----------|-------|----------|---------------|--------------|
| 1    | OVA      | LYRGGLEPIN        | 566.3115 | 14.4  | 32%      | 6%            | 15%          |
| 2    | OVA      | QARELINSWVESQT    | 830.9181 | 32.69 | 55%      | 0%            | 19%          |
| 3    | OVA      | NVLQPSSVDSQTA     | 673.3333 | 25.21 | 72%      | 13%           | 54%          |
| 4    | OVA      | KHIATNAVLFFGRGVSP | 930.5011 | 42.05 | 70%      | 62%           | 91%          |
| 5    | OVA      | QAVHAAHAEIN       | 580.794  | 30.25 | 50%      | 25%           | 52%          |
| 6    | OVA      | AFKDEDTQAMP       | 626.7794 | 15.63 | 33%      | 0%            | 10%          |

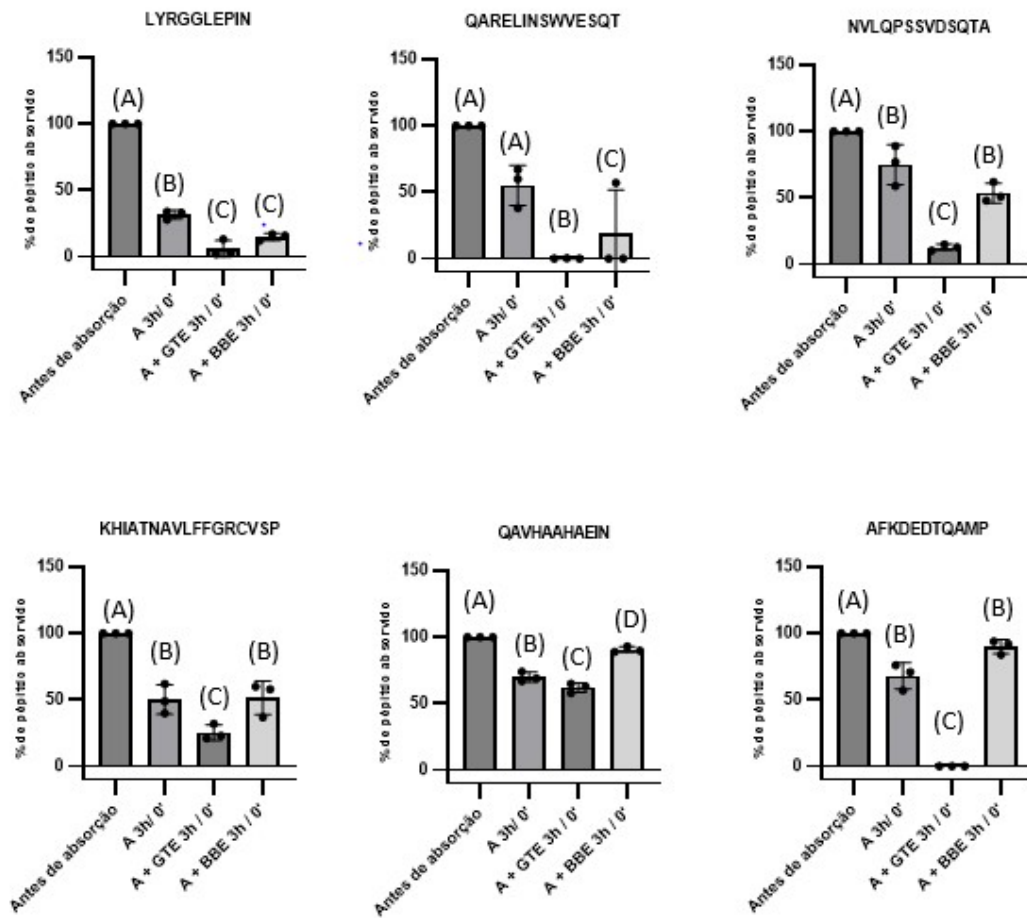


Figura 14-Influência da digestão de polifenóis na bioacessibilidade de péptidos imunogénicos da clara de ovo. Resultados estatisticamente diferentes estão assinalados com letras diferentes

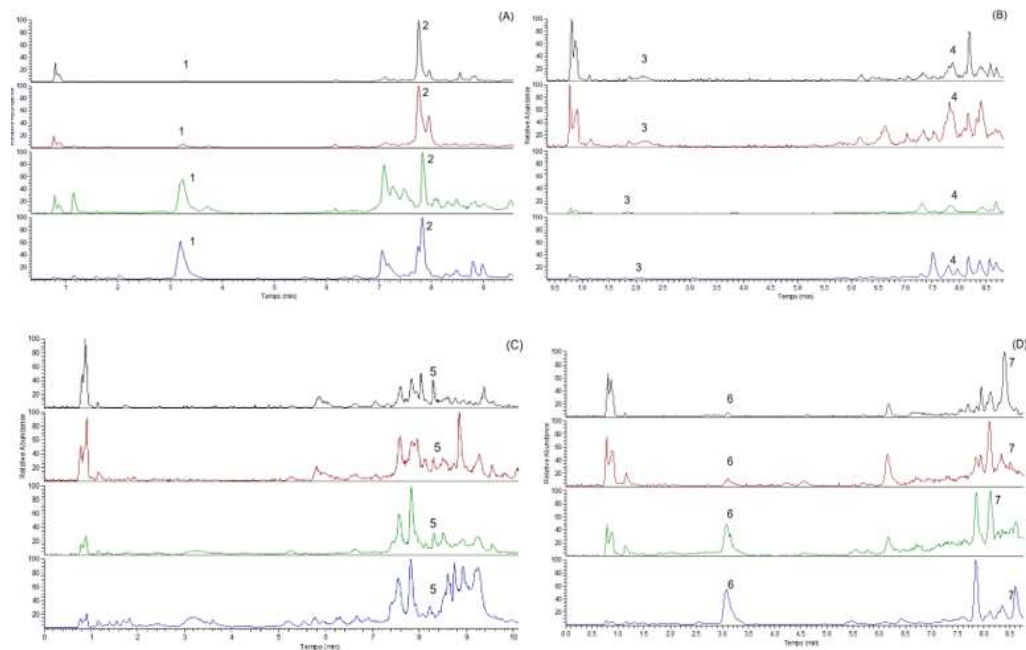


Figura 15-Cromatogramas de digestos de gema analisados por HPLC-MS a 280 nm antes de absorção (a preto); fase apical do digesto de gema após ensaio de bioacessibilidade (a vermelho); fase apical do digesto de gema + GTE após ensaio de bioacessibilidade em modo *Mass range* [1112.6612-1114.5612, 753.0014-755.0014] (A); [1145.4937, 1147.4937] (B); [719.9713-721.9713] (C); [830.4697-832.4697, 738.9701-740.9701] (D). Identificação dos picos na tabela 9

Tabela 9-Péptidos imunogénicos identificados nos digestos de gema; efeitos da digestão com polifenóis na sua bioacessibilidade

| Pico | Composto | Fórmula               | M/z       | RT   | A 3h /0' | A+ GTE 3h /0' | A+ BB E 3h /0' |
|------|----------|-----------------------|-----------|------|----------|---------------|----------------|
| 1    | Gald5    | DMFSFDEKLCSAPAEERE V  | 754.0014  | 3.15 | 96%      | 70%           | 79%            |
| 2    | Gald5    | TGKKMTTIGTKCCQLGED    | 1113.5612 | 7.85 | 87%      | 66%           | 78%            |
| 4    | Gald5    | CCKTDNPAECYANAQEQ     | 748.3102  | 2.15 | 90%      | 44%           | 67%            |
| 3    | Gald5    | HDTCRKQETTPINDNVSC    | 1146.4937 | 7.53 | 66%      | 49%           | 63%            |
| 5    | Gald5    | VDKCCCKQSDINTCFGEE GA | 720.9713  | 8.28 | 30%      | 13%           | 14%            |
| 6    | Gald5    | RSDYGAMADCCSKADPE     | 739.9701  | 3.11 | 89%      | 65%           | 90%            |
| 7    | Gald5    | DFLKSILIRYTKKMPQVVP   | 831.4697  | 8.4  | 81%      | 53%           | 51%            |



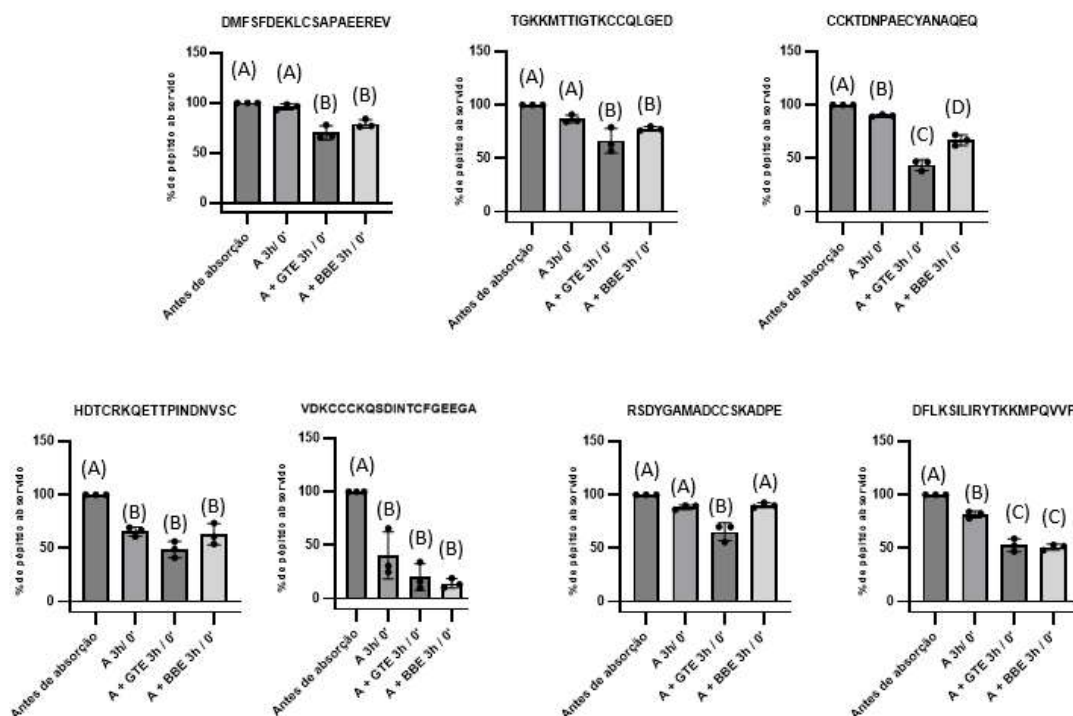


Figura 16-Influência da digestão de polifenóis na bioacessibilidade de péptidos imunogénicos da gema de ovo. Resultados estatisticamente diferentes estão assinalados com letras diferentes.

As significâncias dos resultados obtidos foram determinadas por ANOVA de um fator.

Por análise das figuras 13 e 15, observa-se que a presença de polifenóis influencia a sua capacidade de péptidos se translocarem através da monocamada celular.

Tal é constatado pois ao compararmos a quantidade de péptidos presentes no instante inicial (0') com a quantidade de péptidos retidos no lado apical após conclusão do ensaio de biodisponibilidade, vemos diminuição significativa quando gema é digerida sozinha e em alguns casos da proteína de clara. Assim, para o caso do péptido TGKKMTTIGTKCCQLGED, na ausência de polifenol, após o ensaio 87% deste péptido fica retido; porém na presença de polifenóis de extrato de chá verde, apenas 66% ficam retidos.

No caso de certos péptidos, como o péptido HDTCRKQETTPINDNVSC para o caso da gema e o péptido QAVHAAHAEIN no caso da clara de ovo é ainda possível verificar que este efeito depende do tipo de polifenol; os polifenóis de mirtilo, antocianinas têm a

capacidade de suprimir mais a translocação de péptidos do que polifenóis de chá verde, os flavanois (derivados de catequina e epicatequina).

Pouco se sabe ainda sobre a forma como péptidos originados de proteínas de ovo são transportados do lúmen intestinal para o sistema circulatório (56), enquanto que alguns conseguirão deslocar-se através das junções de oclusão entre enterócitos ou com recurso a transportadores específicos, para outros tal parece improvável, no caso de polifenóis, não estão ainda descritos transportadores. De acordo com a literatura, as propriedades alergénicas do ovo devem-se ao reconhecimento por células apresentadoras de antígenos produzidos pelo organismo, de epitopes podendo estes ser sequenciais ou conformacionais. O reconhecimento de epitopes sequenciais está associado a uma alergia de ovo persistente enquanto que o reconhecimento de epitopes conformacionais a alergia transiente. Assim, alterações na digestão de proteína de ovo estão diretamente ligados à produção de resposta imune devido à indução de alterações na produção de epitopes conformacionais, relacionados a uma resposta imune transiente. Esta resposta imune no entanto dependente do reconhecimento destes epitopes por células específicas como mastócitos.

Foi possível então observar que a presença de polifenóis afetou a quantidade de péptidos retidos na fase apical após conclusão do ensaio sendo este efeito dependente do tipo de polifenol usado para certos péptidos; esta diminuição é devida a um aumento de péptidos capazes de atravessar a camada célula. Tal efeito pode ser justificado pela capacidade de polifenóis de interagir com os péptidos de ovo facilitando a sua translocação. Esta diminuição da retenção teria, consequentemente, um efeito na resposta imune pois um aumento de péptidos capazes de atravessarem a camada celular poderá traduzir-se num aumento de epítomos presentes na matriz celular

## 4.5- Secreção de IL-8 pelas células Caco-2

De forma a avaliar alterações na resposta inflamatória/imunológica induzidas pelos digestos procedeu-se à quantificação dos níveis libertados de um mediador essencial de processos inflamatórios, a IL-8.

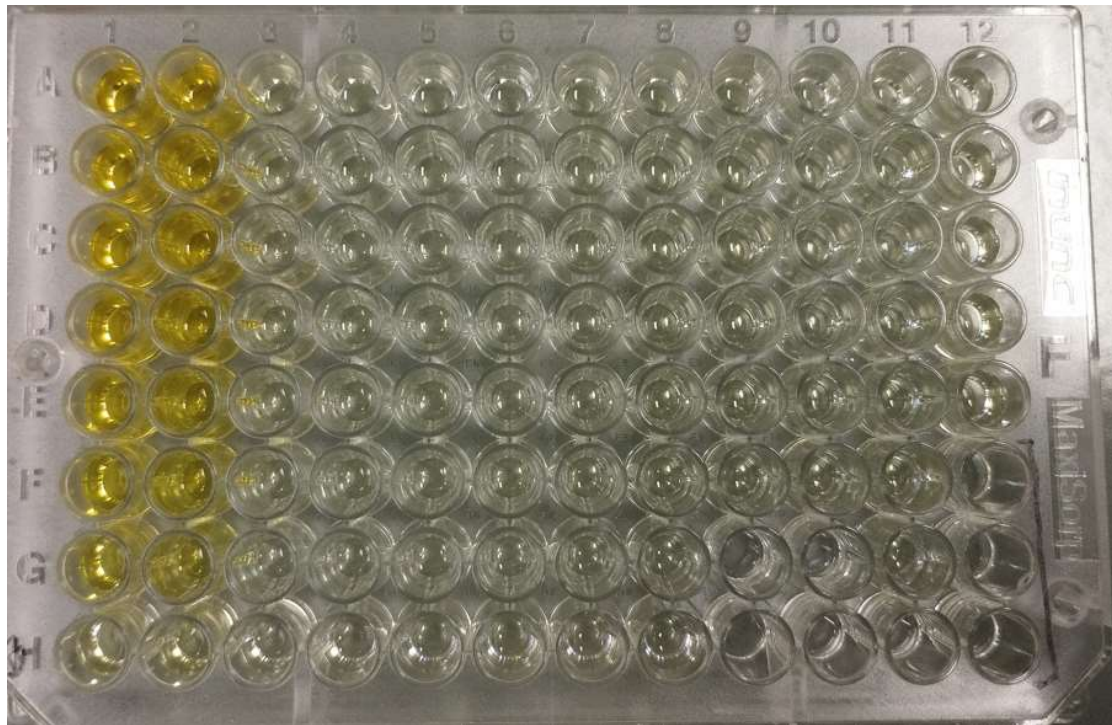


Figura 17-Ensaio de libertação de IL-8 após exposição a péptidos imunogénicos. As duas primeiras filas correspondem aos standards.

Porém tal não foi possível. Todas as condições estudadas apresentavam sinal semelhante ao branco, não sendo possível tirar conclusões acerca da quantidade de interleucinas libertada em cada condição.

No entanto, como é sempre possível que tenha havido libertação de interleucinas, mas devido à sua reduzida quantidade que ficou aquém do limite de deteção do método, este ensaio revelou-se como ineficiente.

Esta falta de resultados pode, no entanto, permitir formular algumas hipóteses. Como o ensaio utilizado apresentava alta especificidade para a interleucina IL-8, é simplesmente possível que esta interleucina não esteja envolvida nesta cascata de sinalização, sendo

por exemplo a interleucina mais importante aqui a IL-4. Por outro lado, esta via de sinalização específica pode ainda não necessitar de interleucinas como mediadores.

Devido a referências na literatura da capacidade dos polifenóis de reduzirem a produção de interleucinas inflamatórias, como por exemplo a quercetina, com este protocolo esperávamos detetar o mesmo: condições em que a digestão de proteína foi realizada em simultâneo com digestão de extrato de polifenol teriam levado a uma menor resposta imune devido a uma melhor digestão da proteína resultando numa menor produção de interleucinas.

#### 4.6- Caracterização da interação proteína-polifenol

Até este momento, foi verificada a capacidade de os polifenóis utilizados induzirem tanto alterações na digestão de proteínas do ovo, a formação de péptidos imunológicos bem como afetar a sua absorção em ensaios de simulação da barreira intestinal. Em relação à capacidade dos polifenóis para alterar a digestão de proteínas do ovo e consequentemente na formação de péptidos imunológicos, existem dois mecanismos possíveis, como referido anteriormente: a) a interação dos polifenóis com as enzimas digestivas modulando a sua atividade enzimática ou b) a interação dos polifenóis com as proteínas do ovo alterando a sua acessibilidade para as enzimas digestivas, e consequentemente a sua digestão.

Assim, de forma a estudar a possibilidade do mecanismo b) procedeu-se a ensaios de *quenching* de fluorescência. Estes baseiam-se no princípio de que a ligação entre dois elementos induz alterações na fluorescência intrínseca devido a alterações conformacionais induzidas por consequência da ligação (80).

Assim, avaliou-se a ligação entre proteína de clara de ovo com polifenóis de chá verde e polifenóis de mirtilo.

Os resultados obtidos foram tratados de acordo com a literatura (81, 82), e com recurso à Equação 1, determinou-se a constante de Stern-Volmer (Equações 3 e 4) para ambos os casos, comparando-se esta com valores tabelados (Tabela 10)

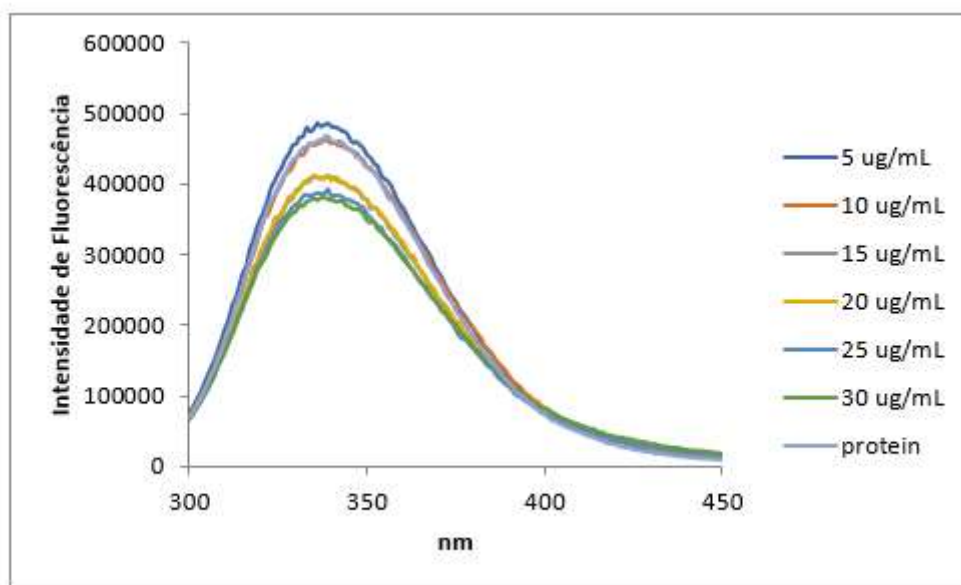


Figura 18- Espectro de emissão de fluorescência (exc= 290 nm) de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de polifenóis de chá verde.

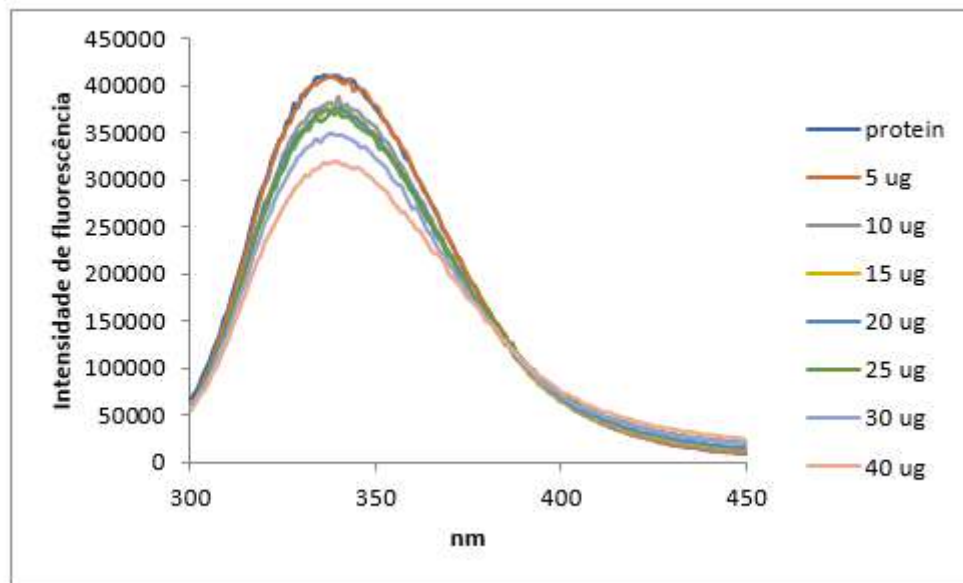


Figura 19-Espetro de emissão de fluorescência (exc= 290 nm) de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de polifenóis de mirtilo.

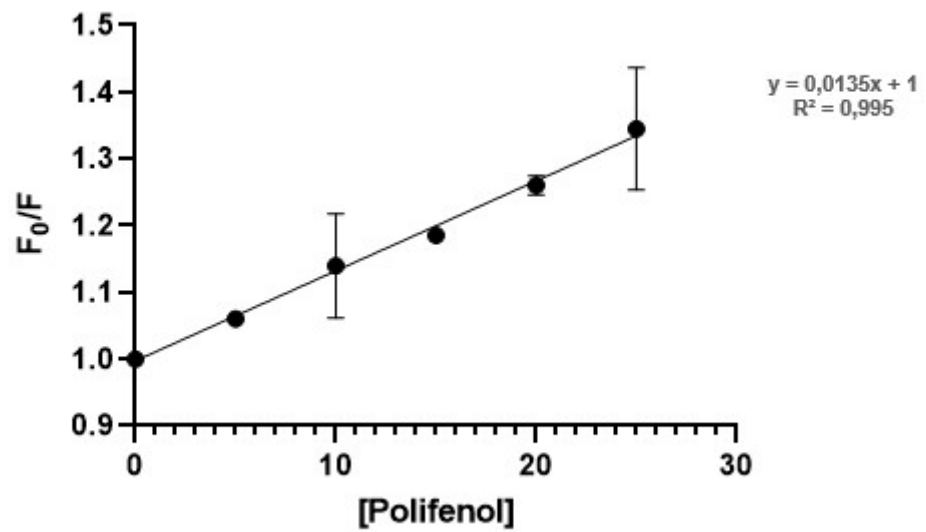


Figura 20- Equações de Stern- Volmer para a interação de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) com quantidades crescentes de polifenóis de chá verde

$$y = (0.01348 \pm 0.001337)x + 1 \quad (3)$$

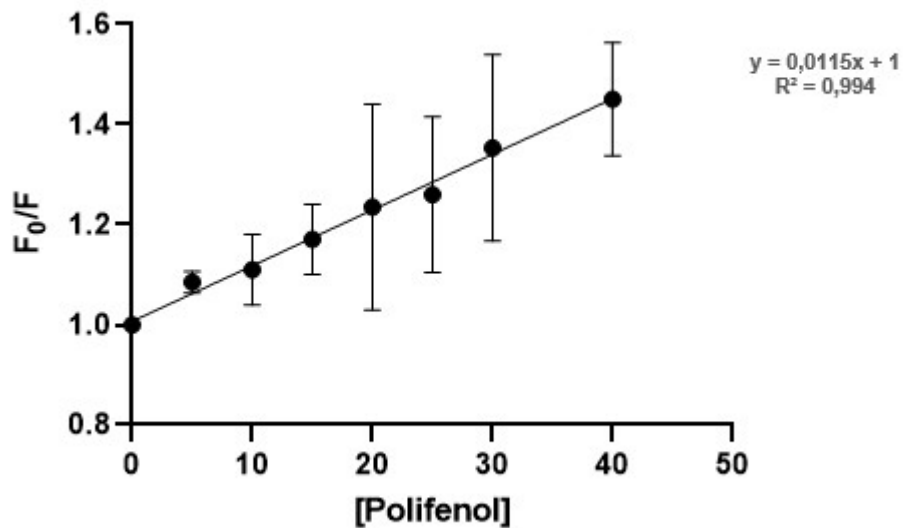


Figura 21-Equações de Stern- Volmer para a interação de proteína de clara de ovo (0.4 mg/mL) com quantidades crescentes de polifenóis de mirtilo.

$$y = (0.0115 \pm 0.001818)x + 1 \quad (4)$$

Por análise das figuras 18 e 19, é possível observar o efeito dos polifenóis na fluorescência da proteína de clara de ovo no geral: um aumento da concentração de polifenóis tanto de chá verde como de mirtilo, implica uma redução na fluorescência.

Tabela 10-Constantes de Stern-Volmer para a interação de albumina sérica humana com diversas catequinas e antocianinas

|     | Catequinas |      |    |     |     | Antocianinas    |                     |                   |
|-----|------------|------|----|-----|-----|-----------------|---------------------|-------------------|
|     | C          | EGCG | EC | EGC | ECG | Cianidina-3-glc | Pelagornidina-3-glc | Delfinidian-3-glc |
| HSA | 10.0       | 8.2  | -  | -   | -   | 5.45            | 8.29                | 4.56              |

As figuras 20 e 21 fornecem informação referente à constante de Stern-Volmer da interação entre polifenóis de extrato chá verde e polifenóis de extrato de mirtilo e proteína de clara de ovo.

O facto de estas duas famílias de polifenóis apresentarem interação com proteínas está de acordo com a literatura sendo esta interação entre polifenóis e proteínas bem documentada, estando por exemplo por detrás da sensação de adstringência característica do consumo de vinhos e de chá verde.

Comparando-se esses valores com os da tabela 10, verificamos que em ambos os casos, as catequinas tendem a ter mais interação com proteínas humanas do que antocianinas de extrato de mirtilo (81, 82), sendo o mesmo verificado neste ensaio. As catequinas do extrato de chá verde tiveram uma interação com proteína de clara de ovo mais forte do que antocianinas de extrato de mirtilo.

Tal está de acordo com os resultados anteriores, com o extrato de mirtilo a apresentar uma atividade promotora da digestão devido de não interagir tanto com proteínas quando comparado com catequinas de extrato de chá verde.



## 5-Conclusão

Avanços no conhecimento científico mudaram para sempre a relação que o ser humano tem com aquilo que consome. Algo que durante muito tempo foi visto como nada mais do que uma maneira de afastar inanição passou a ser algo que era capaz de afetar a nossa qualidade de vida.

Novas indústrias e áreas de investigação foram criadas para satisfazer as novas exigências da população que procurava agora não só alimentos para sobreviver, mas sim alimentos mais saborosos, mais acessíveis e mais saudáveis.

Como consequência doenças como deficiências nutricionais e outras passaram a ser algo do passado, e abriu-se o caminho de usar a alimentação como ferramenta contra as doenças que hoje mais afetam a população geral.

Entre estas as alergias alimentares destacam-se devido à crescente incidência e ausência de tratamentos eficazes. Entre as várias alergias existentes a alergia a proteína de ovo destaca-se não só por afetar uma população vulnerável, mas também pelo uso destas proteínas em várias áreas, desde para consumo como para criação de medicamentos.

Com este projeto procurámos melhor perceber o efeito que polifenóis, compostos bioativos pertencentes ao grupo dos nutracêuticos, têm na modulação da resposta imunológica a estes péptidos.

Foi possível demonstrar que o consumo de polifenóis não só teve um papel importante na digestão (83), possibilitando a ação de enzimas numa proteína normalmente resistente à ação destas, mas também na biodisponibilidade dos péptidos resultantes, ao suprimir a sua entrada no sistema circulatório. Demonstrou-se também que estes efeitos estavam diretamente relacionados à interação que os polifenóis estabeleciam com as proteínas.

## 6. Perspetivas futuras

Mais pode ainda ser feito com este tema, no entanto, desde elucidar a forma como os polifenóis beneficiam a digestão, quer seja por a sua interação com proteínas do ovo tornar estas mais suscetíveis a ação das enzimas digestivas ou se a interação de polifenóis com as enzimas as torna mais eficientes. Por outro lado, este projeto beneficiaria ainda da introdução de mais variáveis; apesar do consumo de chá verde e mirtilos ser comum, o seu consumo em simultâneo com ovo já não o é. O estudo dos efeitos de processos como a cozedura da proteína do ovo ou a introdução de outros elementos como carboidratos, que são apontados na literatura como responsáveis pela diminuição das propriedades bioativas dos polifenóis, teriam nos efeitos descritos neste projeto seriam uma boa forma de tornar os resultados aqui obtidos mais relevantes para o cidadão comum.

## 6-Referências

1. Stiner, M. C., & Kuhn, S. L. (2009). Paleolithic diet and the division of labor in Mediterranean Eurasia. In *The Evolution of Hominin Diets* (pp. 157-169). Springer, Dordrecht.
2. Mann, N. J. (2004). Paleolithic nutrition: what can we learn from the past?. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13.
3. Sánchez-Villagra, M. R., Geiger, M., & Schneider, R. A. (2016). The taming of the neural crest: a developmental perspective on the origins of morphological covariation in domesticated mammals. *Royal Society open science*, 3(6), 160107.
4. Andlauer, W., & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35(2-3), 171-176.
5. Piro, A., Tagarelli, G., Lagonia, P., Tagarelli, A., & Quattrone, A. (2010). Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 57(2), 85-88.
6. Stephenson, L. S., Latham, M. C., & Ottesen, E. A. (2000). Global malnutrition. *Parasitology*, 121(S1), S5-S22.
7. Dureja, H., Kaushik, D., & Kumar, V. (2003). Developments in nutraceuticals. *Indian journal of pharmacology*, 35(6), 363-372.
8. Alonso, E. B., Cockx, L., & Swinnen, J. (2018). Culture and food security. *Global food security*, 17, 113-127.
9. Sachdeva, V., Roy, A., & Bharadvaja, N. (2020). Current prospects of nutraceuticals: A review. *Current pharmaceutical biotechnology*, 21(10), 884-896.
10. Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008.
11. Shahidi, F. (2012). Nutraceuticals, functional foods and dietary supplements in health and disease. *J. Food Drug Anal*, 20(1), 226-230.
12. Von Schacky, C., & Harris, W. S. (2007). Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovascular research*, 73(2), 310-315.
13. Thomas, D. R. (2006). Vitamins in aging, health, and longevity. *Clinical interventions in aging*, 1(1), 81.
14. Thomas, D. R. (2004). Vitamins in health and aging. *Clinics in geriatric medicine*, 20(2), 259-274.
15. Figueroa-González, I., Quijano, G., Ramirez, G., & Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1341-1348.
16. Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 1700-1741.
17. Xiao, J. B., & Hogger, P. (2015). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current medicinal chemistry*, 22(1), 23-38.

18. Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., & Tai, T. C. (2013). Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 5(10), 3779-3827.
19. Trzeciakiewicz, A., Habauzit, V., & Horcajada, M. N. (2009). When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutrition Research Reviews*, 22(1), 68-81.
20. Asensi, M., Ortega, A., Mena, S., Feddi, F., & Estrela, J. M. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(5-6), 197-216.
21. Ronis, M. J., Pedersen, K. B., & Watt, J. (2018). Adverse effects of nutraceuticals and dietary supplements. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 58, 583.
22. Abdel-Daim, M., Abushouk, A. I., Reggi, R., Yarla, N. S., Palmery, M., & Peluso, I. (2018). Association of antioxidant nutraceuticals and acetaminophen (paracetamol): Friend or foe?. *Journal of food and drug analysis*, 26(2), S78-S87.
23. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
24. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
25. Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301-311.
26. Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 44(5-6), 483-525.
27. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
28. Setchell, K. D., & Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The journal of nutrition*, 129(3), 758S-767S.
29. Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
30. Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871.
31. Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
32. Kim, J. (2008). Protective effects of Asian dietary items on cancers-soy and ginseng. *Asian Pac J Cancer Prev*, 9(4), 543-8.
33. Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.

34. Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282.
35. Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 78.
36. D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1321-1342.
37. van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., Jacobs, D. M., A. Kemperman, R., van Velzen, E. J., Gross, G., ... & Van de Wiele, T. (2011). Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(supplement\_1), 4531-4538.
38. Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese medicine*, 5(1), 1-9.
39. Afzal, M., Safer, A. M., & Menon, M. (2015). Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology*, 23(4), 151-161.
40. Langlais, F., Kerboull, M., Sedel, L., & Ling, R. S. M. (2003). The 'French paradox'. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 85(1), 17-20.
41. Ahmad, N., & Mukhtar, H. (1999). Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutrition reviews*, 57(3), 78-83.
42. Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L. R., Krikorian, R., Stull, A. J., Tremblay, F., & Zamora-Ros, R. (2020). Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 11(2), 224-236.
43. ANTUNES, L., RASEIRA, M., ANTUNES, L. E. C., & MARIA DO CARMO BASSOLS RASEIRA, C. P. A. C. T. (2004). A cultura do mirtilo.
44. *fao.org (FAOSTAT)*. «Blueberry production in 2018, Crops/World regions/Production quantity (from pick lists) ». Consultado em 15 de setembro de 2022
45. Piljac-Žegarac, J., Belščak, A., & Piljac, A. (2009). Antioxidant capacity and polyphenolic content of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaf infusions. *Journal of Medicinal Food*, 12(3), 608-614.
46. Wood, E., Hein, S., Heiss, C., Williams, C., & Rodriguez-Mateos, A. (2019). Blueberries and cardiovascular disease prevention. *Food & function*, 10(12), 7621-7633.
47. Rocha, D. M. U. P., Caldas, A. P. S., da Silva, B. P., Hermsdorff, H. H. M., & Alfenas, R. D. C. G. (2019). Effects of blueberry and cranberry consumption on type 2 diabetes glycemic control: A systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(11), 1816-1828.
48. Ma, L., Sun, Z., Zeng, Y., Luo, M., & Yang, J. (2018). Molecular mechanism and health role of functional ingredients in blueberry for chronic disease in human beings. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2785.

49. Wang, J., & Sampson, H. A. (2011). Food allergy. *The Journal of clinical investigation*, 121(3), 827-835.
50. Gupta, R., Holdford, D., Bilaver, L., Dyer, A., Holl, J. L., & Meltzer, D. (2013). The economic impact of childhood food allergy in the United States. *JAMA pediatrics*, 167(11), 1026-1031.
51. Renz, H., Allen, K. J., Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Lack, G., Beyer, K., & Oettgen, H. C. (2018). Food allergy. *Nature reviews Disease primers*, 4(1), 1-20.
52. Sampson, H. A., O'Mahony, L., Burks, A. W., Plaut, M., Lack, G., & Akdis, C. A. (2018). Mechanisms of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 11-19.
53. Helm, R. M., & Burks, A. W. (2000). Mechanisms of food allergy. *Current Opinion in Immunology*, 12(6), 647-653.
54. Burks, A. W., Sampson, H. A., Plaut, M., Lack, G., & Akdis, C. A. (2018). Treatment for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 1-9.
55. Peters, R. L., Gurrin, L. C., & Allen, K. J. (2012). The predictive value of skin prick testing for challenge-proven food allergy: a systematic review. *Pediatric allergy and immunology*, 23(4), 347-352.
56. Caubet, J. C., & Wang, J. (2011). Current understanding of egg allergy. *Pediatric Clinics*, 58(2), 427-443.
57. Dona, D. W., & Suphioglu, C. (2020). Egg allergy: diagnosis and immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5010.
58. Chung, E. H. (2014). Vaccine allergies. *Clinical and experimental vaccine research*, 3(1), 50-57.
59. Sugino, H., Nitoda, T., & Juneja, L. R. (2018). General chemical composition of hen eggs. In *Hen eggs* (pp. 13-24). CRC press.
60. Magrone, T., & Jirillo, E. (2012). Influence of polyphenols on allergic immune reactions: mechanisms of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(2), 316-321.
61. Chirumbolo, S. (2014). Dietary assumption of plant polyphenols and prevention of allergy. *Current pharmaceutical design*, 20(6), 811-839.
62. Singh, A., Holvoet, S., & Mercenier, A. (2011). Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical & experimental allergy*, 41(10), 1346-1359.
63. Bansode, R. R., Randolph, P. D., Plundrich, N. J., Lila, M. A., & Williams, L. L. (2019). Peanut protein-polyphenol aggregate complexation suppresses allergic sensitization to peanut by reducing peanut-specific IgE in C3H/HeJ mice. *Food chemistry*, 299, 125025.
64. Chirumbolo, S. (2014). Dietary assumption of plant polyphenols and prevention of allergy. *Current pharmaceutical design*, 20(6), 811-839.
65. Soares, S., Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Oral interactions between a green tea flavanol extract and red wine anthocyanin extract

using a new cell-based model: Insights on the effect of different oral epithelia. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.

66. Polewski, M. A., Esquivel-Alvarado, D., Wedde, N. S., Kruger, C. G., & Reed, J. D. (2019). Isolation and characterization of blueberry polyphenolic components and their effects on gut barrier dysfunction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(10), 2940-2947.

67. Omana, D.A., et al., Proteomic analysis of egg white proteins during storage. *PROTEOMICS*, 2011. 11(1): p. 144-153.

68. Wang, J., et al., Proteomics Analysis of Egg White Proteins from Different Egg Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. 60(1): p. 272-282.

69. BERRENS, L. and J.H. EDWARDS, Antibodies to bird serum proteins in confectionery workers exposed to egg spray. *Clinical & Experimental Allergy*, 1987. 17(5): p. 405-408.

70. Quirce, S., et al., Inhalant allergy to egg yolk and egg white proteins. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 1998. 28(4): p. 478-485.

71. Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... & Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217-225.

72. Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... & Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.

73. Francisco, T., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., Centeno, F., de Fátima Teixeira, M., & de Freitas, V. (2021). Understanding the molecular interactions between a yeast protein extract and phenolic compounds. *Food Research International*, 143, 110261.

74. Araya-Farias, M., Gaudreau, A., Rozoy, E., & Bazinet, L. (2014). Rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of tea catechins and folates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4241-4250.

75. Mustafa, A. M., Angeloni, S., Abouelenein, D., Acquaticci, L., Xiao, J., Sagratini, G., ... & Caprioli, G. (2022). A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 367, 130743.

76. Nouroozi, R. V., Noroozi, M. V., & Ahmadizadeh, M. (2015). Determination of protein concentration using bradford microplate protein quantification assay. *Disease and Diagnosis*, 4(1), 11-17.

77. Marques, M. C., Hacke, A., Neto, C. A. C., & Mariutti, L. R. (2021). Impact of phenolic compounds in the digestion and absorption of carotenoids. *Current Opinion in Food Science*, 39, 190-196.

78. Jacobsen, B., Hoffmann-Sommergruber, K., Have, T. T., Foss, N., Briza, P., Oberhuber, C., ... & Barkholt, V. (2008). The panel of egg allergens, Gal d 1–Gal d 5: Their improved purification and characterization. *Molecular nutrition & food research*, 52(S2), S176-S185.
79. Qie, X., Wu, Y., Chen, Y., Liu, C., Zeng, M., Qin, F., ... & He, Z. (2021). Competitive interactions among tea catechins, proteins, and digestive enzymes modulate in vitro protein digestibility, catechin bioaccessibility, and antioxidant activity of milk tea beverage model systems. *Food Research International*, 140, 110050.
80. Ren, S., & Giusti, M. M. (2021). Monitoring the Interaction between Thermally Induced Whey Protein and Anthocyanin by Fluorescence Quenching Spectroscopy. *Foods* 2021, 10, 310.
81. Cahyana, Y., & Gordon, M. H. (2013). Interaction of anthocyanins with human serum albumin: Influence of pH and chemical structure on binding. *Food chemistry*, 141(3), 2278-2285.
82. Bose, A. (2016). Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis. *Journal of Luminescence*, 169, 220-226.
83. Sun, L., & Miao, M. (2020). Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(4), 541-555.