



Ciências

# **Estratégia para a redução da capacidade alergénica de proteínas do leite por tratamento com compostos fenólicos**

Ana Margarida Andrade Martins

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em  
**Biotechnologia**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor António José Geraldes de Mendonça  
Co-orientadora: Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

junho de 2022

Folha em branco

# Agradecimentos

A elaboração desta dissertação contou, valiosamente, com a colaboração direta e indireta de diversas pessoas, às quais pretendo agradecer extremadamente.

Em primeiro lugar, quero expressar o meu profundo agradecimento ao Prof. Dr. António José Geraldes de Mendonça e à Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Cândida Ascensão Teixeira Tomaz, Orientador e Coorientadora Científicos, respetivamente, por toda a motivação, dedicação e disponibilidade, bem como por todos os conhecimentos transmitidos.

Mais agradeço:

Aos meus pais, irmã e avós, todo o carinho, incentivo, confiança e orgulho demonstrado em todos os momentos da minha vida, com especial relevo nesta fase da elaboração da presente Dissertação.

À minha irmã, por todo amor e dedicação, por me ter apoiado e ajudado sempre que precisei, e nunca me ter deixado baixar os braços. Por nos momentos menos bons ter estado sempre ao meu lado, com uma palavra de conforto e incentivo.

Ao João, pelo amor, compreensão, paciência, incentivo e ajuda ao longo destes anos. Aos meus padrinhos, Cristina e Filipe Rodrigues, as palavras de apreço e acompanhamento ao longo desta etapa. À tia Fernanda Sampaio, por todo carinho, dedicação, incentivo e pelo seu acompanhamento, durante a realização desta dissertação.

À Daiana, amiga e companheira de laboratório, por toda a ajuda, compreensão, companheirismos, amizade, incentivo e apoio durante todo este processo. À Joana, por toda a compreensão, amizade e por todas as palavras de incentivo e por nunca me ter deixado desistir. E também pelas mesmas razões, mas num registo diferente, à Inês, Rita, Inês, André, Sónia, Hugo e a todos os amigos e colegas que estiveram sempre, de um modo ou de outro, presentes.



# Resumo

As alergias alimentares são um problema cada vez mais recorrente e a sua prevalência parece estar a aumentar. A alergia alimentar resulta de uma reação imunológica que é desencadeada por um alergénio, nomeadamente proteína, que esteja presente numa bebida, alimento ou aditivo consumido. As alergias, resultantes da resposta imunológica, podem ser mediadas ou não por imunoglobulina E (IgE), sendo que as mediadas por IgE são as mais frequentes. A alergia ao leite, é muito comum em crianças de tenra idade, e os seus principais alergénios são as caseínas e as proteínas do soro. O caseinato de sódio (Cas) resulta da junção das quatro frações de caseínas e é usado numa ampla gama de produtos alimentares, nomeadamente como aditivo alimentar. Com o intuito de diminuir o impacto da alergia ao leite, a indústria tem procurado arranjar soluções para este problema, através do desenvolvimento de técnicas para tentar diminuir a alergenicidade das proteínas do leite, uma vez que não há cura para as alergias, a não ser evitar o consumo do produto alergénico. Os compostos fenólicos têm vindo a requerer elevado interesse, uma vez que a sua interação com as proteínas pode provocar alterações na sua estrutura nativa e assim alterar a sua alergenicidade. Estes compostos podem ser encontrados em frutas, vegetais e sementes. Este trabalho teve como objetivo estudar as interações entre os compostos fenólicos e o caseinato de sódio, e analisar o efeito destas interações na estrutura desta proteína através de técnicas espectroscópicas. Para tal, foram utilizados seis compostos fenólicos, nomeadamente ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, quercetina e ácido tânico. Assim, procedeu-se à fase experimental colocando Cas em contacto com cada um dos compostos fenólicos e analisou-se a ocorrência de alterações na estrutura da proteína. A fim de estudar possíveis alterações na estrutura terciária do Cas promovidas pelos seis compostos fenólicos, foi utilizada a técnica de fluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que havia extinção de fluorescência envolvendo maioritariamente um mecanismo estático, o que significa que ocorreu devido à formação de um complexo. O dicroísmo circular foi usado para o estudo das alterações promovidas pela quercetina na estrutura secundária do Cas, tendo sido observado um aumento de hélices- $\alpha$  e uma diminuição de folhas- $\beta$ . Foi também realizado um estudo de *docking* molecular, com a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) e dois compostos fenólicos (quercetina e o ácido tânico) com objetivo de analisar qual o local de ligação destes compostos fenólicos à  $\beta$ -LG. Esta é uma proteína do soro do leite e uma das principais proteínas alergénicas do leite. A análise por *docking* molecular demonstrou que o complexo ácido tânico- $\beta$ -LG era o mais estável. Este trabalho poderá vir a ser um ponto de partida, para a utilização de compostos fenólicos para a redução da alergenicidade do leite, uma vez que a interação de compostos fenólicos pode promover alterações na estrutura da proteína e assim alterar a sua alergenicidade.

## Palavras-chave

Alergia ao leite de vaca,  $\beta$ -Lactoglobulina, caseinato de sódio, compostos fenólicos, técnicas espectroscópicas.

# Abstract

Food allergies are a recurrent problem, and their prevalence appears to be increasing. Food allergy results from an immune reaction that is triggered by an allergen, namely a protein, that is present in a drink, food, or consumer additive. Allergies result from an immune response and those mediated by immunoglobulin E (IgE) are the most frequent. Milk allergy is very common in young children, and its main allergens are caseins and whey proteins. The sodium caseinate (Cas) results from the joining of the four casein fractions and is used in a wide range of food products, namely as a food additive. In order to reduce the impact of milk allergy, the industry has sought to address this problem through the development of techniques to reduce the allergenicity of milk proteins, since there is no cure for allergies and only the eviction of the food is possible. Phenolic compounds are of great interest since their interaction with proteins can cause changes in their native structure and thus alter their allergenicity. These compounds can be found in fruits, vegetables, and seeds. This work aimed to study the interactions between phenolic compounds and Cas and analyze the effect of these interactions on the structure of this protein through spectroscopic techniques. For this, six phenolic compounds were used, namely caffeic acid, gallic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, quercetin and tannic acid. Thus, the experiments were carried out by placing Cas with each phenolic compound and analyze the occurrence of alterations in protein structure. In order to study possible changes in the tertiary structure of Cas caused by the six phenolic compounds, a fluorescence technique was used. The results showed that there was fluorescence extinction mostly by static mechanism, which means that the fluorescence extinction occurred due to the formation of a complex. Circular dichroism was used to study the alterations promoted by quercetin in the secondary structure of Cas and demonstrated an increase in  $\alpha$ -helix and a decrease in  $\beta$ -sheets. A molecular docking was carried out with  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) and two phenolic compounds (quercetin and tannic acid) in order to analyze the binding site of these phenolic compounds to  $\beta$ -LG. This is a whey protein and one of the main allergenic milk proteins. Molecular docking analysis showed that the tannic acid -  $\beta$ -LG complex was the most stable. This work could be a starting point for the use of phenolic compounds to reduce milk allergenicity since the interaction of these compounds can promote changes in the protein structure and thus alter its allergenicity.

## Key words:

$\beta$ -Lactoglobulin, cow's milk allergy, phenolic compounds, sodium caseinate, spectroscopic techniques.



## Comunicações científicas resultantes deste trabalho

- Poster “Interaction of Phenolic Compounds with Sodium Caseinate” para o Symposium Annual do CICS-UBI 2020. Universidade da Beira Interior. Covilhã, 2020.
- Poster “A Spectroscopy Study on the Interaction of Quercetin with Sodium Caseinate”. Para a sessão de posters apresentada no XV Encontro de Química dos Alimentos. Madeira, PT, 2021.



# Índice

Capítulo 1 - Introdução	21
1.1 Alergia Alimentar	21
1.1.1 Alergénios alimentares	23
1.2 Leite	23
1.2.1 Alergia ao leite de vaca	24
1.2.2. Caseinato	24
1.2.3. B-Lactoglobulina	26
1.3. Métodos para redução da alergenicidade das proteínas do leite	26
1.4 Compostos fenólicos	31
1.4.1. Interações entre as proteínas e os compostos fenólicos	32
1.4.2. Alterações na estrutura das proteínas do leite por interação com compostos fenólicos	37
1.5. Técnicas espectroscópicas	39
1.5.1 Espectroscopia de fluorescência	39
1.5.2 Dicroísmo circular	41
1.6 Objetivos do estudo	42
Capítulo 2 - Materiais e métodos	43
2.1 Materiais	43
2.2 Fluorescência	43
2.3 Dicroísmo Circular	44
Capítulo 3 - Resultados e discussão	45
3.1 Fluorescência	45
3.1.1 Análise dos Dados de Ligação	50
3.1.2 Análise termodinâmica	51
3.2 Dicroísmo Circular	52
3.3 Docking molecular de compostos fenólicos com uma proteína do soro de leite	55
Capítulo 4 - Conclusões	59
Anexo A - Gráficos de Stern-Volmer e Lineweaver-Burk	73



# Lista de Figuras

Figura 1 - Demonstração da estrutura de um composto fenólico simples a e a estrutura de um polifenol (Quercetina) b.	32
Figura 2 - Compostos fenólicos e as suas subclasses (Rasteiro, 2012).	33
Figura 3 - Exemplos de Polifenóis.	33
Figura 4 - Exemplos de Ácidos Fenólicos.	34
Figura 5 - Exemplo de Flavonoides.	34
Figura 6 - Interação por ponte de Hidrogénio entre proteína e ácido gálico. Adaptada de, (Le Bourvellec & Renard, 2012; Quan et al., 2019; Q. Zhang et al., 2021).	35
Figura 7 - Interação não covalente entre proteína e compostos fenólico, por meio de interação hidrofóbica. Adaptado, de (Le Bourvellec & Renard, 2012; Quan et al., 2019; Q. Zhang et al., 2021).	36
Figura 8 - Representação de espectros de CD para três tipos de estruturas secundárias. Hélice- $\alpha$ (linha vermelha), folhas- $\beta$ (linha verde) e enrolamento aleatório (linha azul).	41
Figura 9 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5 $\mu$ M na presença de diferentes concentrações de ácido cafeico (AC), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.	45
Figura 10 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5 $\mu$ M na presença de diferentes concentrações de ácido gálico (AG), a tempo; b 10 minutos, à temperatura de 37°C.	46
Figura 11 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5 $\mu$ M na presença de diferentes concentrações de ácido ferúlico (AF), a tempo 0; b 10 minutos, à temperatura de 37°C.	46
Figura 12 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5 $\mu$ M na presença de diferentes concentrações de ácido clorogénico (ACL), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.	46
Figura 13 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5 $\mu$ M na presença de diferentes concentrações de quercetina (QR), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.	47
Figura 14 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5 $\mu$ M na presença de diferentes concentrações de ácido tânico (AT), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.	47
Figura 15 - Espectro de dicroísmo circular de caseinato de sódio-quercetina, sendo CasQR1=8,60x10 <sup>-4</sup> M, CasQR2=1,85x10 <sup>-3</sup> M, à temperatura de 37°C. Ao espectro CasQR foi subtraído o espectro de QR à mesma concentração e obtido nas mesmas condições.	53
Figura 16 - Estrutura 3D da $\beta$ -Lactoglobulina (PDB: 2Q2M).	55
Figura 17 - Conteúdos de estrutura secundária da $\beta$ -Lactoglobulina, hélice- $\alpha$ (a azul), folhas- $\beta$ (a verde) e enrolamento ao acaso (a vermelho).	56

Figura 18 - Imagens de docking molecular de  $\beta$ -Lactoglobulina com ácido tânico A e quercetina B, em que A'' e B'' são imagens de superfície, onde a região a azul representa as zonas hidrofílicas e a região vermelha representa as zonas hidrofóbicas. 57

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Constante de extinção ( $K_{sv}$ ), constante de velocidade de extinção biomolecular ( $K_q$ ) e constante de ligação ( $K_b$ ) entre o Cas e os compostos fenólicos nos tempos 0 e 10 min, à temperatura de 37°C.	49
Tabela 2 - $\Delta G$ relativo à formação do complexo Cas-composto fenólico, à temperatura de 37°C, nos tempos 0 e 10 minutos de incubação.	52
Tabela 3 - Conteúdo da estrutura secundária do Cas, analisado por DC, antes e depois da ligação com as diferentes concentrações da quercetina.	53
Tabela 4 - Energia de ligação obtida pelo docking molecular.	57



## Lista de Figuras do Anexo

Figura A 1 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência do Cas por AC, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	73
Figura A 2 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AC, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	73
Figura A 3 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por AG, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	74
Figura A 4 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AG, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	74
Figura A 5 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por AF, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	75
Figura A 6 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AF, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	75
Figura A 7 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por ACL, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	76
Figura A 8 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais ACL, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	76
Figura A 9 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por QR, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	77
Figura A 10 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais QR, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	77
Figura A 11 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por AT, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	78
Figura A 12 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AT, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.	78



## Lista de Acrónimos

AC	Ácido cafeico
ACL	Ácido clorogénico
AF	Ácido ferúlico
AG	Ácido gálico
ALV	Alergia ao leite de vaca
AT	Ácido tânico
B-LG	B-lactoglobulina
Cas	Caseinato de sódio
Cys	Cisteína
DC	Dicroísmo circular
EGCG	Galato de epigallocatequina
IgE	Imunoglobulina E
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
QR	Quercetina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina



# Capítulo 1 - Introdução

Nas últimas décadas, os casos de alergias alimentares foram sendo cada vez mais diagnosticados. Assim, tornaram-se um problema importante de saúde da população global e para os sistemas de saúde, já que se estima que afetam 6 a 13% dos indivíduos (Sampath et al., 2020). O aumento das alergias alimentares tem sido atribuído a fatores ambientais e genéticos, sobretudo em indivíduos predispostos a reações alérgicas. Assim, os riscos de alergias alimentares podem aumentar, devido a fatores ambientais, estilo de vida, exposição a poluentes, aumento de hábitos de higiene corporal e o uso frequente de antibióticos (Sicherer & Sampson, 2014). Deste modo, a alergia alimentar pode diminuir a qualidade de vida dos doentes afetados e das suas famílias, o que pode provocar um impacto social significativo e situações de ansiedade face às limitações alimentares (Patel et al., 2017).

A alergia alimentar traduz-se pela perda imunológica da tolerância a alergénios alimentares específicos, ainda que o mecanismo exato subjacente ao desenvolvimento da alergia alimentar não tenha sido totalmente esclarecido (Albuhairi & Rachid, 2020).

## 1.1 Alergia Alimentar

As alergias alimentares são respostas imunológicas adversas, sobretudo às proteínas alimentares, que afetam 6% de crianças e 4% de adultos (Sicherer & Sampson, 2006). Cerca de 20% dos doentes alérgicos são obrigados a alterar a sua dieta por causa das reações adversas aos alimentos (Sampson, 2004; Sicherer & Teuber, 2004). Em crianças mais pequenas, os alimentos que mais comumente provocam alergias são o leite de vaca e, logo a seguir o ovo (Wood, 2014). Os alimentos que provocam reações alérgicas são responsáveis por uma grande variedade de sintomas, desde problemas de pele, do trato respiratório e do trato gastrointestinal. As características clínicas variam desde urticária até anafilaxia, provocando risco de vida (Nakagawa et al., 2020). Estas reações podem ser promovidas por mecanismos mediados por imunoglobulina E (IgE) ou não (Sicherer & Sampson, 2006).

A alergia alimentar apresenta-se como uma hipersensibilidade imediata ao alergénio alimentar, na qual anticorpos específicos de IgE, ligados a mastócitos e basófilos desencadeiam a libertação de mediadores responsáveis pelas respostas fisiológicas posteriores. Os sintomas mediados por IgE desenvolvem-se em questão de minutos, a 1-2 horas após a ingestão do alergénio alimentar (Singh & Makharia, 2019). A deteção de IgE sérica específica para alergénios auxilia no diagnóstico de alergias alimentares mediadas por IgE. A IgE específica para determinado alergénio pode ser detetada por testes cutâneos (Abrams & Sicherer, 2016). Menos frequentemente, as alergias alimentares podem ser mediadas por vias não envolvendo IgE. Em geral, essas condições tendem a ser crónicas e persistentes (Abrams & Sicherer, 2016).

O teste de picada na pele é o mais usado para diagnosticar alergias alimentares. Para testes cutâneos, o alergénio em questão é introduzido na epiderme, usando um dispositivo para arranhar ou perfurar a pele. Se o doente tiver anticorpos IgE contra aquele alergénio, desenvolver-se-á uma reação alérgica local nessa zona. Os níveis séricos de IgE específica de alimentos também podem ser determinados usando ensaios imunológicos. A sensibilidade de ambos os testes é alta (90% para testes cutâneos e 70-90% para IgE séricas específicas de alimentos). No entanto, as especificidades dos testes apresentam valores menores de 50% para ambos (Abrams & Sicherer, 2016).

Os testes de referência para confirmação de alergia específica a alimentos são as provas de provocação oral que consistem em expor uma pessoa à substância suspeita de lhe causar alergia, em circunstâncias controladas e em ambiente hospitalar, usando um controlo duplo-cego (“double-blind”) com placebo. No entanto, estas provas de provocação oral são dispendiosas e complexas, pois exigem um ambiente supervisionado por médicos, pessoal especializado e também apresentam o risco de anafilaxia induzida pelo alimento (Singh & Makharia, 2019).

Os epítomos ou determinantes antigénicos dos alergénios são sequências específicas de aminoácidos (aa) na proteína onde se podem ligar os anticorpos IgE. Nas proteínas podem ser identificados dois tipos de epítomos de ligação à IgE: os epítomos lineares ou sequenciais e os conformacionais. Os epítomos lineares são sequências específicas de aminoácidos na estrutura primária da proteína, enquanto que os epítomos conformacionais combinam aminoácidos de diferentes regiões da proteína que estão próximos devido ao enrolamento da cadeia proteica (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2021).

A alergia alimentar é diferente da intolerância alimentar; a última refere-se a uma reação adversa a alimentos, não-imunologicamente mediada, como por exemplo a intolerância à lactose (Sicherer & Sampson, 2018). De modo similar à alergia alimentar, os sintomas da intolerância alimentar também desaparecem após a eliminação do alimento provocante da dieta, mas reaparecem perante a repetição da introdução alimentar do mesmo (Collard, 2010).

### 1.1.1 Alergênios alimentares

Os principais alergênios alimentares, identificados como sendo de classe 1, são glicoproteínas solúveis em água, com 10 a 70 kD de massa, estáveis ao calor, ao ácido gástrico e às proteases digestivas (Breiteneder & Radauer, 2004).

Os principais fatores desencadeantes de alergias alimentares em crianças são proteínas presentes, principalmente, no leite de vaca, ovo, trigo, peixe, frutos do mar, soja, amendoim e noz (Ruiz Oropeza et al., 2017). Também as proteínas de transferência de lípidos não específicas, encontradas na maçã (Mal d 3) ou no milho (Zeam 14) (Breiteneder & Mills, 2005; Breiteneder & Radauer, 2004) estão entre os responsáveis pelo desencadear de alergias alimentares.

Um conjunto limitado de proteínas compõe a maioria dos alergênios alimentares (Breiteneder & Radauer, 2004). Um alimento é composto por inúmeras proteínas e as respostas imunológicas podem ser direcionadas a determinadas proteínas com diferentes consequências clínicas (Mittag et al., 2004). Embora muitas proteínas alimentares compartilhem regiões de homologia e reatividade cruzada em testes de alergia, evidências clínicas de reatividade cruzada não são tão comuns. O aquecimento de alimentos pode reduzir ou aumentar a alergenicidade, dependendo da proteína e das condições utilizadas (Breiteneder & Mills, 2005).

## 1.2 Leite

O leite de vaca é consumido desde há já milhares de anos pelo ser humano dado a sua composição ser relativamente semelhante à do leite humano, sendo, por isso, muitas vezes utilizado como substituto da amamentação materna (van Neerven & Savelkoul, 2019).

O leite inteiro é produzido pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos, e é considerado um “alimento perfeito”, pois é rico em nutrientes essenciais, como glúcidos, lípidos, proteínas, minerais e vitaminas, que vão responder às necessidades fundamentais de desenvolvimento dos recém nascidos (Albenzio et al., 2016; Murphy et al., 2017).

Ainda que o leite seja um fluido biológico específico de cada espécie de mamíferos, consumido por indivíduos jovens pertencentes a essa espécie, há que sublinhar que o ser humano é o único que consome leite produzido por outras espécies na infância e continua a consumi-lo na idade adulta (Foroutan et al., 2019). Se compararmos a quantidade de proteína existente no leite humano e no leite de vaca, este último tem uma concentração de proteína muito maior (Keen et al., 1982). As proteínas do leite são consideradas as de maior interesse, devido ao seu valor nutricional e propriedades funcionais (Masson et al., 2018).

### 1.2.1 Alergia ao leite de vaca

O leite é um dos oito grupos de alimentos responsáveis por cerca de 90% das reações alérgicas aos alimentos. A alergia ao leite de vaca (ALV) é uma alergia alimentar comum na primeira infância, com incidência estimada de 2,0% a 7,5% no primeiro ano de vida (Mousan & Kamat, 2016). É de salientar que os principais alergénios do leite de vaca são as caseínas e as proteínas do soro do leite, incluindo a  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) (Crittenden & Bennett, 2005; Nakagawa et al., 2020).

A alergia a uma ou mais proteínas do leite de vaca é uma reação imunológica às proteínas nele encontradas. As proteínas do leite podem ser ingeridas diretamente através de fórmulas à base desse leite ou passadas pelo leite materno (Fiocchi et al., 2010).

Ainda que muitos adultos manifestem ALV, esta é um tipo de alergia que atinge sobretudo crianças. Estas correm um risco nutricional acrescido, que é acompanhado por um processo inflamatório, o qual pode influenciar as concentrações séricas de micronutrientes ou relacionadas com a dieta de exclusão (Bauer et al., 2015; Flammarion et al., 2011).

A ALV apresenta múltiplas manifestações clínicas. A sua gestão passa pela eliminação dos produtos que contêm proteína do leite de vaca, embora esta dieta possa, entre outros fatores, ter um impacto negativo no estado nutricional das crianças (Dupont et al., 2018).

A maioria dos doentes com ALV, mediada por IgE, é sensível a mais de um alergénio do leite, verificando-se uma grande variabilidade, quer na especificidade, quer na intensidade das respostas de IgE induzidas (Linhart et al., 2019). O tratamento possível baseia-se na exclusão de leite e derivados na dieta dos indivíduos (Boaventura et al., 2019).

É de realçar que o leite de vaca está tão amplamente presente nos alimentos processados, que é difícil evitá-lo na dieta. É por isso que se aconselham os doentes com alergia a ler atentamente os rótulos dos produtos (Kocabaş & Şekerel, 2003). Além disso, o leite de vaca pode estar incluído em ingredientes, sem que tal seja mencionado, especialmente em restaurantes. É por essa razão que se aconselham os indivíduos com alergia ao leite a evitar ao máximo alimentos processados, e a consumir alimentos preparados em casa, cujos componentes estejam todos rotulados (Kocabaş & Şekerel, 2003).

### 1.2.2. Caseinato

As caseínas encontram-se em micelas compostas por moléculas das caseínas, cálcio, fosfato inorgânico e iões de citrato. As caseínas agrupam-se no leite sob a forma de um complexo

fosforilado. Existem quatro caseínas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ), mantidas juntas por interações não covalentes. A fração de caseínas contém os aminoácidos essenciais para o homem, num elevado teor, pelo que é considerada como sendo altamente nutritiva. O caseinato é obtido a partir da coalhada de caseína ácida, precipitada recentemente ou a partir de caseína ácida seca, após reação com soluções alcalinas diluídas (Sarode et al., 2015).

O Cas é a forma mais comum de a caseína se apresentar para aplicações práticas. É usado numa grande diversidade de produtos alimentares processados, como fonte de proteína e, também pelas suas propriedades físico-químicas, nutricionais e funcionais. Por seu lado, o caseinato de cálcio é também comum e utilizado, sobretudo, em preparações farmacêuticas, bem como ingrediente alimentar, funcionando como uma fonte de cálcio e proteína (Sarode et al., 2015).

A informação fornecida nos rótulos dos alimentos é essencial para prevenir a alergia à proteína láctea, nomeadamente quando o caseinato é adicionado a um alimento de modo a aumentar o conteúdo proteico (Kocabaş & Şekerel, 2003).

### 1.2.3. $\beta$ -Lactoglobulina

A proteína mais abundante no soro do leite é a  $\beta$ -LG. É uma proteína de grande interesse na indústria alimentar devido às suas propriedades nutricionais e funcionais (Kanakis et al., 2011). A  $\beta$ -LG bovina é uma proteína globular que é composta por 162 resíduos de aminoácidos e com massa molecular de 18,3 kDa (Chanphai et al., 2018). A estrutura desta proteína apresenta uma hélice- $\alpha$  e nove folhas- $\beta$  antiparalelas, de modo a formar uma estrutura “ $\beta$ -barrel”, em forma de um cálice, com um resíduo de cisteína livre e duas pontes dissulfeto (Wu et al., 2018). Quando a proteína está à temperatura ambiente e a pH neutro, encontra-se na forma de dímero que, posteriormente, se dissocia em monómeros a pH ácido (Chanphai et al., 2018). A estrutura da  $\beta$ -LG contém dois tipos de epítomos, conformacionais e lineares ou sequenciais (Rahaman et al., 2015). Segundo Sélo et al., 1999, os principais epítomos IgE da  $\beta$ -LG são Leu1-Lys8 e Tyr102-Val-124 (Sélo et al., 1999). Ainda que esta proteína seja considerada um nutriente importante dos produtos lácteos, não deixa de ser um dos principais alergénios, responsáveis pela ALV (Shek et al., 2005). Para obviar esta característica, inúmeros métodos de processamento têm sido utilizados para modificar a  $\beta$ -LG e assim diminuir a sua alergenicidade. Pode enumerar-se o aquecimento, a pressão hidrostática elevada, a hidrólise e a ligação de produtos naturais, por meio de interações não covalentes (Verhoeckx et al., 2015; Wu et al., 2018). No entanto, a utilização de alguns destes métodos pode ter efeitos adversos, como é o caso da pressão hidrostática elevada que pode aumentar a alergenicidade da  $\beta$ -LG (Meng et al., 2017).

O uso de produtos naturais na ligação não covalente a proteínas, pode ser um método de modificação da alergenicidade de proteínas potencialmente seguro e viável. De facto, foi realizado um estudo, através de métodos espectroscópicos e de docking molecular, em que se verificou que a utilização de seis flavonoides (kaempferol, miricetina, floretina, galato de epigallocatequina (EGCG), naringenina e quercetina) reduziram a antigenicidade da  $\beta$ -LG na seguinte ordem: EGCG > floretina > naringenina > miricetina > kaempferol > quercetina, com taxas de inibição antigénica de 72,6%, 68,4%, 59,7%, 52,3%, 51,4% e 40,8%, respetivamente. Estes flavonoides ligaram-se a epítomos de antigénios específicos nas folhas  $\beta$  e nas  $\beta$ -turns da  $\beta$ -LG, induzindo mudanças conformacionais distintas, que foram associadas a uma diminuição na antigenicidade desta proteína (Pu et al., 2021).

### 1.3. Métodos para redução da alergenicidade das proteínas do leite

Os alimentos, antes de serem consumidos, podem ser submetidos a uma série de etapas e condições de processamento, que podem afetar a conformação das proteínas dos alimentos, a sua digestão e, portanto, a sua alergenicidade (Rahaman et al., 2016).

No começo da história da alergia alimentar, foi mencionada a sensibilidade a peixe cozido, mas não a peixe cru, o que despertou elevado interesse em saber se o processamento afetava ou

não a alergia alimentar (Mills & Mackie, 2008). Atualmente sabe-se que o processamento pode aumentar ou reduzir o potencial alergénico das proteínas dos alimentos, ou não ter nenhum efeito ou até mesmo originar um novo composto alérgico (neolergénios) (Rahaman et al., 2016). Os diversos fatores que podem contribuir para o efeito do processamento na alergenicidade dos alimentos, têm gerado uma área de investigação muito ativa (Cabanillas & Novak, 2019).

Os alimentos podem ser processados de diversas formas, com o objetivo de melhorar as qualidades funcionais, nutricionais e sensoriais. O grau de alteração do potencial da alergenicidade dos alimentos causado pelo seu processamento depende de diferentes fatores, como por exemplo, o tipo de processamento usado, térmico ou não térmico, as condições do processamento, a duração e o ambiente como, a humidade, a temperatura e a pressão. A estrutura, o tipo de alimento e o seu conteúdo alergénico também são fatores que desempenham um papel importante nos efeitos do processamento (Cabanillas & Novak, 2019).

Os métodos de processamento de alimentos mais utilizados são o tratamento térmico, pressão hidrostática elevada, ultrassons, radiação, fermentação e hidrólise enzimática. Métodos de processamento distintos, alteram a estrutura das proteínas dos alimentos de diferentes maneiras e possíveis modificações estruturais englobam, o desdobramento, a agregação, a reticulação entre diversos componentes e modificações químicas (Lepski & Brockmeyer, 2013). Estas mudanças conformacionais provocadas pelo processamento podem afetar diretamente a alergenicidade ao interromper os epítomos conformacionais ou lineares. Os epítomos conformacionais, podem ser expostos ou ocultados pelo desdobramento ou agregação das proteínas (Rahaman et al., 2015), enquanto os lineares podem ser afetados por hidrólise ácida ou enzimática (Kasera et al., 2015). Ao nível dos epítomos e IgE, em teoria os epítomos conformacionais são mais lábeis a determinados métodos de processamento do que os epítomos lineares (Cabanillas & Novak, 2019). Foi demonstrado por diversos estudos, que o processamento de alimentos pode atuar de maneira a mascarar ou exhibir determinados epítomos de IgE dentro do mesmo alergénio. Determinadas condições do processamento têm demonstrado capacidade de expor porções da sequência de aminoácidos, que estão previamente no interior da proteína, podendo assim formar neolergénios, o que contribui para o aumento da alergenicidade de um determinado alimento (Cabanillas & Novak, 2019). Assim sendo, as modificações causadas numa determinada proteína, através de um método de processamento de alimentos podem ter um impacto positivo ou negativo na alergenicidade (Mills & Mackie, 2008).

O processamento térmico de alimentos, pode produzir diferentes modificações nas proteínas nos alimentos, incluindo desnaturação e hidrólise de ligações peptídicas, reestruturação de ligações dissulfureto e interações com outros componentes alimentares (Chizoba Ekezie et al., 2018). O desenrolamento da proteína causado pelo processamento térmico, leva à perda das suas estruturas secundária e terciária e formação de ligações covalentes e não covalentes. Estas

alterações estruturais na proteína podem mascarar, expressar ou destruir os epítomos conformacionais das proteínas, e assim influenciar a alergenicidade (Rahaman et al., 2016). No entanto, o tratamento térmico, tem algumas desvantagens, pois pode afetar as propriedades organolépticas e a composição dos nutrientes dos alimentos, como desnaturação das proteínas do ovo ou do leite e inativação enzimática devido às altas temperaturas (Dong et al., 2020). Para além disso, alguns alérgenos são estáveis ao calor pelo que o processamento térmico causa alterações limitadas na sua imunorreatividade.

As crianças com alergia ao leite necessitam de alimentação adequada com fórmulas de reposição que devem ser toleradas, de modo a promover a remissão dos sintomas e permitir um crescimento adequado (Dupont et al., 2018). Em crianças mais velhas, quando a ALV persiste, o uso de leite de vaca cozido ou aquecido é suficiente para que seja tolerado, podendo assim ajudar a aliviar o rigor da dieta de eliminação (Dupont et al., 2018). A temperatura elevada destrói amplamente os epítomos conformacionais, para os quais a IgE é direcionada, permitindo que a maioria das crianças com ALV possa tolerar produtos contendo leite extensivamente aquecido (> 170 °C) (Nowak-Wegrzyn et al., 2008).

O processamento não térmico, tem vindo a demonstrar algumas vantagens, não só na manutenção das propriedades sensoriais, como a frescura, o sabor e a cor dos alimentos, bem como na redução da imunorreatividade de alguns alimentos, como por exemplo, na soja, no amendoim e no camarão (Dong et al., 2020).

O processamento de alta pressão hidrostática, também conhecido como processamento de alta pressão, é muitas vezes usado para inativar microrganismos e também reduzir os danos nos alimentos e assim melhorar a qualidade e segurança dos produtos alimentares. Por estas razões, esta é uma técnica muito aplicada na indústria alimentar (Dong et al., 2020). O processamento de alta pressão hidrostática pode alterar a estrutura e as propriedades dos alérgenos alimentares. Esta técnica de processamento afeta apenas ligações não covalentes como, ligações de hidrogénio, interações iónicas e interações hidrofóbicas e, por isso mesmo, o impacto desta técnica nas proteínas está relacionado com a rutura deste tipo de interações na molécula de proteína (Huang et al., 2014). Este método de processamento provoca uma modificação estrutural reversível ou irreversível nas proteínas levando à sua desnaturação ou agregação e, conseqüentemente, a estrutura do sítio de ligação do epítopo do alérgeno para a IgE pode ser alterada ou destruída, levando assim à redução da alergenicidade (Huang et al., 2014). Num estudo realizado por Meng et al. (2017), utilizaram a  $\beta$ -LG isolada e aplicaram o processamento de alta pressão hidrostática a 100, 200, 300, 400 e 500 MPa. A alergenicidade da  $\beta$ -LG tratada com alta pressão hidrostática, foi avaliada por teste ELISA com anticorpos de coelho e soro de doentes alérgicos ao leite de vaca. Os resultados obtidos indicaram que a capacidade de ligação de imunoglobulina G aumentou com o aumento da pressão do tratamento, e a capacidade de ligação de IgE foi menor a 200 MPa e maior a 400 MPa. Este aumento da imunorreatividade da  $\beta$ -LG após processamento com alta pressão hidrostática pode ser

atribuído ao facto deste processamento poder ter levado ao desenrolamento da proteína e, conseqüentemente, ter exposto à superfície grupos hidrofóbicos e epítomos lineares que estavam no interior da proteína (Meng et al., 2017).

O processamento por ultrassons é uma técnica emergente na indústria alimentar amplamente utilizada em processos de homogeneização, filtração, amaciamento e desidratação (Rahaman et al., 2016). No entanto, a sua aplicação para a redução da alergenicidade alimentar ainda está no início (Nayak et al., 2017). Este método de processamento usa ondas mecânicas de alta energia que podem variar entre 20 kHz e 100 kHz (Vanga et al., 2017). Estas condições podem promover mudanças conformacionais nas proteínas alimentares e assim influenciar a sua reatividade alérgica (Shriver & Yang, 2011). Num estudo efetuado por Tammineedi et al. (2013), as proteínas do soro do leite foram submetidas a processamento por ultrassons na potência de 500 W e com frequência de 20kHz durante 10, 20 e 30 minutos, não tendo sido observadas diferenças significativas na intensidade das bandas de SDS-PAGE de  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -LG e  $\alpha$ -lactoalbumina. Tal facto pode ser atribuído à baixa intensidade e também ao curto tempo de processamento de ultrassons (Tammineedi et al., 2013). No entanto, esta técnica apresenta uma potencial aplicação para a redução da alergenicidade em alimentos como a soja, o amendoim e o marisco, o que faz com que possa vir a ser usada como uma alternativa de processamento não térmico (Dong et al., 2020).

O processamento de alimentos por radiação gama tem sido uma técnica de sucesso usada na preservação de alimentos, com pequenas alterações nas características sensoriais e nutritivas dos alimentos (Rahaman et al., 2016). Este método de processamento promove mudanças conformacionais, como a fragmentação, a agregação e modificação de aminoácidos nas proteínas alimentares e, conseqüentemente, pode alterar a sua reatividade imunológica (Luo et al., 2013). Os radicais livres, produzidos pela radiólise da água no processo de radiação das proteínas em solução, são os responsáveis pelas mudanças provocadas nas proteínas, por este método de processamento (Rahaman et al., 2016). Lee et al. (2001) realizaram um estudo sobre o efeito da dose de irradiação nas proteínas do leite de vaca e observaram que até 5 kGy, na  $\beta$ -LG isolada a reatividade da IgE aumentou, mas acima dessa dose, a  $\beta$ -LG sofreu aglomeração e mascaramento de alguns epítomos, resultando na redução da alergenicidade (Lee et al., 2001).

A fermentação é um dos métodos tradicionais de processamento e preservação de alimentos (Rahaman et al., 2016) mais comumente utilizados na indústria alimentar. Hoje em dia, os alimentos fermentados requerem grande interesse por parte do ser humano, como por exemplo, os lacticínios, as bebidas alcoólicas de vegetais fermentados, e as carnes fermentados, o que faz com que estes produtos obtenham um papel fundamental no mercado dos alimentos (Dong et al., 2020). A fermentação alimentar é um processo promovido por microrganismos que atuam quando se encontram em substratos alimentares como por exemplo, açúcares, quando em condições anaeróbias (Chizoba Ekezie et al., 2018). Neste método de processamento, o tipo de

microrganismo usado e as condições como, o pH, a temperatura e a concentração de substrato são fatores muito importantes, pois afetam significativamente os produtos finais libertados (Dong et al., 2020). Durante o processo de fermentação ocorre a hidrólise e esta provoca alterações nas proteínas alergénicas devido à destruição ou modificação dos epítomos lineares e conformacionais, resultando em alterações na alergenicidade (Chizoba Ekezie et al., 2018; Dong et al., 2020). Yao et al. (2014), realizaram um estudo no leite, sobre as alterações causadas pela fermentação com *Lactobacillus rhamnosus* GG na capacidade de ligação da IgE a quatro proteínas do leite:  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -caseína e a  $\beta$ . Os resultados obtidos demonstraram que para as quatro proteínas do leite fermentado, a capacidade de ligação da IgE foi reduzida significativamente em até 70 % quando comparado com o leite “cru”. Tal facto pode ser devido às alterações promovidas nos alergénios ou à clivagem dos epítomos das proteínas alergénicas (Yao et al., 2014).

O processamento envolvendo hidrólise enzimática tem ganho alguma atenção devido às suas características de eficiência, seletividade e ecológicas. Este método de processamento foi considerado como tendo potencial para a produção de alimentos hipoalergénicos (Y. Zhang et al., 2018). Como consequência das modificações provocadas nas estruturas das proteínas alergénicas, a hidrólise enzimática tem demonstrado uma potencial diminuição da imunorreatividade das proteínas alimentares (Dong et al., 2020). Os alergénios alimentares têm uma característica comum, que é a resistência à digestão gastrointestinal. Deste modo, a pré-hidrólise enzimática é um dos métodos mais eficientes para causar mudanças na reatividade imunológica das proteínas alimentares porque leva à quebra das estruturas das proteínas em péptidos e/ou aminoácidos (Chizoba Ekezie et al., 2018). São as condições experimentais como, o pH, a temperatura, a extensão da hidrólise e a proporção enzima-substrato, que determinam o tipo de péptidos produzidos e a antigenicidade residual (Chizoba Ekezie et al., 2018). A hidrólise enzimática tem sido comumente aplicada para a produção de alimentos de digestão fácil para bebés. Assim, por exemplo, com o objetivo de melhorar a digestibilidade do leite em pó, têm sido muito utilizadas proteases para produzir este tipo de leite, que apresenta as proteínas do leite hidrolisadas (Fleischer et al., 2016). Deste modo, o processamento por hidrólise enzimática pode ser um potencial método para a redução da imunorreatividade dos alimentos alergénicos.

Recentemente tem estado em voga uma nova abordagem, com base no uso de compostos fenólicos para a redução da capacidade alergénica de alimentos. Os compostos fenólicos possuem algumas bioatividades como, a capacidade antioxidante e também podem prevenir algumas doenças como, a diabetes, o cancro, a inflamação crónica e doenças cardiovasculares (Pessato et al., 2018). Sabe-se que os compostos fenólicos possuem uma significativa afinidade de ligação para as proteínas, o que pode resultar na formação de complexos, reversíveis ou irreversíveis (Jakobek, 2015), dependendo do tipo de interação (interação não covalente ou covalente) que ocorre entre as proteínas e os compostos fenólicos. Estas interações podem

promover alterações nas estruturas secundária e terciária das proteínas (Ozidal et al., 2013) e afetar a sua capacidade alergénica. Assim, a interação proteína-composto fenólico despertou a atenção e passou a ser investigada como uma possível estratégia para a redução da capacidade alergénica de algumas proteínas (Pessato et al., 2018). Plundrich et al. 2015 realizaram um estudo onde demonstraram que a alergenicidade da farinha de amendoim torrado diminuiu devido à formação de complexos estáveis proteína-polifenol, usando polifenóis de frutas e extratos de ervas (Plundrich et al., 2015). Num estudo realizado por Chung & Champagne (2009), foi analisado o uso de compostos fenólicos para a redução da capacidade alergénica dos extratos de amendoim, tendo sido verificado que a ligação das proteínas do amendoim por IgE tinha reduzido, como resultado da complexação entre as proteínas do amendoim e os compostos fenólicos usados (Chung & Champagne, 2009). Wu et al. (2018) realizaram um estudo onde investigaram a redução da capacidade alergénica da  $\beta$ -LG através da conjugação covalente com galato de epigallocatequina e o ácido clorogénico. Os resultados obtidos mostram que a conjugação covalente com os polifenóis provocou alterações na estrutura da  $\beta$ -LG, o que resultou numa eficaz redução da capacidade de ligação de IgE, e consequentemente, a redução da alergenicidade desta proteína. Assim este estudo demonstrou que a utilização de compostos polifenólicos pode ser um potencial método para a produção de alimentos hipoalergénicos (Wu et al., 2018).

## 1.4 Compostos fenólicos

As plantas produzem compostos fenólicos como metabolitos secundários de um mecanismo de defesa contra possíveis agentes agressores como, os predadores, os agentes patogénicos e a radiação ultravioleta (Pessato et al., 2018). Os compostos fenólicos são um grupo com uma gama muito diversificada de compostos, desde moléculas simples e com massa molecular baixa, a compostos com moléculas complexas e com massa molecular elevada. Devido à enorme diversidade das suas estruturas, os compostos fenólicos possuem propriedades diferentes, o que lhes permite efetuar distintos tipos de interações com outras moléculas. Eles podem interagir com moléculas que estão à sua volta, mas também entre si (Jakobek, 2015). Os compostos fenólicos são compostos químicos com um grupo hidroxilo ligado a um anel aromático (Ozidal et al., 2013). Existe uma grande variedade de compostos fenólicos conhecidos e identificados e presentes em frutas, vegetais, sementes (Cuyckens & Claeys, 2004; Guo et al., 2009). Podem ser classificados em dois grupos: compostos fenólicos básicos e polifenóis Figura 1 (Vermerris & Nicholson, 2006). Os polifenóis são compostos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal. Estes representam a principal fonte de antioxidantes na alimentação humana (Graf et al., 2005).

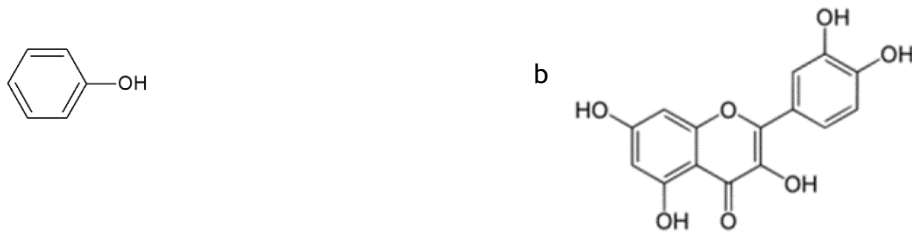


Figura 1 - Demonstração da estrutura de um composto fenólico simples a e a estrutura de um polifenol (Quercetina) b.

Para que os compostos fenólicos atinjam um alto grau de afinidade com proteínas, devem ser suficientemente pequenos para penetrar nas regiões internas das moléculas de proteínas, mas suficientemente grandes para ligar-se às cadeias peptídicas em mais de um ponto (Mulaudzi et al., 2012). Os compostos fenólicos apresentam propriedades funcionais, como atividade antioxidante, anti mutagénica, anti-inflamatória e anti tumoral (González-Sarrías et al., 2012; Nahar et al., 2014; Ortega et al., 2008; Tanaka et al., 1993; Živković et al., 2014). Muitos compostos fenólicos desempenham papéis importantes na prevenção de certas doenças humanas, como a osteoporose, o cancro e as doenças cardiovasculares (Kaume et al., 2014; Morton et al., 2000; Oliveras-López et al., 2014).

### 1.4.1. Interações entre as proteínas e os compostos fenólicos

As interações dos compostos fenólicos com proteínas podem provocar alterações nas propriedades físico-químicas das proteínas, tal como a solubilidade, a estabilidade térmica e a digestibilidade (Labuckas et al., 2008; Rawel et al., 2001). Assim, diferentes tipos de compostos fenólicos afetam, de diferentes modos, as proteínas através das suas interações, de acordo com a eventual variação do peso molecular. Os compostos fenólicos podem interagir com as proteínas e conseqüentemente formar complexos solúveis ou insolúveis com atributos físico-químicos modificados de ambas as moléculas (Q. Zhang et al., 2021). Eles são divididos em várias classes, ou seja, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, estilbenos e lignanas Figura 2, que são distribuídos em plantas e alimentos de origem vegetal (El Gharras, 2009). A classe dos flavonoides pode ainda ser dividida em flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianidinas e flavanóis Figura 2 (Ozidal et al., 2013). A afinidade que se estabelece entre os polifenóis e as proteínas varia com o seu tamanho molecular. Damos como exemplo, os polifenóis maiores, como os presentes no chá preto, que apresentam maior facilidade em se ligar às proteínas do leite (Dubeau et al., 2010).

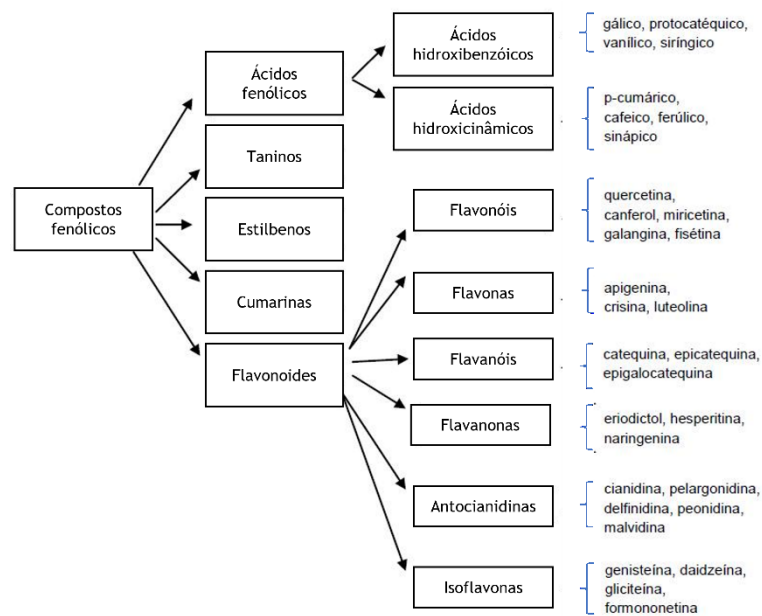


Figura 2 - Compostos fenólicos e as suas subclasses (Rasteiro, 2012).

Os polifenóis Figura 3, do ponto de vista químico, são uma classe estrutural de compostos orgânicos, naturais, semissintéticos ou sintéticos, sendo estes caracterizados pela presença de múltiplas frações fenólicas (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018).

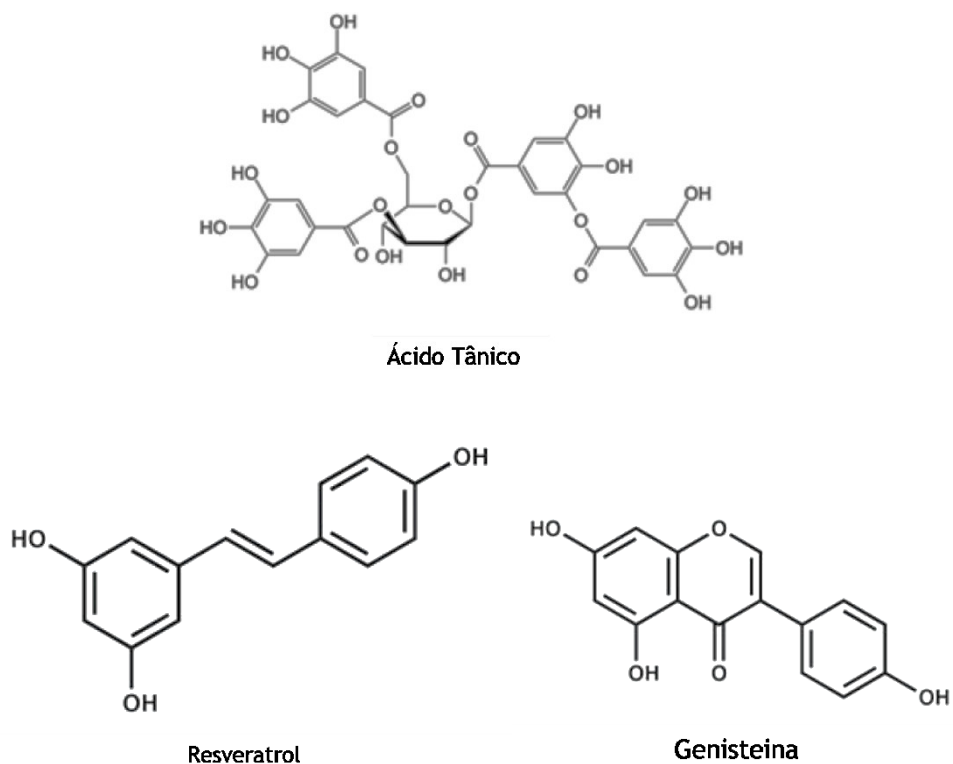


Figura 3 - Exemplos de Polifenóis.

Os ácidos fenólicos Figura 4, são compostos fenólicos importantes, mas não são considerados polifenóis. Os ácidos fenólicos são caracterizados por estruturas do tipo  $C_6$  a  $C_1$  ou  $C_6$  a  $C_3$ , como por exemplo o ácido gálico, o ácido cafeico e o ácido ferúlico (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018).

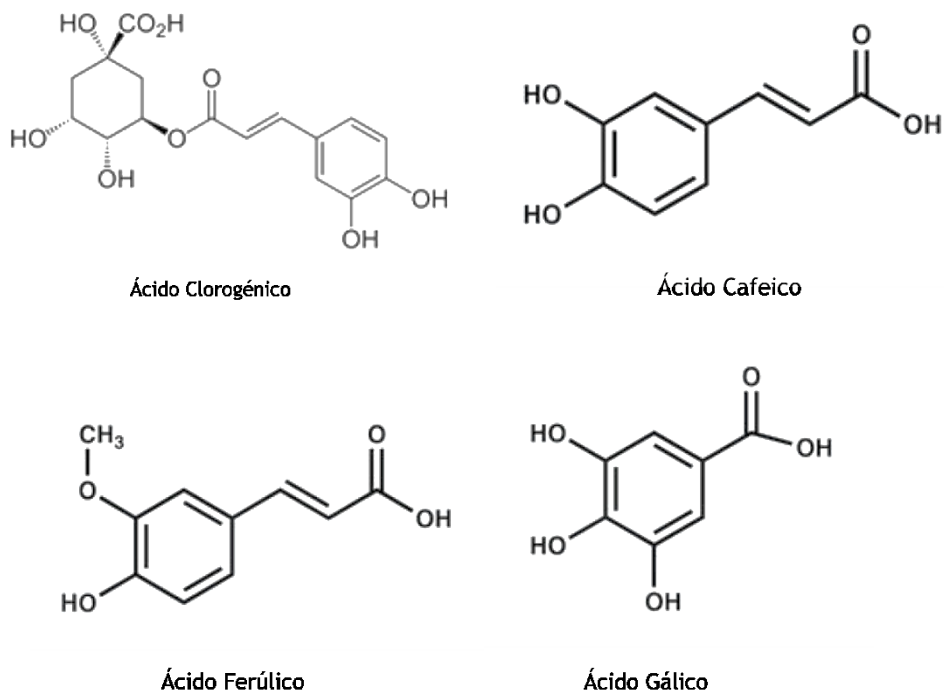


Figura 4 - Exemplos de Ácidos Fenólicos.

Os flavonoides Figura 5 são polifenóis, com estrutura do tipo  $C_6-C_3-C_6$  em que as duas estruturas  $C_6$  são de natureza fenólica. Devido ao padrão de hidroxilação e às possíveis variações da estrutura  $C_3$ , os flavonoides podem ser divididos em várias classes (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018).

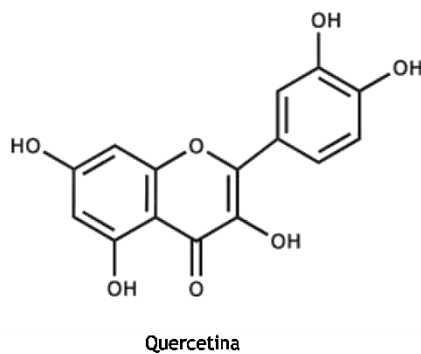


Figura 5 - Exemplo de Flavonoides.

É sabido que as interações entre os compostos fenólicos e as proteínas, afetam a estrutura das proteínas, a capacidade antioxidante, o conteúdo de polifenóis livres e a biodisponibilidade de compostos fenólicos nos alimentos (Chu et al., 2018). As alterações provocadas na estrutura da proteína, devido a estas interações, podem alterar as estruturas terciária e secundária das proteínas e levar à formação de agregados complexos dependendo da natureza e do tamanho da proteína (Poklar Ulrih, 2017). As interações dos compostos fenólicos com as proteínas, podem ocorrer de duas formas diferentes: por interações não covalentes ou interações covalentes. A interação dos compostos fenólicos com as proteínas, que ocorre por interação não covalente, é uma interação reversível, enquanto a interação covalente é uma interação irreversível (Ozidal et al., 2013). O tipo de proteína, a temperatura, a concentração da proteína, o pH, o tipo e estrutura de composto fenólico, a adição de determinados reagentes e a concentração de sal, são fatores que afetam as interações composto fenólico-proteína (Ozidal et al., 2013). De entre estes fatores, podem destacar-se dois como principais: a estrutura do composto fenólico e o tipo de proteína (Czubinski & Dwiecki, 2017).

As interações não covalentes (reversíveis) podem ser classificadas em quatro tipos: as pontes de hidrogénio, as interações hidrofóbicas, as forças de Van der Waals e as interações eletrostáticas (Buitimea-Cantúa et al., 2018). A ponte de hidrogénio (Figura 6) é a interação de um átomo de hidrogénio ligado covalentemente a um átomo eletronegativo (O,N ou S), com outro átomo eletronegativo (Ozidal et al., 2013; Q. Zhang et al., 2021);

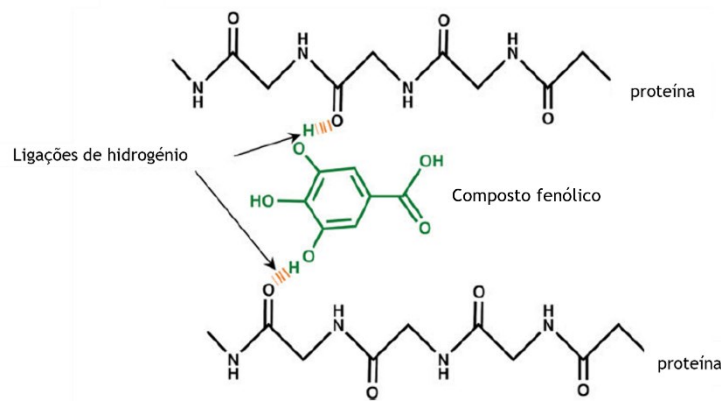


Figura 6 - Interação por ponte de Hidrogénio entre proteína e ácido gálico. Adaptada de, (Le Bourvellec & Renard, 2012; Quan et al., 2019; Q. Zhang et al., 2021).

Também podem ocorrer interações hidrofóbicas Figura 7 maioritariamente induzidas pelas associações entre o anel aromático apolar dos compostos fenólicos e as zonas hidrofóbicas das proteínas (Q. Zhang et al., 2021).

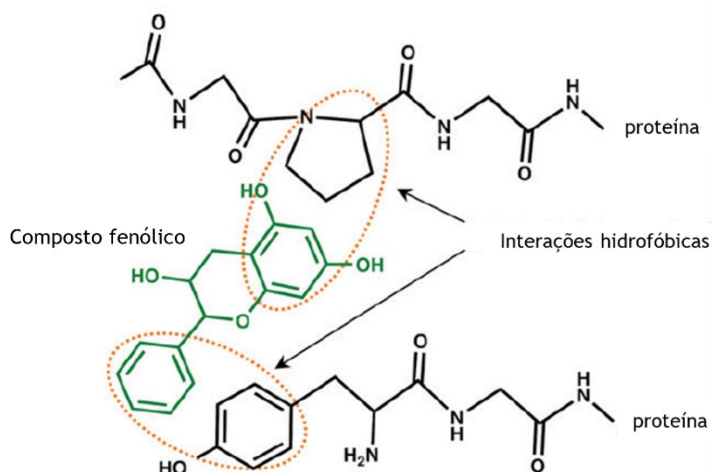


Figura 7 - Interação não covalente entre proteína e compostos fenólico, por meio de interação hidrofóbica. Adaptado, de (Le Bourvellec & Renard, 2012; Quan et al., 2019; Q. Zhang et al., 2021).

As forças de Van der Waals são interações entre os átomos que são afetados pelos solventes circundantes (Chu et al., 2018). Estas forças são mais fracas do que as ligações covalentes e podem ser divididas em três tipos; dipolo permanente-dipolo permanente, dipolo permanente-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido. Estas interações são responsáveis pela atração entre moléculas, mas a uma determinada distância inferior, leva ao aumento da repulsão, o que faz com que possa evitar a degradação das moléculas (Lima, 2014; Ozdal et al., 2013). As interações eletrostáticas estabelecem-se entre os grupos carregados na superfície da proteína e os grupos hidroxila dos compostos fenólicos. Estas interações sucedem entre a mesma carga (interações de repulsão) e cargas opostas (interação de atração) (Chu et al., 2018). De forma geral, o complexo composto fenólico-proteína formado por interações não covalentes, advém de um efeito combinado de algumas destas interações que foram referidas anteriormente, onde as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogénio são as principais forças motrizes (Q. Zhang et al., 2021). Jia et al., 2017, estudaram o mecanismo de interação da  $\beta$ -LG com o ácido clorogénico (ACL), o ácido ferúlico (AF) e o galato de epigallocatequina (EGCG). Os resultados demonstraram que as interações hidrofóbicas foram as principais forças para interação da  $\beta$ -LG com o EGCG, enquanto as ligações de hidrogénio e as forças de Van der Waals foram as principais forças na ligação da  $\beta$ -LG com o ACL e o AF (Jia et al., 2017).

As interações irreversíveis que ocorrem entre os compostos fenólicos e as proteínas, resultam da formação de ligações covalentes entre as duas moléculas (Q. Zhang et al., 2021) afetando as propriedades destas moléculas de forma irreversível, obtendo-se assim os produtos desejados ou melhorando as propriedades funcionais das proteínas (Chu et al., 2018). Sob condições básicas, as interações covalentes entre proteína e polifenóis são rapidamente formadas (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018). As ligações covalentes podem ser obtidas por procedimentos enzimáticos e não enzimáticos (Le Bourvellec & Renard, 2012). A formação de uma interação covalente entre um composto fenólico e uma proteína, por via não enzimática,

é realizada em condições alcalinas e na presença de oxigénio, em que os compostos fenólicos podem ser facilmente oxidados e formar semiquinonas ou quinonas. Estes intermediários são muito reativos e podem reagir com aminoácidos nucleofílicos como a lisina (Lys), a metionina (Met), a cisteína (Cys) e o triptofano (Trp) da proteína, permitindo a formação de ligações covalentes C-N ou C-S com os compostos fenólicos (Q. Zhang et al., 2021). Por outro lado, para o estabelecimento de uma interação covalente enzimática, é necessário a presença de uma enzima polifenol oxidase, como por exemplo a lacase e a tirosinase que são as mais utilizadas. Também neste método os compostos fenólicos são primeiramente oxidados a semiquinonas ou quinonas que podem ser atacados pelas cadeias laterais nucleofílicas para formar ligações covalentes, C-N ou C-S, entre as moléculas composto fenólico - proteína (Q. Zhang et al., 2021). Os compostos fenólicos são oxidados muito facilmente, devido aos seus grupos hidroxilo que são altamente reativos (Chu et al., 2018).

#### **1.4.2. Alterações na estrutura das proteínas do leite por interação com compostos fenólicos**

Como referido anteriormente, a interação dos compostos fenólicos com as proteínas pode causar modificações na estrutura das proteínas e assim alterar a sua alergenicidade (Ozdal et al., 2013; Pessato et al., 2018). Foram realizados alguns estudos que demonstram que esta interação pode provocar alterações na estrutura secundária e terciária das proteínas, com o intuito de este método poder ser usado para a produção de alimentos hipoalergénicos. Assim, Pessato et al., 2018, estudaram a interação das proteínas do soro do leite com compostos fenólicos do chá e do café, como uma possível estratégia para a redução da capacidade alergénica das proteínas do leite. Os dois compostos fenólicos utilizados neste estudo foram o AC e o EGCG. Os resultados demonstraram que as interações das proteínas do soro do leite com o AC ou com o EGCG, promoveram alterações na sua estrutura secundária e terciária das proteínas, sendo que o AC apresentou maior afinidade de ligação para as proteínas do que o EGCG, enquanto este mostrou maior eficácia na redução da alergenicidade da  $\beta$ -LG e da albumina sérica bovina. Assim, a complexação com o EGCG, pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de produtos lácteos hipoalergénicos (Pessato et al., 2018).

Num outro estudo realizado por Wu et al., 2018, investigou-se a redução da capacidade alergénica da  $\beta$ -LG e a melhoria das suas propriedades funcionais, através da conjugação covalente com o ACL e o EGCG. Estes dois polifenóis interagiram com a  $\beta$ -LG, por meio de ligações covalentes, promovendo modificações estruturais na proteína. Os resultados demonstraram que a conjugação da  $\beta$ -LG com o ACL e o EGCG foi eficaz na redução da capacidade de ligação de IgE. No entanto, o EGCG demonstrou ser mais eficaz que o ACL na

formação dos conjugados polifenol- $\beta$ -LG. Este estudo conseguiu assim, através deste método, reduzir a capacidade alergénica da  $\beta$ -LG (Wu et al., 2018).

Pu et al., 2021, estudaram o mecanismo de redução da antigenicidade da  $\beta$ -LG por seis flavonoides, por meio de interações não covalentes. Os resultados demonstraram que todos os flavonoides reduziram a antigenicidade da  $\beta$ -LG na seguinte ordem: EGCG > floretina > naringenina > miricetina > kaempferol > quercetina. A interação destes flavonoides com a  $\beta$ -LG, provocou modificações na estrutura da proteína, que foram associadas a uma redução na antigenicidade da proteína. Este estudo pode ser uma mais-valia para o desenvolvimento de produtos hipoalergénicos que contenham a  $\beta$ -LG, uma vez que elucida o mecanismo de ligação destes seis flavonoides com esta proteína e o mecanismo de inibição da sua antigenicidade (Pu et al., 2021).

## 1.5. Técnicas espectroscópicas

As proteínas têm um papel muito importante nos processos celulares. A sua função depende da sua estrutura, tornando assim o conhecimento da estrutura da proteína imperativo para a compreensão das suas funções celulares. Vários métodos para determinar a estrutura terciária ou secundária das proteínas podem ser utilizados (Yogesh et al., 2020). Por exemplo, técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raios-X e criomicroscopia eletrônica são aplicadas regularmente para determinar a estrutura tridimensional das proteínas. A análise da estrutura terciária pode ser realizada por espectroscopia de fluorescência, enquanto as estruturas secundárias podem ser analisadas usando técnicas como espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

### 1.5.1 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência fundamenta-se num processo de emissão de fluorescência, devido a uma transição do estado excitado para o estado fundamental, distinto do verificado na espectroscopia de absorção no UV-Visível. Como técnica analítica tem aplicação nas áreas alimentar e farmacêutica (Kaur et al., 2018).

A extinção (*quenching*) da fluorescência é uma via importante para estudar a interação entre proteínas e os compostos fenólicos em geral. Os resíduos de Phe, Trp e Tyr (principalmente o Trp) emitem fluorescência após excitação (G. Zhang et al., 2008; Zhu et al., 2017). O Trp apresenta o maior rendimento de fluorescência e domina a fluorescência intrínseca se a proteína for excitada a 295 nm (Akbar et al., 2016; Maity et al., 2016);. O espectro de emissão de Trp reflete o ambiente em que os resíduos de Trp se encontram na proteína. Deste modo, o espectro de emissão é alterado por transições conformacionais, associação de subunidades ou ligação a outras moléculas, além das interações com outros resíduos intramoleculares ou moléculas de solvente (Han et al., 2012; Kanakis et al., 2011).

A intensidade de fluorescência da proteína pode diminuir em resultado de uma variedade de interação de moléculas, que é chamada extinção por fluorescência (H. Zhang et al., 2014). A extinção de fluorescência é a diminuição do rendimento quântico da fluorescência de um fluoróforo induzida por uma variedade de interações moleculares com moléculas inibidoras (Kanakis et al., 2011; G. Zhang et al., 2008). A extinção da fluorescência pode resultar de vários processos, como a colisão molecular, a formação de complexos no estado fundamental, a reação no estado excitado, o rearranjo molecular ou a transferência de energia. Os mecanismos desses processos são geralmente classificados como extinção dinâmica ou estática. A extinção de fluorescência estática ocorre devido à formação de um complexo entre o fluoróforo e o inibidor, enquanto a extinção dinâmica resulta da colisão entre o fluoróforo e o inibidor (Daneshgar et al., 2009).

Para elucidar o mecanismo de extinção induzido por compostos fenólicos, os dados de extinção por fluorescência são analisados através da equação de Stern-Volmer (1) (Zhan et al., 2020).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \times [Q] \quad (1)$$

Em que  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência antes e após a adição do supressor, respectivamente;  $K_{sv}$  é a constante de extinção, cujo valor é calculado diretamente a partir a eficiência da extinção e  $[Q]$  é a concentração do supressor de fluorescência (Zhan et al., 2020).

Como a distinção entre os dois tipos de mecanismos de extinção de fluorescência é difícil, uma vez que uma representação gráfica de Stern-Volmer não é suficiente para a determinação do mecanismo de extinção, este é ainda confirmado pelo valor de  $k_q$ , considerando a equação (2) (Daneshgar et al., 2009).

$$Kq = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (2)$$

Onde  $k_q$  é a constante de velocidade de extinção da fluorescência da biomolécula;  $\tau_0$  é a duração da fluorescência da biomolécula na ausência de supressor, em que o valor geralmente usado é de  $10^{-8}$  s (Wei et al., 2018; Zhan et al., 2020). Um valor de  $k_q$  superior a  $2,0 \times 10^{10} \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$  significa que o mecanismo de extinção de fluorescência, é um mecanismo estático (Lu et al., 2009; Wei et al., 2018; Xie et al., 2017).

## 1.5.2 Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica espectroscópica muito utilizada para o estudo da estrutura secundária de proteínas, embora também possa ser usado para estudar a conformação de peptídeos e ácidos nucleicos, sob várias condições experimentais, como por exemplo, diferente temperatura, força iônica ou na presença de solutos ou moléculas pequenas. Esta técnica não é destrutiva, é relativamente fácil e rápida de executar e requer uma pequena quantidade de amostra (Corrêa & Ramos, 2009).

O DC usa uma fonte de luz polarizada circularmente, na qual o vetor oscila de modo rotatório para a direita ou para a esquerda, formando uma hélice em torno do eixo de propagação da luz. Para comparar, quando a luz é despolarizada, o vetor eletromagnético oscila em qualquer direção perpendicular à direção da propagação. E quando a luz é linearmente polarizada num plano, o vetor oscila num único plano na direção da propagação (Corrêa & Ramos, 2009).

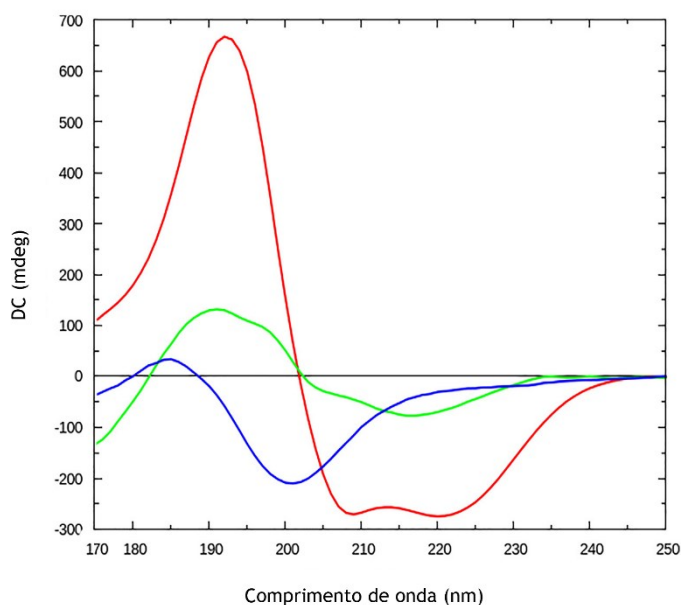


Figura 8 - Representação de espectros de CD para três tipos de estruturas secundárias. Hélice- $\alpha$  (linha vermelha), folhas- $\beta$  (linha verde) e enrolamento aleatório (linha azul).

O DC investiga a estrutura secundária das proteínas, porque a ligação peptídica é assimétrica e as moléculas, sem um plano de simetria, apresentam o fenômeno do dicroísmo circular. A transição  $n \rightarrow \pi^*$  é eletricamente impedida, mas é magneticamente permitida, sendo a principal responsável pelas bandas negativas no espectro a 222 nm, característica de hélice- $\alpha$ , e 216 - 218 nm, característica de folhas- $\beta$ . A transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  é a principal responsável pela banda positiva, aproximadamente, a 190 nm e a banda negativa a 208 nm, característica das hélice- $\alpha$ , e pela banda positiva, aproximadamente, a 198 nm, característica de folhas- $\beta$  (Woody & Koslowski, 2002). Uma banda negativa em torno dos 200 nm é característica de um enrolamento aleatório, para uma proteína sem estrutura secundária dominante (Rogers et al., 2019).

Num espectro DC típico, a ausência de sinal significa ausência de dicroísmo circular, um sinal negativo significa absorção da luz polarizada circularmente pela esquerda e um sinal positivo significa absorção de luz polarizada circularmente pela direita. Os espectros para proteínas com folhas- $\beta$  são mais diversificados do que os das proteínas com hélices- $\alpha$ , porque as folhas- $\beta$  podem estar presentes em conformações paralelas, antiparalelas ou mistas. Já o espectro de uma proteína desordenada, (enrolamento ao acaso) tem uma banda negativa de grande magnitude à volta de 200 nm (Corrêa & Ramos, 2009).

Nas proteínas, os cromóforos de interesse incluem a ligação peptídica (absorção abaixo de 240 nm), cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (absorção na faixa de 260 a 320 nm) e ligações dissulfureto (bandas de absorção largas fracas centradas à volta de 260 nm). Além disso, cofatores não proteicos podem absorver numa ampla faixa espectral (Kelly et al., 2005). Uma vantagem da técnica de DC nos estudos de proteínas é que informações estruturais complementares podem ser obtidas apenas a partir de uma única região espectral.

## 1.6 Objetivos do estudo

As caseínas são das principais proteínas responsáveis pela ALV, e como o Cas é a forma mais comum da sua utilização em alimentos processados, é relevante o estudo da interação do Cas com alguns compostos fenólicos.

O objetivo principal deste trabalho foi determinar se a interação dos seis compostos fenólicos em estudo, ácido gálico (AG), ácido cafeico (AC), ácido ferúlico (AF), ácido clorogénico (ACL), quercetina (QR) e ácido tânico (AT), com o Cas promoveram alterações na estrutura secundária e terciária deste produto proteico. Para isso, foi utilizada a espectroscopia de fluorescência e DC.

Como a  $\beta$ -LG é também uma proteína alergénica, pretendeu-se igualmente verificar, através de um estudo de *docking* molecular, se esta interage de modo termodinamicamente favorável com a QR e o AT.

## Capítulo 2 - Materiais e métodos

### 2.1 Materiais

O Caseinato de sódio, o ácido gálico ( $\geq 98\%$ ), o ácido cafeico (98%), o ácido ferúlico (99%), o ácido clorogénico (95%), a quercetina (95%) e o ácido tânico (95%) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Nos ensaios foi ainda utilizada água bidestilada MiliQ.

Para as experiências, as soluções de Cas e dos compostos fenólicos foram dissolvidas em tampão fosfato 0,05M ( $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$ ) que foram obtidos na Sigma-Aldrich e pH de 7,4.

### 2.2 Fluorescência

Todos os espectros de fluorescência de soluções puras de Cas em tampão fosfato (0,05 M), pH 7,40, bem como as soluções de compostos fenólicos no mesmo tampão e as soluções de mistura de caseinato de sódio com os compostos fenólicos, foram efetuados num espectrofluorímetro FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon - Edison, NJ USA). As experiências foram realizadas numa “cuvette” de quartzo e os espectros de emissão de fluorescência foram registados numa gama de comprimento de onda de 295-450 nm, após excitação a 280 nm. A largura das bandas de emissão e excitação usadas foram ambas de 3 nm.

A concentração do Cas foi mantida constante a 5  $\mu$ M, enquanto a concentração dos compostos fenólicos variou. Para cada análise, o volume total de solução na “cuvette” foi de 1,75 mL.

Os espectros de fluorescência foram corrigidos do sinal de tampão, sendo que os espectros dos compostos fenólicos nas suas concentrações correspondentes foram subtraídos aos espectros da mistura do Cas com o composto fenólico.

As soluções foram preparadas com tampão fosfato (0,05M) pH de 7,40, à temperatura de 25°C, com o objetivo de verificar o efeito de extinção de fluorescência, devido à interação do Cas com os compostos fenólicos (AC, AG, AF, ACL, QR e AT) e, conseqüentemente, analisar a existência de alterações na estrutura terciária do Cas. As soluções foram todas incubadas a 37°C, durante 10 minutos, sendo que as leituras dos espectros de fluorescência foram efetuadas aos 0 minutos e ao final do tempo, aos 10 minutos. A temperatura foi controlada num banho termostático NesL ABRTE7.

Os espectros, foram realizados em triplicado e os resultados expressos como médias. Os dados dos espectros de fluorescência foram transferidos do software OriginPro 2016 (<https://www.originlab.com/2016>) para o Microsoft Excel, onde foram realizados os cálculos necessários, bem como a construção de figuras e tabelas.

## 2.3 Dicroísmo Circular

Os espectros de DC do Cas, as soluções de compostos fenólicos e as soluções de Cas e composto fenólico, foram registados com um espectropolarímetro Jasco J-815 (JASCO Corporation, Tóquio, Japão) e visualizados através do programa OriginPro 2016 <https://www.originlab.com/2016>. Para as medições na região do UV-extremo (comprimento de onda de 190 a 260 nm) foi utilizada uma célula de quartzo com comprimento de trajeto de 0,1 cm, sob atmosfera de azoto (1bar). A concentração da proteína foi mantida constante (5  $\mu\text{M}$ ), enquanto se variou a concentração dos compostos fenólicos. Todas as soluções foram preparadas utilizando tampão fosfato (0,05 M) e pH 7,40. Foi realizado um conjunto de 3 varrimentos com velocidade de 50 nm por minuto e os dados foram recolhidos, para cada nanómetro, num intervalo de 260 a 190 nm. As amostras foram incubadas durante 10 minutos, a 37°C, utilizando-se um banho de água LAUDA RE-104 circulado a envolver a cuvette de quartzo. Os espectros obtidos foram corrigidos dos espectros do tampão e dos compostos fenólicos. Assim, para cada concentração usada nas misturas composto fenólico-caseinato de sódio, foram subtraídos os espectros de tampão e composto fenólico respetivos. Todas as experiências foram realizadas em triplicado e os dados expressos como média. A estrutura secundária da proteína foi calculada através do software Dichroweb, usando o programa CDSSTR, (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).

# Capítulo 3 - Resultados e discussão

## 3.1 Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica poderosa que tem sido muito utilizada para investigar a função molecular e a estrutura terciária das proteínas (Wang et al., 2017). Esta técnica é também uma das abordagens mais convenientes para efetuar estudos sobre a interação entre ligandos e proteínas (Zhu et al., 2017). As proteínas contêm três aminoácidos aromáticos: tirosina; fenilalanina e triptofano (Zhu et al., 2017). Estes aminoácidos são fluoróforos naturais e são os responsáveis pela fluorescência intrínseca das proteínas (Wang et al., 2017). Na realidade, em muitas proteínas o triptofano é o grande responsável pela sua emissão de fluorescência intrínseca, (G. Zhang et al., 2008) uma vez que é o aminoácido que apresenta maior rendimento quântico e coeficiente de extinção molar. Por outro lado, a fenilalanina apresenta um rendimento quântico muito baixo (G. Zhang et al., 2008). A fluorescência de um resíduo de tirosina é quase extinta, quando esta é ionizada perto de um grupo amina, um grupo carboxilo ou um triptofano. Assim, o estudo das interações do Cas com os seis compostos fenólicos (AC, AG, AF, ACL, QR e AT) foi realizado utilizando a técnica de extinção de fluorescência. A interação do Cas com os diferentes compostos fenólicos, a pH fisiológico (7,40), foi analisada pela medição de intensidade de fluorescência do Cas. Para um comprimento de onda de excitação de 280 nm, o comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência ( $\lambda_{max}$ ) da solução de Cas foi de 348 nm.

Os espectros de fluorescência do Cas, na presença e na ausência de compostos fenólicos, são apresentados nas Figuras 9 a 14.

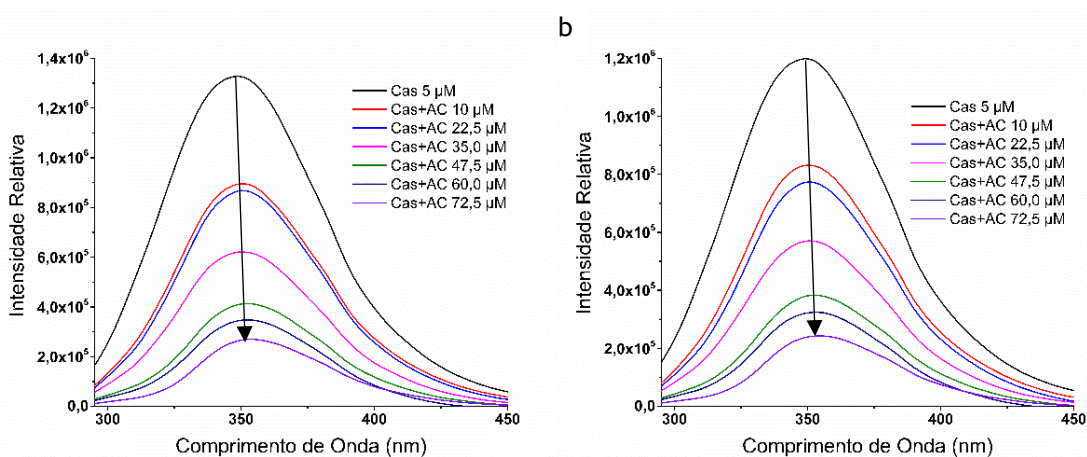


Figura 9 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5 µM na presença de diferentes concentrações de ácido cafeico (AC), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.

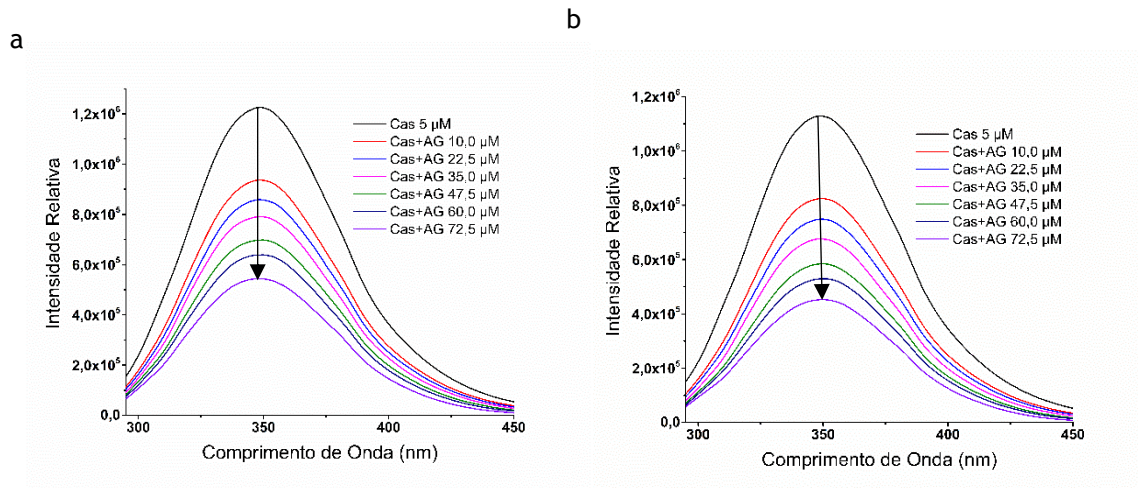


Figura 10 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5  $\mu\text{M}$  na presença de diferentes concentrações de ácido gálico (AG), a tempo; b 10 minutos, à temperatura de 37°C.

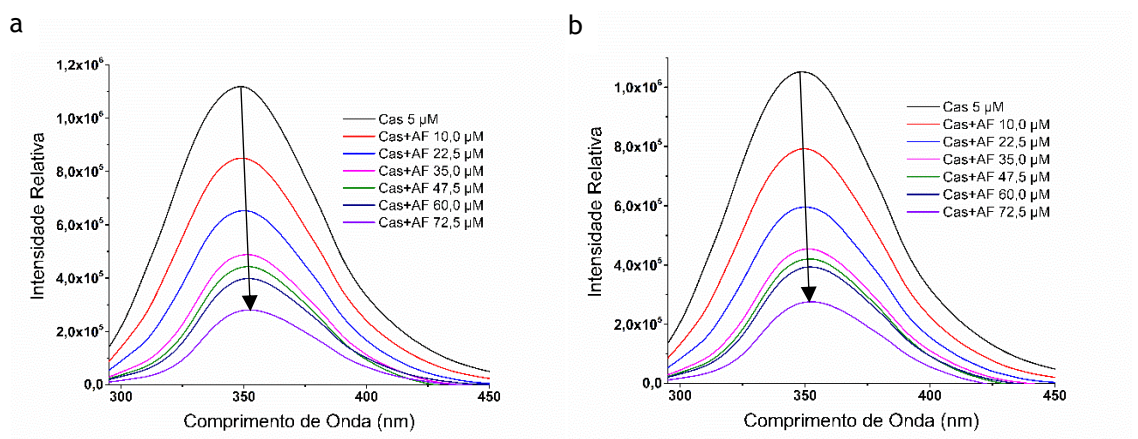


Figura 11 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5  $\mu\text{M}$  na presença de diferentes concentrações de ácido ferúlico (AF), a tempo 0; b 10 minutos, à temperatura de 37°C.

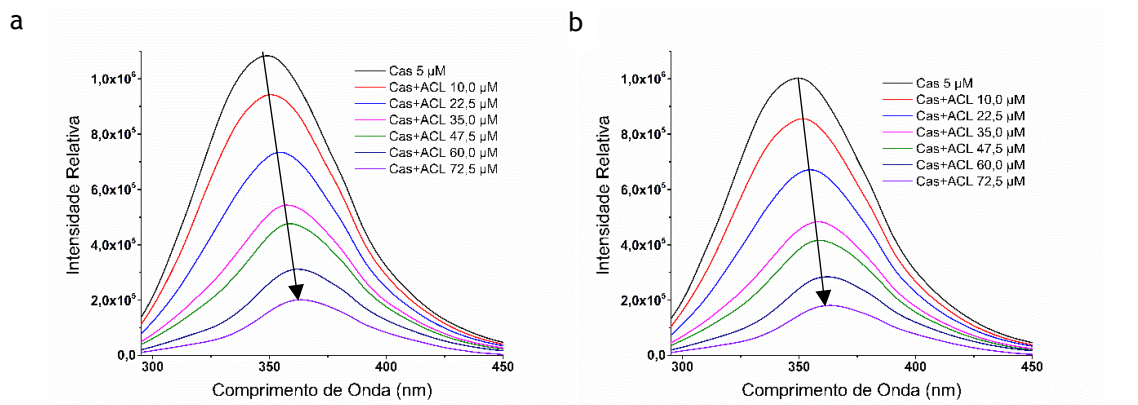


Figura 12 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5  $\mu\text{M}$  na presença de diferentes concentrações de ácido clorogénico (ACL), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.

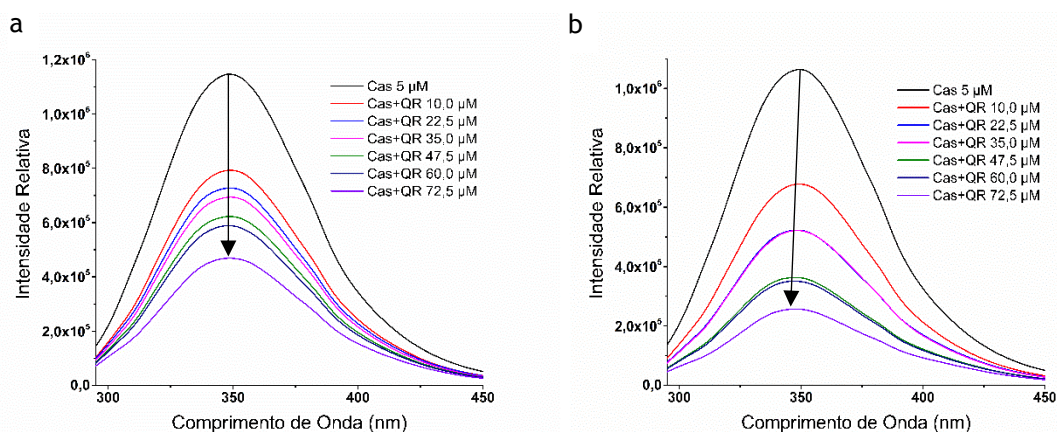


Figura 13 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5  $\mu\text{M}$  na presença de diferentes concentrações de quercetina (QR), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.

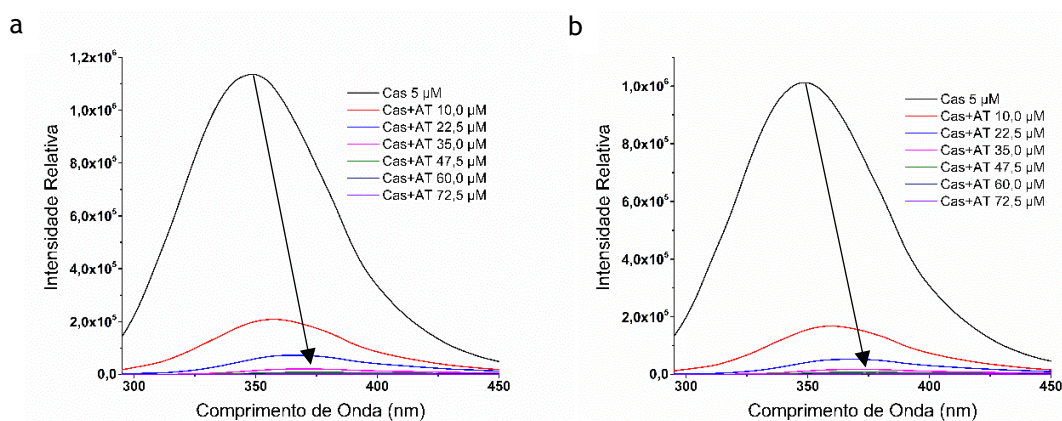


Figura 14 - Espectro de Fluorescência de caseinato de sódio 5  $\mu\text{M}$  na presença de diferentes concentrações de ácido tânico (AT), a tempo 0; b tempo 10 minutos, à temperatura de 37°C.

Para todos os compostos fenólicos testados, a intensidade de fluorescência do Cas diminuiu, com o aumento da concentração dos compostos fenólicos, isto é, houve a extinção da fluorescência do Cas (Figura 9 a Figura 14). Isto foi observado nas experiências, logo após a primeira adição do composto fenólico, para a temperatura de 37°C, ao tempo 0 e ao fim de 10 minutos. Em alguns dos espectros dos compostos fenólicos registou-se um desvio do  $\lambda_{\text{max}}$ , em ambos os tempos da experiência, como se pode observar nos espectros: ACL (Figura 12), AT (Figura 14) e QR (Figura 13), sendo o desvio mais notório no espectro ACL, enquanto que no espectro de AC (Figura 9), AG (Figura 10) e AF (Figura 11), não se observa desvio significativo de  $\lambda_{\text{max}}$ , o que significa que nos espectros de AC, AG e AF não houve mudança do microambiente dos resíduos de triptofano (Wei et al., 2018). Os espectros de Cas com ACL apresentam um desvio acentuado de  $\lambda_{\text{max}}$  para o vermelho. No tempo 0, o desvio foi de 13 nm (350 - 363 nm) e no tempo 10 minutos o desvio observado foi de 14 nm (349 - 363 nm), o que significa que o microambiente próximo aos resíduos de Trp e de Tyr foi alterado e a hidrofobicidade diminuiu

(Wei et al., 2018) o que, conseqüentemente, pode levar à perda da estrutura terciária ou quaternária da proteína (Wang et al., 2017). Por sua vez, os espectros de Cas e QR apresentam um desvio para o azul, sendo o mais acentuado no espectro ao fim de 10 minutos, indicando que a polaridade da cavidade de ligação próxima ao triptofano foi diminuída e a estrutura secundária foi alterada (Wei et al., 2018). O facto de nos espectros do Cas com o ACL o desvio para o vermelho ser tão elevado, 13 nm e 14 nm, respetivamente para 0 e 10 minutos, sugere que o ambiente em torno dos resíduos de Trp foi afetado mais severamente pela ligação com o ACL do que com os outros compostos fenólicos. O aumento no valor do desvio também pode resultar do sítio de ligação do ACL ao Cas poder situar-se muito próximo dos resíduos de Trp (Xie et al., 2017).

No espectro de AT (Figura 14), pode observar-se uma diminuição brusca da intensidade da fluorescência com o aumento da concentração do composto fenólico, sendo bem visíveis apenas quatro curvas, que correspondem às quatro primeiras concentrações. Isto pode acontecer uma vez que o AT é uma molécula maior, quando comparada com os restantes compostos fenólicos estudados, pelo que quando o AT interage com a superfície da proteína, este cobre uma superfície mais extensa promovendo mais facilmente a extinção da fluorescência dos fluoróforos da proteína.

Assim, os resultados indicam que este conjunto de compostos fenólicos (AC, AG, ACL, AF, QR e AT), extinguem a fluorescência intrínseca do caseinato como resultado de interações moleculares (Zhu et al., 2017).

De modo a elucidar o tipo de mecanismo de extinção de fluorescência, foram utilizadas as equações (1) e (2). Deste modo, os valores de  $K_{sv}$  foram obtidos a partir da regressão de  $F_0/F$  versus  $[Q]$ , equação 1, e  $K_q$  a partir da equação 2. Os resultados são apresentados na Tabela 1, simultaneamente com a constante de ligação ( $K_b$ ) que foi calculada através da equação de Lineweaver-Burk, que será discutida em 3.1.1. As representações gráficas ( $F_0/F$  versus  $[Q]$ ) para cada composto fenólico, estão apresentadas no Anexo A.

Tabela 1 - Constante de extinção ( $K_{sv}$ ), constante de velocidade de extinção biomolecular ( $K_q$ ) e constante de ligação ( $K_b$ ) entre o Cas e os compostos fenólicos nos tempos 0 e 10 min, à temperatura de 37°C.

	Tempo 0			Tempo 10		
	$K_{sv} (M^{-1})$ $\times 10^4$	$K_q (M^{-1}s^{-1})$ $\times 10^{12}$	$K_b (M^{-1})$ $\times 10^4$	$K_{sv} (M^{-1})$ $\times 10^4$	$K_q (M^{-1}s^{-1})$ $\times 10^{12}$	$K_b (M^{-1})$ $\times 10^4$
Ácido cafeico	5,73	5,74	4,65	5,65	5,65	4,22
Ácido Gálico	1,45	1,46	3,77	1,76	1,76	4,50
Ácido Ferúlico	3,84	3,85	3,10	3,50	3,50	3,26
Ácido Clorogénico	6,25	6,26	1,34	6,47	6,47	1,51
Quercetina	1,43	1,44	6,49	3,80	3,81	6,42
Ácido Tânico	700	700	37,2	700	700	42,7

De acordo com as representações gráficas da equação de Stern-Volmer (Anexo A), observa-se que todas são lineares embora, em alguns casos, se verifique um encurvamento da reta. Geralmente, um gráfico de Stern-Volmer linear representa um só mecanismo de extinção de fluorescência (Xie et al., 2017). Contudo, esta explicação não é suficiente para definir o tipo de mecanismo de extinção.

No entanto, para um mecanismo de extinção dinâmico de fluorescência, a  $K_q$  por colisão de vários supressores com um biopolímero, é de  $2,0 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$  (Xie et al., 2017). A constante  $K_q$  foi calculada pela Equação (2), e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Com base nos valores obtidos, verifica-se que para todos os compostos fenólicos testados, em ambos os tempos, os valores de  $K_q$  são superiores a  $2,0 \times 10^{10} (M^{-1} s^{-1})$ , sugerindo que o mecanismo de extinção de fluorescência estático, foi o que ocorreu maioritariamente. Sendo assim, a extinção de fluorescência entre o Cas e este conjunto de compostos fenólicos, ocorreu principalmente pela formação de um complexo entre o fluoróforo e cada um dos supressores de fluorescência (Zhan et al., 2020). Deste modo, a formação dos complexos entre o Cas e os compostos fenólicos é consistente com outros estudos semelhantes e os valores das constantes de extinção obtidos também (Xie et al., 2017; G. Zhang et al., 2008; Zhu et al., 2017). O AT apresenta os dois mecanismos de extinção de fluorescência, estático e dinâmico (Lakowicz, 1999). Esta situação é observável através do gráfico da Figura A 11 do anexo, porque este apresenta dois comportamentos: um comportamento mais linear para as concentrações baixas, ou seja, até à concentração  $2,25 \times 10^{-6} M$  e para concentrações superiores apresenta um comportamento curvilíneo. Finalmente, é de salientar que o gráfico de Stern-Volmer da QR (Figura A 9 do anexo) apresenta uma notória diferença no declive do tempo 0 para o tempo 10. Ao final de 10 minutos, o declive do gráfico é maior, o que indica que ocorreu uma maior extinção de fluorescência do Cas por parte do supressor, QR.

### 3.1.1 Análise dos Dados de Ligação

O mecanismo de extinção de fluorescência foi determinado pelas equações (1) e (2) e, de modo a calcular a afinidade de ligação entre o Cas e cada um dos compostos fenólicos, foi utilizada a equação de Lineweaver-Burk (Liu et al., 2010). Admitindo que a ligação dos compostos fenólicos à proteína ocorre de forma independente a um conjunto de locais na proteína, o equilíbrio entre as moléculas livres e as moléculas ligadas é dado pela equação (3), através da qual se obtém a constante de ligação ( $K_b$ ) (Lu et al., 2009):

$$\frac{1}{(F_0-F)} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{(K_b \times F_0 \times [Q])} \quad (3)$$

Onde  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência antes e após a adição do supressor, respetivamente;  $[Q]$  é a concentração do supressor e  $K_b$  é a constante de ligação entre a proteína e o ligando, obtida a partir da representação gráfica da equação (3), num gráfico de  $[1/(F_0-F)]$  versus  $1/[Q]$  (Lu et al., 2009).

As representações gráficas da equação (3) para os complexos Cas-compostos fenólicos são apresentadas no Anexo 1. Observando os valores de  $K_b$ , apresentados na Tabela 1, verifica-se que do tempo 0 para o tempo 10, não houve alterações significativas na constante de ligação. Esta situação pode ter ocorrido devido à rápida formação do complexo e, assim, significar uma situação de equilíbrio. Sendo que  $K_b$  variou entre  $1,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  e  $37,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , para o tempo 0 e de  $1,51 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  a  $42,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para o tempo 10. Em geral, pode dizer-se que para interações ligando-proteína, as constantes de ligação são consideradas altas, quando estas estão dentro da faixa  $10^6$  a  $10^8 \text{ M}^{-1}$  (Sheng et al., 2014). Assim comparando os valores obtidos de  $K_b$ , com os valores acima mencionados, que consideram as constantes de ligação elevadas, podemos classificar que a ligação entre a proteína e os compostos fenólicos e que originam complexos, é moderada dado que é baseada em ligações não covalentes (Zhu et al., 2017). Pode ainda constatar-se que, para ambos os tempos da experiência, o valor de  $K_b$  mais elevado corresponde ao complexo Cas-AT, na ordem dos  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , enquanto que para os restantes complexos formados o valor de  $K_b$  situa-se na ordem dos  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Perante estes valores, pode constatar-se que as constantes de ligação obtidas são maiores para os complexos formados entre o Cas e os polifenóis maiores, do que para os complexos formados com compostos fenólicos de menor tamanho (Chanphai et al., 2018; Kanakis et al., 2011). Assim, pela análise dos valores de  $K_b$  pode ainda considerar-se que a extinção de fluorescência do Cas pelo AT é mais forte e mais estável do que com os restantes compostos fenólicos estudados (Liu et al., 2010). Tal razão pode dever-se ao facto do AT ser um composto fenólico mais volumoso e, por isso mesmo, possuir mais grupos OH, o que faz com as ligações de hidrogénio estabilizem mais este complexo e, conseqüentemente, tenham  $K_b$  mais altos (Chanphai et al., 2018).

### 3.1.2 Análise termodinâmica

Tal como referido anteriormente, existem quatro tipos principais de interações não covalentes na ligação entre pequenas moléculas e macromoléculas. Essas incluem pontes de hidrogénio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações electrostáticas (Daneshgar et al., 2009). Os estudos dos parâmetros termodinâmicos das reações de ligação permitem determinar o tipo de forças responsáveis pela ligação (Daneshgar et al., 2009).

Os valores da variação de entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ) e da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) podem ser determinados através das equações (4-6):  $\ln K_b = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$

(4)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_b \quad (5)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (6)$$

onde R é a constante dos gases ( $8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) e  $K_b$  é a constante de ligação que foi previamente calculada na temperatura correspondente, através da equação (3). A partir dos valores de outros parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$  e  $\Delta S$ ) é possível obter informação sobre a natureza das interações dominantes para cada complexo entre o composto fenólico e a proteína. Deste modo, valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  positivos, indicam principalmente interações hidrofóbicas (Wei et al., 2018), enquanto que valores negativos de  $\Delta H$  e  $\Delta S$ , surgem de forças de Van der Waals e ligações de hidrogénio (Ross & Subramanian, 1981). Os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  poderiam ser obtidos através da aplicação da equação de van't Hoff, mas neste estudo, não foram determinados porque não foi possível realizar ensaios a mais de uma temperatura. Os valores de  $\Delta G$  foram calculados pela equação 6 para todos os complexos de composto fenólico-Cas, e são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 -  $\Delta G$  relativo à formação do complexo Cas-composto fenólico, à temperatura de 37°C, nos tempos 0 e 10 minutos de incubação.

Composto Fenólico	Tempo	$\Delta G$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	Tempo	$\Delta G$ (KJ mol <sup>-1</sup> )
Ácido Cafeico		-27,10		-26,85
Ácido Gálico		-24,18		-27,02
Ácido Ferúlico	0 min	-10,20	10 min	-26,20
Ácido Clorogénico		-23,96		-24,26
Quercetina		-27,94		-27,91
Ácido Tânico		-32,34		-32,69

Os valores negativos de  $\Delta G$  significam que o processo de ligação dos compostos fenólicos ao Cas é favorável termodinamicamente e que ocorreu de forma espontânea (Daneshgar et al., 2009).

### 3.2 Dicroísmo Circular

O DC é uma técnica com elevada sensibilidade utilizada para monitorizar as alterações nas proteínas, ao nível da estrutura secundária (Abdollahi et al., 2020; Hasni et al., 2011). Esta pode sofrer modificações quando as proteínas estão envolvidas em alguns processos, nomeadamente na ligação com ligandos (Rogers et al., 2019).

Foi demonstrado anteriormente, por espectroscopia de fluorescência, a ocorrência de extinção de fluorescência devido à interação entre o Cas e os compostos fenólicos, tendo como efeito a promoção de alterações na estrutura terciária da proteína. Assim sendo, é importante examinar como a estrutura da proteína é afetada no complexo Cas-composto fenólico, porque havendo alteração na estrutura terciária da proteína, pode implicar mudança(s) na estrutura secundária. Tal poderá ser observado nos espectros de DC. As percentagens dos componentes da estrutura secundária obtidas a partir dos espectros de DC de soluções de quercetina com Cas, são apresentados na Tabela 3. Os resultados estão dentro do erro considerado aceitável pelo software (<0,1) (Whitmore & Wallace, 2008). Como já referido anteriormente, estes resultados foram obtidos pelo software Dichroweb, usando o programa de análise CDSSTR. O CDSSTR calcula os diferentes componentes das estruturas secundárias pela comparação dos espetros de DC obtidos com um conjunto de espetros de DC de proteínas globulares, medido no mesmo intervalo de comprimento de onda (Whitmore & Wallace, 2004).

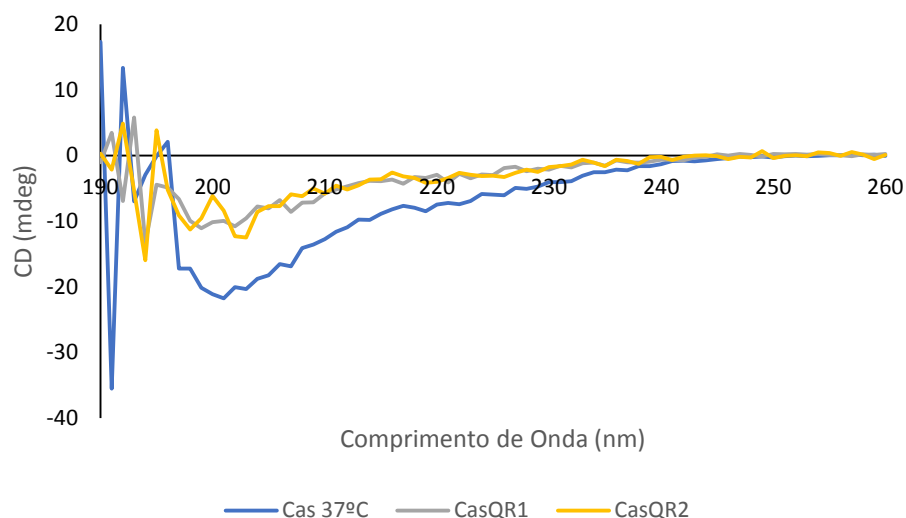


Figura 15 - Espectro de dicroísmo circular de caseinato de sódio-quercetina, sendo CasQR1= $8,60 \times 10^{-4}$  M, CasQR2= $1,85 \times 10^{-3}$  M, à temperatura de 37°C. Ao espectro CasQR foi subtraído o espectro de QR à mesma concentração e obtido nas mesmas condições.

Na

Figura 15 - Espectro de dicroísmo circular de caseinato de sódio-quercetina, sendo CasQR1= $8,60 \times 10^{-4}$  M, CasQR2= $1,85 \times 10^{-3}$  M, à temperatura de 37°C. Ao espectro CasQR foi subtraído o espectro de QR à mesma concentração e obtido nas mesmas condições. estão representados os espetros de DC do Cas, na ausência e presença de várias concentrações de quercetina. O espectro de DC do Cas apresenta um mínimo negativo a cerca de 200 nm que caracteriza uma estrutura desordenada. Observa-se também uma banda negativa entre os 210-222 nm e um pico positivo por volta dos 195-200nm, que são característicos de folhas- $\beta$  (Kaur et al., 2018; Rogers et al., 2019).

Tabela 3 - Conteúdo da estrutura secundária do Cas, analisado por DC, antes e depois da ligação com as diferentes concentrações da quercetina.

Ligando	Concentração (M)	Hélice- $\alpha$ (%)	Folha- $\beta$ (%)	Voltas- $\beta$ (%)	Enrolamento aleatório (%)
—	0	38	33	7	23
Quercetina	$8,60 \times 10^{-4}$	47	26	4	23
	$1,85 \times 10^{-3}$	46	27	4	22

As percentagens do conteúdo da estrutura secundária, antes do tratamento com quercetina, são apresentadas na Tabela 3, e correspondem a 38% de hélice- $\alpha$ , a 33% de folhas- $\beta$ , a 7% de voltas- $\beta$  e a 23% de estrutura desordenada. A interação entre o Cas e a Quercetina demonstra assim algumas alterações, principalmente ao nível do conteúdo de hélice- $\alpha$  e de folhas- $\beta$ . Devido à interação com a Quercetina houve uma diminuição do conteúdo de folhas- $\beta$  e um aumento do conteúdo de hélice- $\alpha$ . Este aumento indica que a formação de ligações de hidrogénio é favorecida, o que confere maior estabilidade às hélices- $\alpha$  (Muñoz & Serrano, 1995).

Resultados semelhantes, com o aumento do conteúdo de hélice- $\alpha$ , foram reportados num estudo com complexos formados com outra proteína do leite ( $\beta$ -LG) e polifenóis do chá (Kanakis et al., 2011). Noutro estudo, realizado por Pu et al, 2021, em que foi utilizada também a  $\beta$ -LG e seis flavonoides, um dos quais a quercetina, foram obtidos resultados diferentes em relação ao conteúdo de hélice- $\alpha$ . Neste caso, verificou-se uma diminuição na percentagem de hélice- $\alpha$ , com um aumento de folhas- $\beta$  e de enrolamento ao acaso, que indicam alterações na estrutura secundária da proteína (Pu et al., 2021). Wu et al., 2018, utilizaram também polifenóis do chá, nomeadamente o ACL e EGCG para estudar a redução da capacidade alergénica da  $\beta$ -LG por conjugação com estes polifenóis e usaram o DC para analisar as alterações conformacionais da proteína após esta conjugação. Os resultados de DC demonstraram que os conjugados  $\beta$ -LG-polifenol obtiveram valores de elipticidade menores no comprimento de onda de 208 nm, do que o da  $\beta$ -LG de controlo, o que indica diminuição do conteúdo de hélice- $\alpha$ . Assim, após conjugação com os polifenóis, observaram que conteúdo de hélice- $\alpha$  e folhas- $\beta$  diminuiu e o conteúdo de enrolamento ao acaso aumentou, o que sugere que a conjugação promoveu mudanças na estrutura secundária desta proteína, tornando-a mais desordenada (Wu et al., 2018).

Em outro estudo onde utilizaram também a quercetina, mas com uma proteína do ovo, a ovalbumina, os resultados de DC demonstraram que a conjugação deste composto fenólico com a ovalbumina, levou à diminuição do conteúdo de hélice- $\alpha$  (T. Zhang et al., 2020).

De um modo geral, pode concluir-se que a adição de quercetina à solução do Cas promoveu mudanças na conformação da proteína, o que é consistente também com os resultados da fluorescência.

### 3.3 Docking molecular de compostos fenólicos com uma proteína do soro de leite

O *docking* molecular é um método de simulação utilizado para prever o modo de ligação e a afinidade entre a proteína e as moléculas de ligandos (Zeng et al., 2019). O estudo de *docking* molecular não foi realizado com o caseinato de sódio, uma vez que esta proteína não apresenta uma estrutura única, pois resulta da junção de quatro frações de caseínas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ). Deste modo, como o caseinato não é uma proteína pura cristalizada, não há possibilidade deste estudo ser efetuado com esta proteína. Como a  $\beta$ -LG é uma proteína globular do soro de leite, com peso molecular de 18,3 KDa (Chanphai et al., 2018), foi utilizada para o estudo de *docking*. Como referido anteriormente, a proteína contém uma hélice- $\alpha$  e nove folhas- $\beta$  antiparalelas, de modo a formar uma estrutura “ $\beta$ -barrel”, em forma de um cálice (Wu et al., 2018). Esta proteína possui dois resíduos de triptofano, o Trp-19 e o Trp-61 (Liang et al., 2008), como representado na Figura 16. Dos dois resíduos de triptofano, o Trp-19 é o principal responsável pela fluorescência (Maity et al., 2016).

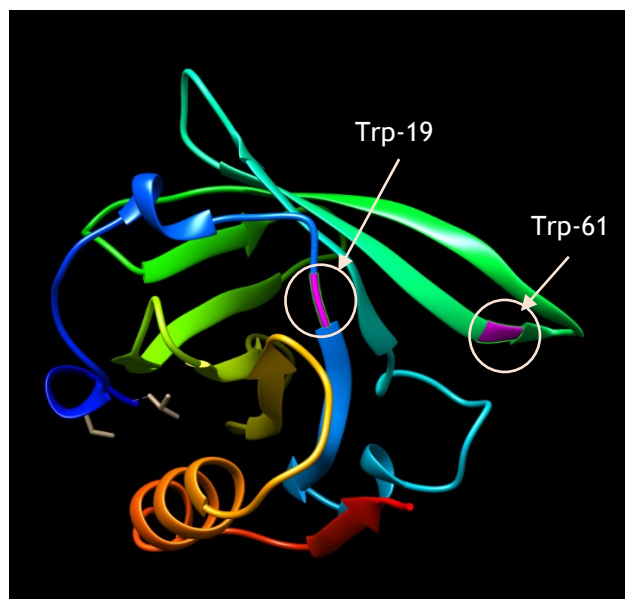


Figura 16 - Estrutura 3D da  $\beta$ -Lactoglobulina (PDB: 2Q2M).

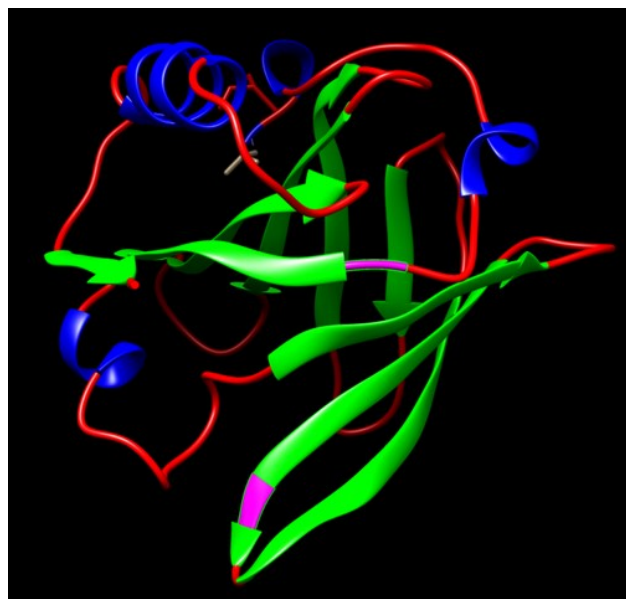


Figura 17 - Conteúdos de estrutura secundária da  $\beta$ -Lactoglobulina, hélice- $\alpha$  (a azul), folhas- $\beta$  (a verde) e enrolamento ao acaso (a vermelho).

O programa utilizado para os estudos do *docking* molecular foi o SwissDock e para a visualização utilizou-se o UCSF Chimera 1.15. O SwissDock é um servidor de *docking* na *web* (Grosdidier et al., 2011). Neste programa, as estruturas do ligando e da proteína alvo podem ser preparadas *online* para o *docking* molecular. Os modos de ligação previstos e toda a interpretação dos resultados é muito facilitada pela possibilidade de visualização *online* das previsões de *docking* no visualizador molecular UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004), o qual pode ser iniciado diretamente na *web* (Grosdidier et al., 2011). O SwissDock foi desenvolvido com base no programa de *docking* EADock DSS, cujo algoritmo consiste nas quatro etapas seguintes: são gerados muitos tipos de ligação em uma caixa designada por *docking* local ou nas proximidades de todas as cavidades alvo, chamado *docking* cego, ao mesmo tempo que as suas energias são calculadas de acordo com a aproximação de CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics). Posteriormente, as conformações de composto fenólico à volta da proteína com as energias mais favoráveis são avaliados pelo método FACTS (Fast Analytical Treatment Continuum of Solvation) e são agrupados em “*clusters*“, que podem ser visualizados (Grosdidier et al., 2011).

As interações e os modos de ligação entre a  $\beta$ -LG e os compostos fenólicos (Quercetina e Ácido Tânico) foram analisadas por *docking* molecular, como representado na Figura 18. A estrutura cristalizada da  $\beta$ -LG foi pesquisada na Protein Data Bank (PDB: 2Q2M) e foi obtida com uma resolução de 2,10 Å. A estrutura tridimensional do AT foi obtida no UCSF Chimera com base na obtida na PubChem, enquanto a estrutura da quercetina foi obtida pela SwissDock através da Protein Data Bank (<http://www.swissdock.ch/docking>). Pela análise da energia livre de ligação ( $\Delta G$ ), o estudo do *docking* molecular mostra que o complexo de ácido tânico -  $\beta$ -LG é mais estável do que o complexo quercetina -  $\beta$ -LG (Erro! A origem da referência não foi

ncontrada. Erro! A origem da referência não foi encontrada.). Foram observadas ligações de hidrogénio entre o AT e a QR e diferentes resíduos de aminoácidos, que tendem a estabilizar os complexos composto fenólico-proteína.

Tabela 4 - Energia de ligação obtida pelo docking molecular.

Complexo	$\Delta G$ (KJ/mol)
Ácido Tânico - $\beta$ -LG	-39,4
Quercetina - $\beta$ -LG	-32,6

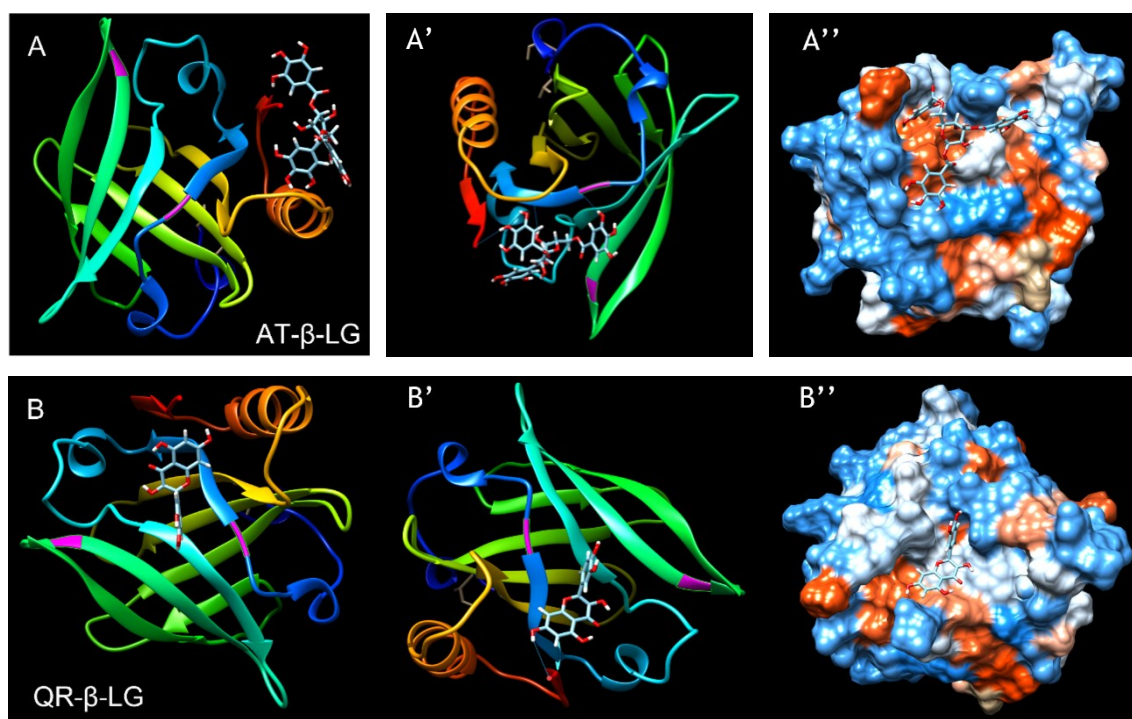


Figura 18 - Imagens de docking molecular de  $\beta$ -Lactoglobulina com ácido tânico A e quercetina B, em que A'' e B'' são imagens de superfície, onde a região a azul representa as zonas hidrofílicas e a região vermelha representa as zonas hidrofóbicas.

Pela análise das imagens obtidas pelo UCSF Chimera (Figura 16 e Figura 17) pode observar-se a localização dos dois triptofanos da  $\beta$ -LG: o Trp-19 está no enrolamento ao acaso, enquanto o Trp-61 está situado numa folha- $\beta$ . O ácido tânico estabelece ligações de hidrogénio com o Trp-19, a serina-21 e a asparagina-152, enquanto a QR estabelece ligação com a asparagina-152. As distâncias das ligações de hidrogénio, são 1,793 Å, 2,155 Å, 1,797 Å e 1,937 Å respetivamente. Este facto indica que estas interações com ligações de hidrogénio são relativamente fortes (Lu et al., 2009). Em relação ao AT, as ligações de hidrogénio que este efetua com o Trp-19 e com a asparagina-152, ocorrem na estrutura secundária de enrolamento ao acaso, já a ligação com

a serina-21 ocorre numa folha-B. A ligação de hidrogénio da QR com asparagina-152 está localizada num enrolamento ao acaso. Pelas imagens de superfície (Figura 18 B'') pode observar-se que o AT, está posicionado sobre uma zona mais hidrofóbica da  $\beta$ -LG, enquanto a QR está situada numa zona da  $\beta$ -LG mais hidrofílica, mas ambos se encontram dentro de pequenas cavidades da proteína. Pode ainda dizer-se que o facto do AT efetuar mais interações por meio de ligações de hidrogénio com a proteína do que a QR, pode dever-se ao facto do número de interações por ligações de hidrogénio aumentar com o aumento do número de grupos hidroxilo na estrutura dos compostos fenólicos estudados (Sahihi et al., 2012).

Num estudo de *docking* molecular realizado por Kanakis et al., 2011, com a  $\beta$ -LG, mas com compostos fenólicos diferentes (catequina, epicatequina, e o EGCG), os resultados demonstraram que os complexos  $\beta$ -LG-epicatequina e a  $\beta$ -LG-EGCG eram mais estáveis do que o complexo  $\beta$ -LG-catequina, uma vez que a energia de ligação destes foi superior e que as ligações de hidrogénio formadas estabilizam os complexos formados (Kanakis et al., 2011). Noutro estudo, onde investigaram a interação de flavonoides com a  $\beta$ -LG através de *docking* molecular e simulação dinâmica (Sahihi et al., 2012), sendo a QR um dos polifenóis usados, os resultados demonstraram que a QR e a quercitrina se ligavam à cavidade interna da  $\beta$ -LG através de ligações de hidrogénio, dado que a QR efetua uma ligação de hidrogénio e a quercitrina efetua três ligações. Por sua vez, a rutina não se ligou na cavidade interna da proteína, mas sim à entrada da cavidade efetuando quatro ligações de hidrogénio. Estes autores concluíram que a interação destes polifenóis com a  $\beta$ -LG não é primeiramente hidrofóbica e que o modo de ligação é dependente dos grupos hidroxilo presentes na estrutura dos compostos fenólicos, uma vez que se verifica o aumento do número de ligações de hidrogénio com o aumento de grupos hidroxilo na estrutura dos flavonoides (Sahihi et al., 2012). Pu et al., 2021 recorreram a estudos espectroscópicos e de *docking* molecular, para investigarem a ação de seis flavonoides sobre a antigenicidade da  $\beta$ -LG por meio de ligações covalentes. O *docking* molecular foi aplicado para estudar os modos de ligação e as interações dos seis flavonoides com a  $\beta$ -LG e os resultados revelaram que os compostos estudados se ligavam com sucesso às regiões das folhas-B e voltas-B na superfície externa da  $\beta$ -LG, próxima da região helicoidal (Pu et al., 2021).

## Capítulo 4 - Conclusões

As interações do Cas com seis compostos fenólicos, nomeadamente o AG, AC, AF, ACL, QR e o AT, foram analisadas pela técnica de extinção de fluorescência e por DC. O estudo destas interações teve como objetivo, entender e analisar o seu tipo, avaliar as possíveis alterações na estrutura secundária e terciária do caseinato de sódio quando na presença dos compostos fenólicos e averiguar se ocorreu ou não a formação de complexos.

Os resultados obtidos indicaram que os seis compostos fenólicos estudados se ligam ao Cas e são supressores da fluorescência dos três aminoácidos com propriedades intrínsecas de fluorescência, nomeadamente a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. Através da análise da fluorescência, conclui-se que o tipo de extinção de fluorescência promovido pela maioria dos compostos fenólicos estudados, é um mecanismo de extinção estático, porque ocorreu devido à formação de um complexo entre o Cas e o supressor. Excetua-se o AT, em que se verificou apresentar os dois mecanismos de extinção de fluorescência, mecanismo estático e mecanismo dinâmico, uma vez que, para concentrações menores demonstra um comportamento linear, enquanto para concentrações superiores apresenta um comportamento curvilíneo. Segundo a análise do cálculo da energia livre de Gibbs, todos os processos de ligação estudados neste trabalho, ocorrem de forma espontânea, uma vez que para todos os complexos de compostos de fenólicos (AG, AC, AF, ACL, QR e AT) - Cas, apresentam o  $\Delta G$  menor que zero. Os resultados da interação do Cas com a QR, obtidos por CD demonstram um aumento da percentagem de hélice- $\alpha$  e uma diminuição da percentagem das folhas- $\beta$ , o que indica alteração da sua estrutura secundária. A estrutura do Cas é assim afetada pela interação com os compostos fenólicos estudados, sugerindo também a alteração da sua capacidade alergénica.

No entanto, apesar de já ter sido descrita a redução da capacidade alergénica do amendoim por interações com compostos fenólicos (Chung & Champagne, 2009), e também de já ter sido relatado a redução da capacidade alergénica da  $\beta$ -LG com polifenóis dietéticos (Wu et al., 2018), ainda não foi encontrado na Web of Science (Maio de 2022) qualquer registo sobre a redução da capacidade alérgica ao Cas por meio de compostos fenólicos.

O estudo do *docking* molecular da  $\beta$ -LG mostra que tanto o AT, como a QR se ligam à proteína, sendo que o complexo mais favorecido do ponto de vista termodinâmico é do AT -  $\beta$ -LG ( $\Delta G = -40,4$  KJ/mol). Este estudo demonstrou ainda que o AT efetuou mais ligações de hidrogénio com a  $\beta$ -LG, do que a QR, o que pode dever-se ao facto do AT possuir na sua estrutura maior número de grupos hidroxilo.

No futuro, será importante prosseguir o estudo de *docking* para verificar se estes compostos fenólicos se ligam à  $\beta$ -LG perto da região dos epítomos. Além disso, devem ser efetuados estudos termodinâmicos a outras temperaturas, entre o caseinato e os compostos fenólicos. Finalmente, deve ser testado se algum complexo composto fenólico-caseinato diminuiu a reatividade de soros de doentes alérgicos a caseínas.



## Referências Bibliográficas

- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2021). Reduction of Milk Protein Antigenicity by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. A Review. *Food Reviews International*, 37(3), 276-295. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1701010>
- Abdollahi, K., Ince, C., Condict, L., Hung, A., & Kasapis, S. (2020). Combined spectroscopic and molecular docking study on the pH dependence of molecular interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and ferulic acid. *Food Hydrocolloids*, 101, 105461. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105461>
- Abrams, E. M., & Sicherer, S. H. (2016). Diagnosis and Management of Food Allergy. *Canadian Medical Association Journal*, 1087-1093. <https://doi.org/10.1503/cmaj.160124>
- Akbar, S. M. D., Sreeramulu, K., & Sharma, H. C. (2016). Tryptophan fluorescence quenching as a binding assay to monitor protein conformation changes in the membrane of intact mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48(3), 241-247. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9653-0>
- Albenzio, M., Santillo, A., Ciliberti, M. G., Figliola, L., Caroprese, M., Marino, R., & Polito, A. N. (2016). Milk from different species: Relationship between protein fractions and inflammatory response in infants affected by generalized epilepsy. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5032-5038. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10704>
- Albuhairi, S., & Rachid, R. (2020). Novel Therapies for Treatment of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 40(1), 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2019.09.007>
- Bauer, R. N., Manohar, M., Singh, A. M., Jay, D. C., & Nadeau, K. C. (2015). The future of biologics: Applications for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(2), 312-323. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1908>
- Boaventura, R. M., Mendonça, R. B., Fonseca, F. A., Mallozi, M., Souza, F. S., & Sarni, R. O. S. (2019). Nutritional status and food intake of children with cow's milk allergy. *Allergologia et Immunopathologia*, 47(6), 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2019.03.003>
- Breiteneder, H., & Mills, E. N. C. (2005). Molecular properties of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.022>
- Breiteneder, H., & Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 821-830. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.779>
- Buitimea-Cantúa, N. E., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2018). Phenolic-protein interactions: Effects on food properties and health benefits. *Journal of Medicinal Food*, 21(2), 188-198. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0057>
- Cabanillas, B., & Novak, N. (2019). Effects of daily food processing on allergenicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(1), 31-42.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1356264>

- Chanphai, P., Bourassa, P., Kanakis, C. D., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2018). Review on the loading efficacy of dietary tea polyphenols with milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 77, 322-328. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.008>
- Chizoba Ekezie, F. G., Cheng, J. H., & Sun, D. W. (2018). Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. *Trends in Food Science and Technology*, 74, 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.007>
- Chu, Q., Bao, B., & Wu, W. (2018). Minireview Mechanism of Interaction between Phenolic Compounds and Proteins Based on Non-Covalent and Covalent Interactions Minireview. *Med. Res.*, 2, 1-6. <https://doi.org/10.21127/yaoyimr20180014>
- Chung, S. Y., & Champagne, E. T. (2009). Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds. *Food Chemistry*, 115(4), 1345-1349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.052>
- Cirkovic Velickovic, T. D., & Stanic-Vucinic, D. J. (2018). The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 82-103. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12320>
- Collard, J. (2010). Food allergy and intolerance. In *Practice Nurse* (Vol. 39, Issue 1).
- Corrêa, D., & Ramos, C. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J Biochem Res*, 3(5), 164-173. [http://www.academicjournals.org/AJBR/PDF/Pdf2009/May/Special Issue/Corrêa and Ramos.pdf](http://www.academicjournals.org/AJBR/PDF/Pdf2009/May/Special%20Issue/Corr%C3%AAa%20and%20Ramos.pdf)
- Crittenden, R. G., & Bennett, L. E. (2005). Cow's milk allergy: A complex disorder. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(August), 582S-591S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719507>
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15. <https://doi.org/10.1002/jms.585>
- Czubinski, J., & Dwiecki, K. (2017). A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 573-585. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13339>
- Daneshgar, P., Moosavi-Movahedi, A. A., Norouzi, P., Ganjali, M. R., Madadkar-Sobhani, A., & Saboury, A. A. (2009). Molecular interaction of human serum albumin with paracetamol: Spectroscopic and molecular modeling studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(2), 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.04.011>
- Dong, X., Wang, J., & Raghavan, V. (2020). Critical reviews and recent advances of novel non-thermal processing techniques on the modification of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1-15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722942>
- Dubeau, S., Samson, G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2010). Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, 122(3), 539-545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.005>

- Dupont, C., Chouraqui, J. P., Linglart, A., Bocquet, A., Darmaun, D., Feillet, F., Frelut, M. L., Girardet, J. P., Hankard, R., Rozé, J. C., Simeoni, U., & Briend, A. (2018). Nutritional management of cow's milk allergy in children: An update. *Archives de Pédiatrie*, 25(3), 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2018.01.007>
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512-2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- Fiocchi, A., Schünemann, H. J., Brozek, J., Restani, P., Beyer, K., Troncone, R., Martelli, A., Terracciano, L., Bahna, S. L., Rancé, F., Ebisawa, M., Heine, R. G., Assa'ad, A., Sampson, H., Verduci, E., Bouygue, G. R., Baena-Cagnani, C., Canonica, W., & Lockey, R. F. (2010). Diagnosis and rationale for action against Cow's milk allergy (DRACMA): A summary report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(6). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.011>
- Flammarion, S., Santos, C., Guimber, D., Jouannic, L., Thumerelle, C., Gottrand, F., & Deschildre, A. (2011). Diet and nutritional status of children with food allergies. *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(2), 161-165. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01028.x>
- Fleischer, D. M., Venter, C., & Vandenplas, Y. (2016). Hydrolyzed Formula for Every Infant? *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 86, 51-65. <https://doi.org/10.1159/000442956>
- Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-Fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L., Zheng, J., Badran, H., Budinski, Z., Mandal, R., Ametaj, B. N., & Wishart, D. S. (2019). Chemical Composition of Commercial Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(17), 4897-4914. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00204>
- González-Sarrías, A., Li, L., & Seeram, N. P. (2012). Anticancer effects of maple syrup phenolics and extracts on proliferation, apoptosis, and cell cycle arrest of human colon cells. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 185-196. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.10.004>
- Graf, B. A., Milbury, P. E., & Blumberg, J. B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 281-290. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.281>
- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 270-277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>
- Guo, W., Kong, E. H., & Meydani, M. (2009). Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutrition and Cancer*, 61(6), 807-810. <https://doi.org/10.1080/01635580903285098>
- Han, X. Le, Tian, F. F., Ge, Y. S., Jiang, F. L., Lai, L., Li, D. W., Yu, Q. L., Wang, J., Lin, C., & Liu, Y. (2012). Spectroscopic, structural and thermodynamic properties of chlorpyrifos bound to serum albumin: A comparative study between BSA and HSA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 109, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.12.010>

- Hasni, I., Bourassa, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Binding of cationic lipids to milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(20), 6683-6690. <https://doi.org/10.1021/jp200045h>
- Huang, H. W., Hsu, C. P., Yang, B. B., & Wang, C. Y. (2014). Potential utility of high-pressure processing to address the risk of food allergen concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 78-90. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12045>
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>
- Jia, J., Gao, X., Hao, M., & Tang, L. (2017). Comparison of binding interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods. *Food Chemistry*, 228, 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.131>
- Kanakis, C. D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127(3), 1046-1055. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.079>
- Kasera, R., Singh, A. B., Lavasa, S., Prasad, K. N., & Arora, N. (2015). Enzymatic hydrolysis: A method in alleviating legume allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 76, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.023>
- Kaume, L., Gbur, E. E., DiBrezza, R., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2014). Antioxidant-rich berries exert modest bone protective effects in postmenopausal smokers without improving biomarkers of bone metabolism. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.025>
- Kaur, J., Katopo, L., Hung, A., Ashton, J., & Kasapis, S. (2018). Combined spectroscopic, molecular docking and quantum mechanics study of  $\beta$ -casein and p-coumaric acid interactions following thermal treatment. *Food Chemistry*, 252, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.091>
- Keen, C. L., Lonnerdal, B., Clegg, M. S., Hurley, L. S., Morris, J. G., Rogers, Q. R., & Rucker, R. B. (1982). Developmental changes in composition of cats' milk: Trace elements, minerals, protein carbohydrate and fat. *Journal of Nutrition*, 112(9), 1763-1769. <https://doi.org/10.1093/jn/112.9.1763>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119-139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kocabaş, C. N., & Şekerel, B. E. (2003). Cow's milk allergic patients should be informed of the sources of caseinate. *Turkish Journal of Pediatrics*, 45(2), 165-166.
- Labuckas, D. O., Maestri, D. M., Perelló, M., Martínez, M. L., & Lamarque, A. L. (2008). Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*, 107(2), 607-612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.051>
- Lakowicz, J. R. (1999). Quenching of Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*,

- 237-265. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6_8)
- Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3), 213-248. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499808>
- Lee, J. W., Kim, J. H., Yook, H. S., Kang, K. O., Lee, S. Y., Hwang, H. J., & Byun, M. W. (2001). Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *Journal of Food Protection*, 64(2), 272-276. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.2.272>
- Lepski, S., & Brockmeyer, J. (2013). Impact of dietary factors and food processing on food allergy. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(1), 145-152. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200472>
- Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A., & Subirade, M. (2008). Interaction of  $\beta$ -Lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules*, 9(1), 50-56. <https://doi.org/10.1021/bm700728k>
- Lima, L. S. (2014). Interações de van der Waals. *Revista de Ciência Elementar*, 2(1), 1-2. <https://doi.org/10.24927/rce2014.125>
- Linhart, B., Freidl, R., Elisyutina, O., Khaitov, M., Karaulov, A., & Valenta, R. (2019). Molecular approaches for diagnosis, therapy and prevention of Cow's milk allergy. *Nutrients*, 11(7), 1-24. <https://doi.org/10.3390/nu11071492>
- Liu, E. H., Qi, L. W., & Li, P. (2010). Structural relationship and binding mechanisms of five flavonoids with bovine serum albumin. *Molecules*, 15(12), 9092-9103. <https://doi.org/10.3390/molecules15129092>
- Lu, Y., Wang, Y. L., Gao, S. H., Wang, G. K., Yan, C. L., & Chen, D. J. (2009). Interaction of quercetin with ovalbumin: Spectroscopic and molecular modeling studies. *Journal of Luminescence*, 129(9), 1048-1054. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2009.04.030>
- Luo, C., Hu, C., Gao, J., Li, X., Wu, Z., Yang, A., & Chen, H. (2013). A potential practical approach to reduce Ara h 6 allergenicity by gamma irradiation. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1141-1147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.091>
- Maity, S., Pal, S., Sardar, S., Sepay, N., Parvej, H., Chakraborty, J., & Chandra Halder, U. (2016). Multispectroscopic analysis and molecular modeling to investigate the binding of beta lactoglobulin with curcumin derivatives. *RSC Advances*, 6(113), 112175-112183. <https://doi.org/10.1039/C6RA24275H>
- Masson, F. A., Mikhaylin, S., & Bazinet, L. (2018). Production of calcium- and magnesium-enriched caseins and caseinates by an ecofriendly technology. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 7002-7012. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14005>
- Meng, X., Bai, Y., Gao, J., Li, X., & Chen, H. (2017). Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 219, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.153>
- Mills, E. C., & Mackie, A. R. (2008). The impact of processing on allergenicity of food. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, 8(3), 249-253. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3282fffb123>

- Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B. K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W. M., Koppelman, S. J., Knulst, A. C., Helbling, A., Hefle, S. L., Van Ree, R., & Vieths, S. (2004). Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *114*(6), 1410-1417. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.09.014>
- Morton, L. W., Caccetta, R. A. A., Puddey, I. B., & Croft, K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *27*(3), 152-159. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03214.x>
- Mousan, G., & Kamat, D. (2016). Cow's Milk Protein Allergy. *Clinical Pediatrics*, *55*(11), 1054-1063. <https://doi.org/10.1177/0009922816664512>
- Mulaudzi, R. B., Ndhkala, A. R., Kulkarni, M. G., & Van Staden, J. (2012). Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *Journal of Ethnopharmacology*, *143*(1), 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.022>
- Muñoz, V., & Serrano, L. (1995). Helix design, prediction and stability. *Current Opinion in Biotechnology*, *6*(4), 382-386. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80066-2](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80066-2)
- Murphy, K., Curley, D., O'callaghan, T. F., O'shea, C. A., Dempsey, E. M., O'toole, P. W., Ross, R. P., Ryan, C. A., & Stanton, C. (2017). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Scientific Reports*, *7*(October 2016), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep40597>
- Nahar, P. P., Driscoll, M. V., Li, L., Slitt, A. L., & Seeram, N. P. (2014). Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. *Journal of Functional Foods*, *6*(1), 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.026>
- Nakagawa, Y., Odomari, K., Kotobuki, Y., Kiyohara, E., Katayama, I., & Fujimoto, M. (2020). Anaphylaxis caused by sodium caseinate contained in canned coffee. *Allergology International*, *69*(1), 157-158. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.08.005>
- Nayak, B., Li, Z., Ahmed, I., & Lin, H. (2017). Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation. In *Academic Press*.
- Nowak-Węgrzyn, A., Bloom, K. A., Sicherer, S. H., Shreffler, W. G., Noone, S., Wanich, N., & Sampson, H. A. (2008). Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.05.043>
- Oliveras-López, M. J., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., López-García de la Serrana, H., & Martín, F. (2014). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of Functional Foods*, *10*, 475-484. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.013>
- Ortega, N., Romero, M. P., Maclà, A., Reguant, J., Anglès, N., Morelló, J. R., & Motilva, M. J. (2008). Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(20), 9621-9627.

- <https://doi.org/10.1021/jf8014415>
- Ozidal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
- Patel, N., Herbert, L., & Green, T. D. (2017). The emotional, social, and financial burden of food allergies on children and their families. *Allergy and Asthma Proceedings*, 38(2), 88-91. <https://doi.org/10.2500/aap.2017.38.4028>
- Pessato, T. B., de Moraes, F. P. R., de Carvalho, N. C., Figueira, A. C. M., Fernandes, L. G. R., Zollner, R. de L., & Netto, F. M. (2018). Protein structure modification and allergenic properties of whey proteins upon interaction with tea and coffee phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 51(February), 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.019>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Plundrich, N. J., White, B. L., Dean, L. L., Davis, J. P., Foegeding, E. A., & Lila, M. A. (2015). Stability and immunogenicity of hypoallergenic peanut protein-polyphenol complexes during in vitro pepsin digestion. *Food and Function*, 6(7), 2145-2154. <https://doi.org/10.1039/c5fo00162e>
- Poklar Ulrih, N. (2017). Analytical techniques for the study of polyphenol-protein interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2144-2161. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1052040>
- Pu, P., Zheng, X., Jiao, L., Chen, L., Yang, H., Zhang, Y., & Liang, G. (2021). Six flavonoids inhibit the antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by noncovalent interactions: A spectroscopic and molecular docking study. *Food Chemistry*, 339(September 2020), 128106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128106>
- Quan, T. H., Benjakul, S., Sae-leaw, T., Balange, A. K., & Maqsood, S. (2019). Protein-polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends in Food Science and Technology*, 91(April), 507-517. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.049>
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2015). Conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH-Effects on antigenicity. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4255-4265. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9010>
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001>
- Rasteiro, E. M. N. (2012). Eugénia Maria Neves Rasteiro Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium spp* , do grupo “ Southern Highbush ”, produzidas em Portugal Eugénia Maria Neves Rasteiro Licenciada em

- Bioquímica Avaliação das. *Dissertação Para a Obtenção Do Grau de Mestre Em Tecnologia e Segurança Alimentar*. [http://run.unl.pt/bitstream/10362/7707/1/Rasteiro\\_2012.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/7707/1/Rasteiro_2012.pdf)
- Rawel, H. M., Kroll, J., & Rohn, S. (2001). Reactions of phenolic substances with lysozyme - Physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chemistry*, 72(1), 59-71. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00206-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00206-5)
- Rogers, D. M., Jasim, S. B., Dyer, N. T., Auvray, F., Réfrégiers, M., & Hirst, J. D. (2019). Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. *Chem*, 5(11), 2751-2774. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.07.008>
- Ross, P. D., & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry*, 20(11), 3096-3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
- Ruiz Oropeza, A., Lassen, A., Halken, S., Bindslev-Jensen, C., & Mortz, C. G. (2017). Anaphylaxis in an emergency care setting: A one year prospective study in children and adults. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 25(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13049-017-0402-0>
- Sahihi, M., Heidari-Koholi, Z., & Bordbar, A. K. (2012). The interaction of polyphenol flavonoids with -lactoglobulin: Molecular docking and molecular dynamics simulation studies. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 51(12), 2311-2323. <https://doi.org/10.1080/00222348.2012.672854>
- Sampath, V., Sindher, S. B., Alvarez Pinzon, A. M., & Nadeau, K. C. (2020). Can food allergy be cured? What are the future prospects? *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 75(6), 1316-1326. <https://doi.org/10.1111/all.14116>
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 805-819. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.014>
- Sarode, A. R., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., Kalyankar, S. D., & Pawshe, R. D. (2015). Casein and Caseinate: Methods of Manufacture. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00122-7>
- Sélo, I., Clément, G., Bernard, H., Chatel, J. M., Créminon, C., Peltre, G., & Wal, J. M. (1999). Allergy to bovine B-lactoglobulin: Specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clinical and Experimental Allergy*, 29(8), 1055-1063. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00612.x>
- Shek, L. P. C., Bardina, L., Castro, R., Sampson, H. A., & Beyer, K. (2005). Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60(7), 912-919. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00705.x>
- Sheng, F., Wang, Y., Zhao, X., Tian, N., Hu, H., & Li, P. (2014). Separation and identification of anthocyanin extracted from mulberry fruit and the pigment binding properties toward human serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6813-6819. <https://doi.org/10.1021/jf500705s>
- Shriver, S. K., & Yang, W. W. (2011). Thermal and Nonthermal Methods for Food Allergen

- Control. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 26-43. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9033-9>
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2006). 9. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2 SUPPL. 2), 470-475. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.05.048>
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2014). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291-307.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020>
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2018). Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 41-58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>
- Sicherer, S. H., & Teuber, S. (2004). Current approach to the diagnosis and management of adverse reactions to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(5), 1146-1150. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.07.034>
- Singh, P., & Makharia, G. K. (2019). Food allergy and food hypersensitivity. In *Clinical and Basic Neurogastroenterology and Motility*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813037-7.00027-3>
- Tamineedi, C. V. R. K., Choudhary, R., Perez-Alvarado, G. C., & Watson, D. G. (2013). Determining the effect of UV-C, high intensity ultrasound and nonthermal atmospheric plasma treatments on reducing the allergenicity of  $\alpha$ -casein and whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.020>
- Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N., & Mori, H. (1993). Chemoprevention of Diethylnitrosamine-induced Hepatocarcinogenesis by a Simple Phenolic Acid Protocatechuic Acid in Rats. *Cancer Research*, 53(12), 2775-2779.
- van Neerven, R. J., & Savelkoul, H. F. J. (2019). The two faces of cow's milk and allergy: Induction of cow's milk allergy vs. Prevention of asthma. *Nutrients*, 11(8), 2-7. <https://doi.org/10.3390/nu11081945>
- Vanga, S. K., Singh, A., & Raghavan, V. (2017). Review of conventional and novel food processing methods on food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2077-2094. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1045965>
- Verhoeckx, K. C. M., Vissers, Y. M., Baumert, J. L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guichenev, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., van der Bolt, N., Wichers, H., & Kimber, I. (2015). Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 223-240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.005>
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). Families of phenolic compounds and means of classification. *Phenolic Compound Biochemistry*, 1-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_1)
- Wang, K., Sun, D. W., Pu, H., & Wei, Q. (2017). Principles and applications of spectroscopic techniques for evaluating food protein conformational changes: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 207-219. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.015>
- Wei, J., Xu, D., Yang, J., Zhang, X., Mu, T., & Wang, Q. (2018). Analysis of the interaction

- mechanism of Anthocyanins (*Aronia melanocarpa* Elliot) with  $\beta$ -casein. *Food Hydrocolloids*, 84(April), 276-281. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.011>
- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 668-673. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh371>
- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392-400. <https://doi.org/10.1002/bip.20853>
- Wood, R. A. (2014). The Natural History of Food Allergy. In *Food Allergy: Vol. D* (Issue 6, pp. 464-474). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118744185.ch37>
- Woody, R. W., & Koslowski, A. (2002). Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and  $\alpha$ -helical polypeptides. *Biophysical Chemistry*, 101-102, 535-551. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00187-4)
- Wu, X., Lu, Y., Xu, H., Lin, D., He, Z., Wu, H., Liu, L., & Wang, Z. (2018). Reducing the allergenic capacity of  $\beta$ -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols. *Food Chemistry*, 256, 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.158>
- Xie, L., Wehling, R. L., Ciftci, O., & Zhang, Y. (2017). Formation of complexes between tannic acid with bovine serum albumin, egg ovalbumin and bovine beta-lactoglobulin. *Food Research International*, 102, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.007>
- Yao, M., Luo, Y., Shi, J., Zhou, Y., Xu, Q., & Li, Z. (2014). Effects of fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* GG on the antigenicity and allergenicity of four cows' milk proteins. *Food and Agricultural Immunology*, 25(4), 545-555. <https://doi.org/10.1080/09540105.2013.852163>
- Yogesha, M., Rao, V. G., Devangad, P., D'Souza, J. S., & Chidangil, S. (2020). A chemometric study combined with spectroscopy for the quantification of secondary structure of flagellar-associated protein 174 (FAP174). *Journal of Chemometrics*, 34(5), 1-14. <https://doi.org/10.1002/cem.3221>
- Zeng, L., Ding, H., Hu, X., Zhang, G., & Gong, D. (2019). Galangin inhibits  $\alpha$ -glucosidase activity and formation of non-enzymatic glycation products. *Food Chemistry*, 271, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.148>
- Zhan, F., Hu, J., He, C., Sun, J., Li, J., & Li, B. (2020). Complexation between sodium caseinate and gallic acid: Effects on foam properties and interfacial properties of foam. *Food Hydrocolloids*, 99(April 2019), 105365. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105365>
- Zhang, G., Que, Q., Pan, J., & Guo, J. (2008). Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 881(1-3), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.09.002>
- Zhang, H., Yu, D., Sun, J., Guo, H., Ding, Q., Liu, R., & Ren, F. (2014). Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1058(1), 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.009>
- Zhang, Q., Cheng, Z., Wang, Y., & Fu, L. (2021). Dietary protein-phenolic interactions:

- characterization, biochemical-physiological consequences, and potential food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(21), 3589-3615. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1803199>
- Zhang, T., Hu, Z., Cheng, Y., Xu, H., Velickovic, T. C., He, K., Sun, F., He, Z., Liu, Z., & Wu, X. (2020). Changes in Allergenicity of Ovalbumin in Vitro and in Vivo on Conjugation with Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(13), 4027-4035. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00461>
- Zhang, Y., He, S., & Simpson, B. K. (2018). Enzymes in food bioprocessing – novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*, 19, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007>
- Zhu, J., Sun, X., Wang, S., Xu, Y., & Wang, D. (2017). Formation of nanocomplexes comprising whey proteins and fucoxanthin: Characterization, spectroscopic analysis, and molecular docking. *Food Hydrocolloids*, 63, 391-403. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.027>
- Živković, J., Barreira, J. C. M., Stojković, D., Čebović, T., Santos-Buelga, C., Maksimović, Z., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Phenolic profile, antibacterial, antimutagenic and antitumour evaluation of *Veronica urticifolia* Jacq. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.024>



# ANEXOS

## Anexo A - Gráficos de Stern-Volmer e Lineweaver-Burk

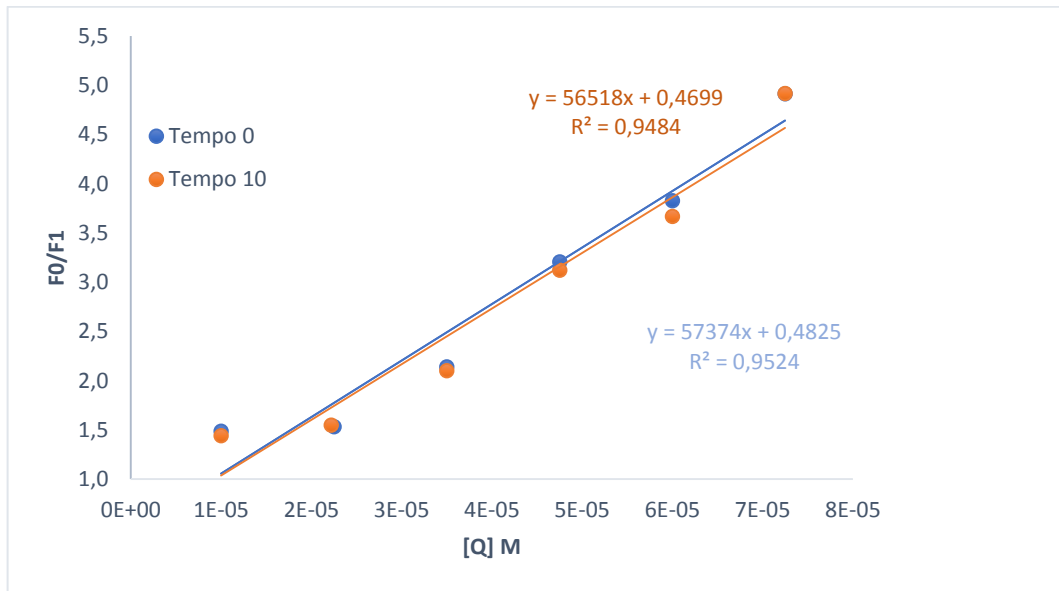


Figura A 1 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência do Cas por AC, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

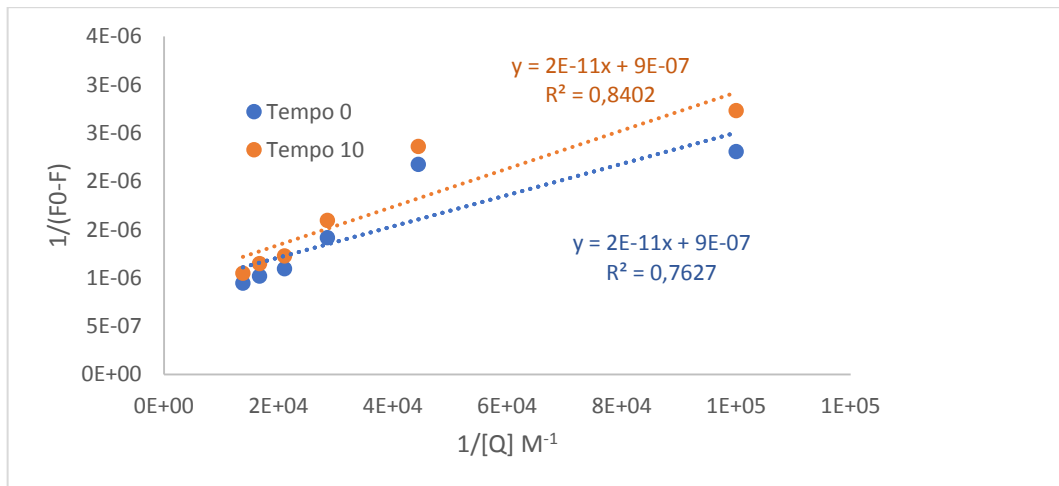


Figura A 2 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AC, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

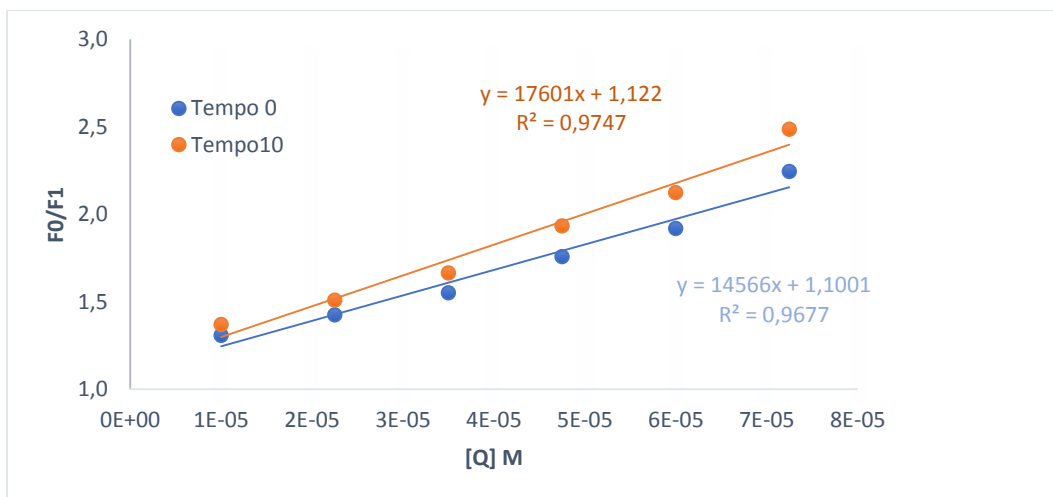


Figura A 3 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por AG, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

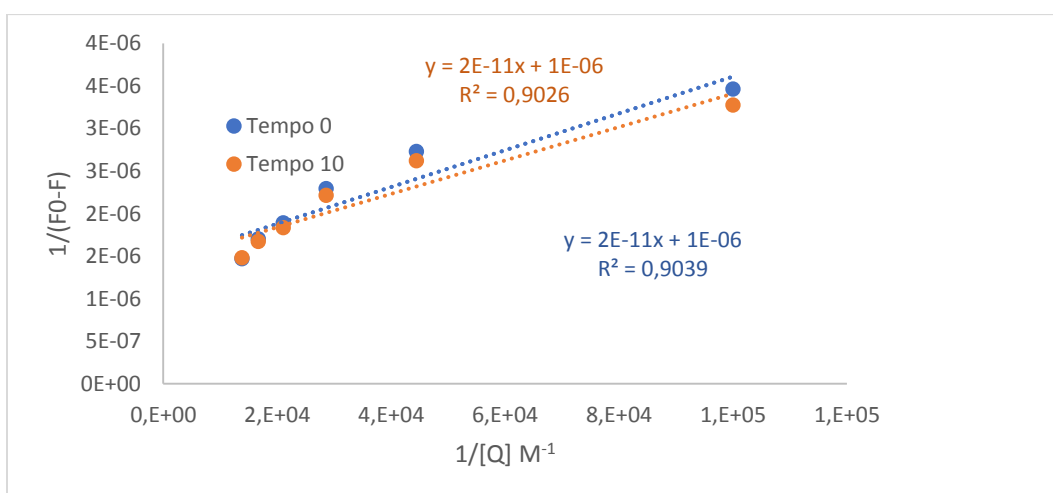


Figura A 4 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AG, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

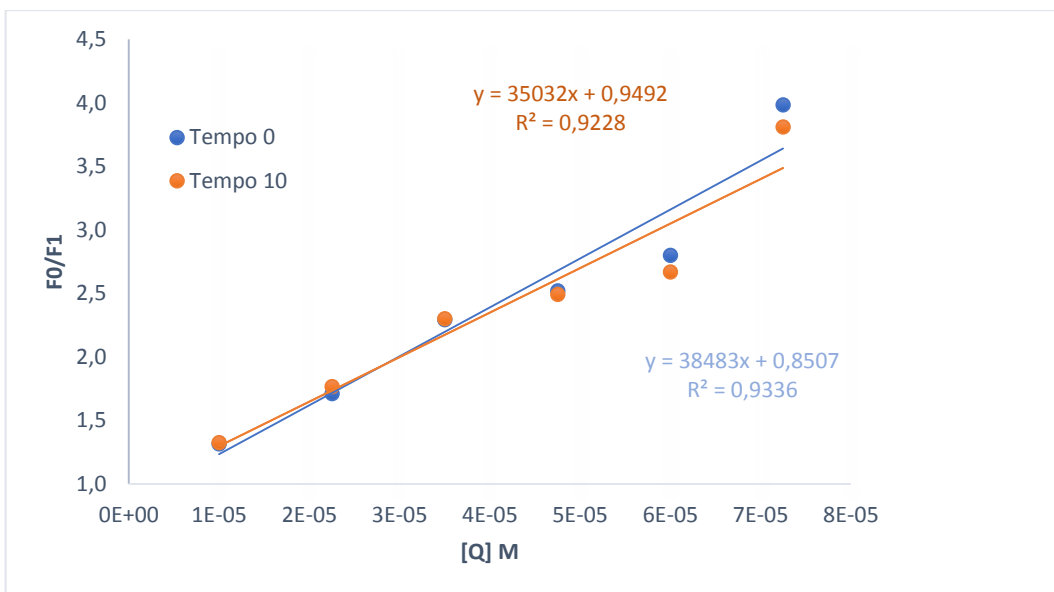


Figura A 5 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por AF, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

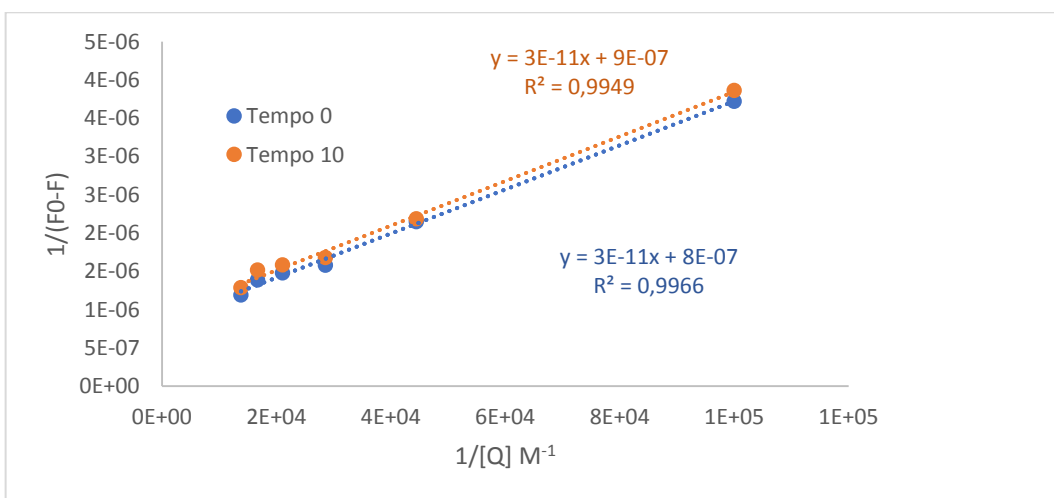


Figura A 6 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AF, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

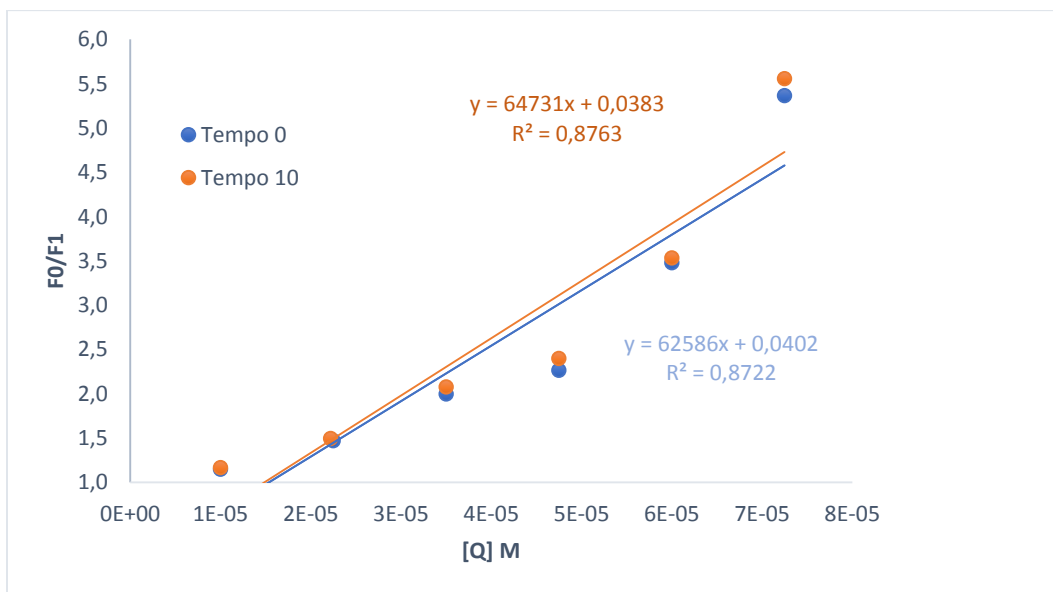


Figura A 7 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por ACL, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

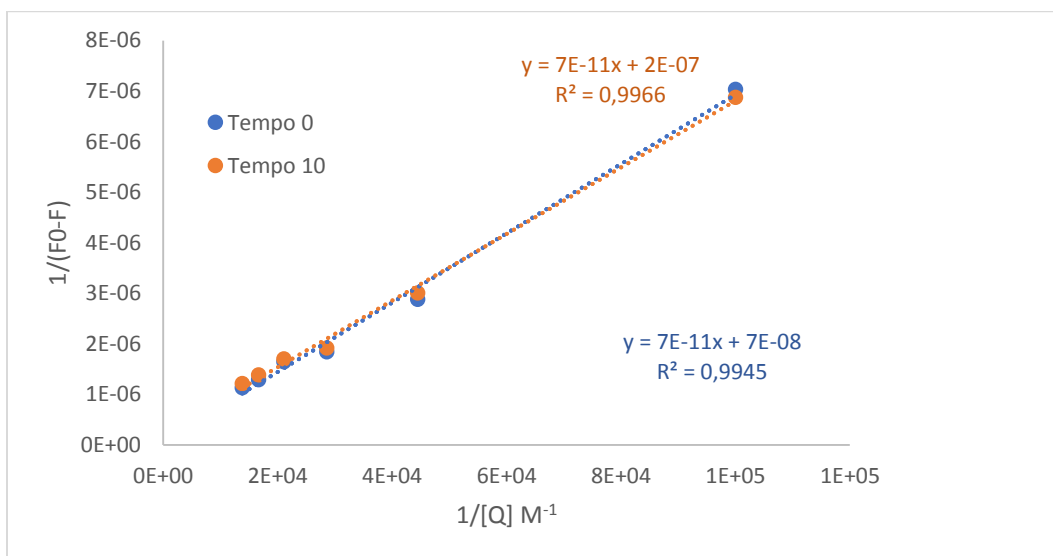


Figura A 8 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais ACL, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

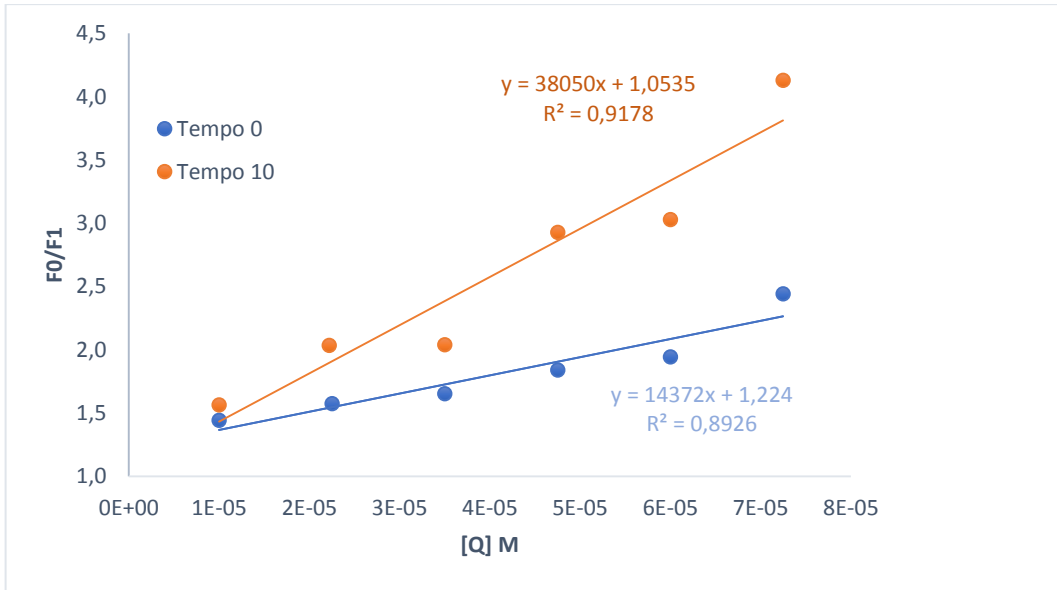


Figura A 9 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por QR, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

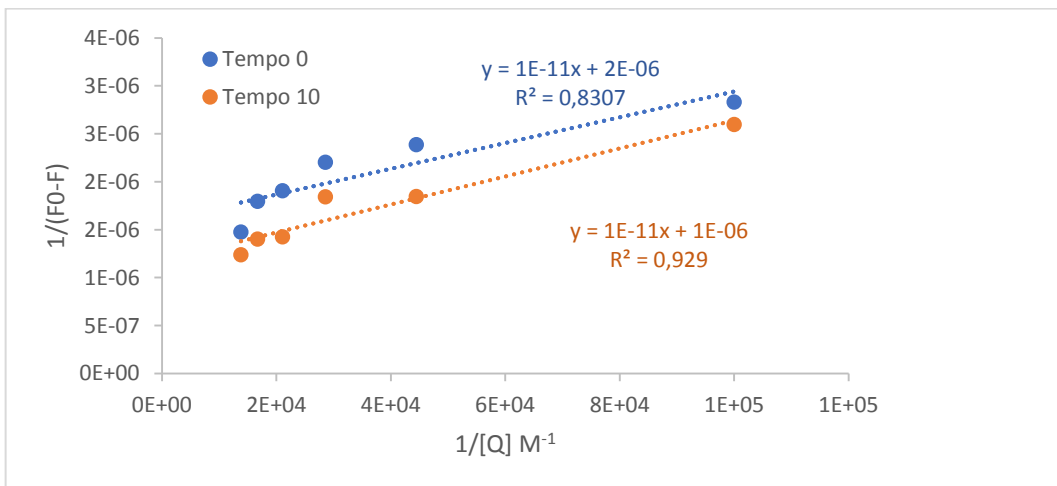


Figura A 10 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais QR, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

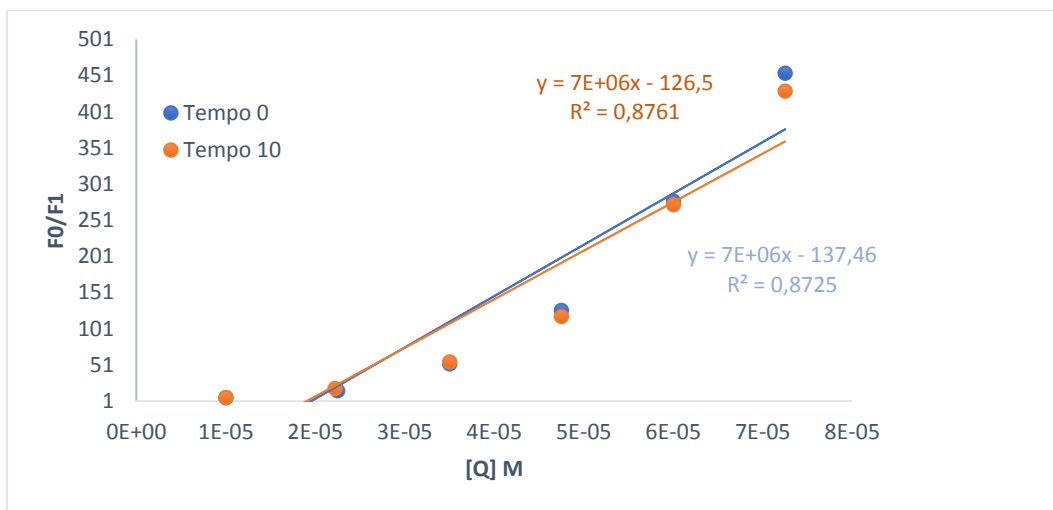


Figura A 11 - Gráfico de Stern-Volmer para a extinção de Cas por AT, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.

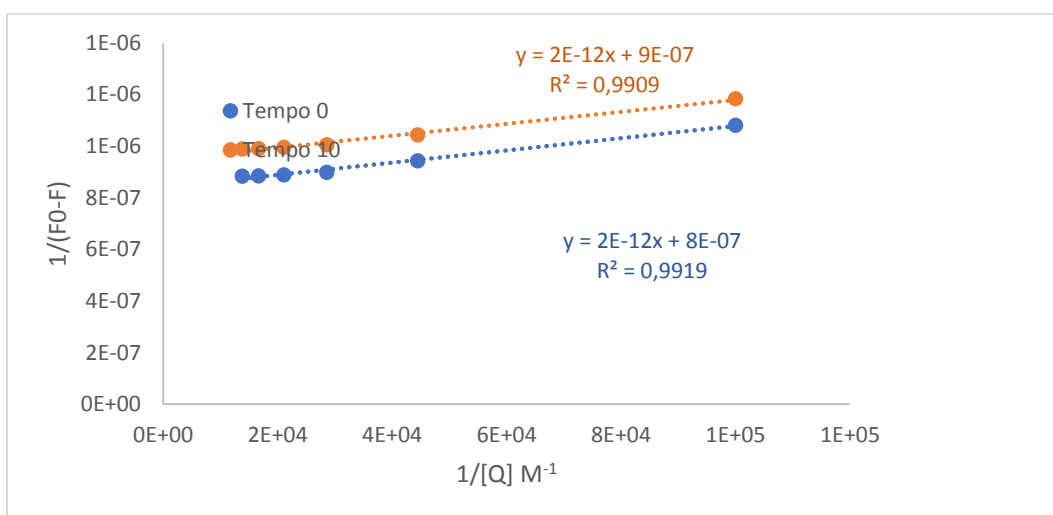


Figura A 12 - Gráfico de Lineweaver-Burk de Cas mais AT, ao tempo 0 e 10 minutos, à temperatura de 37°C.