

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

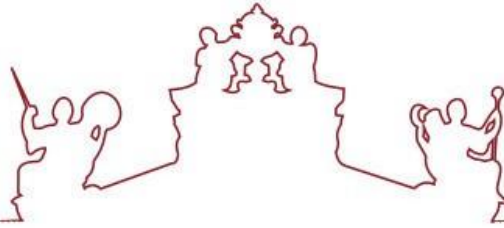
**Comparação do Proteoma Salivar entre Caucasianos  
(Portugueses) e Africanos (Cabo-Verdianos):  
Influência dos Hábitos Alimentares**

Nádia Filipa de Carvalho Correia

Orientador(es) | Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy  
Pedro Moreira  
Fernando Capela e Silva

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

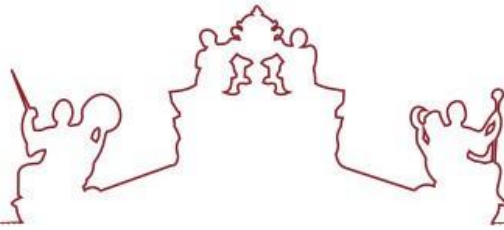
**Comparação do Proteoma Salivar entre Caucasianos  
(Portugueses) e Africanos (Cabo-Verdianos):  
Influência dos Hábitos Alimentares**

Nádia Filipa de Carvalho Correia

Orientador(es) | Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy  
Pedro Moreira  
Fernando Capela e Silva

Évora 2020





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora)
- Vogal | Célia M. Antunes (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Fernando Capela e Silva (Universidade de Évora)

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pois sem Ele nada teria conseguido, pois foi Ele quem planeou todos os meus caminhos e cuidou de todos eles para que eu chegasse até aqui;

Tenho uma especial gratidão pela universidade de Évora pelo seu acolhimento e ensino disponibilizado em favor de uma melhoria comum;

Agradeço de forma especial os meus orientadores, à Doutora Elsa Lamy e ao Doutor Fernando Capela, pelo trabalho que se disponibilizaram em realizar comigo, mas também pela atenção e carinho, agradeço ao Professor Doutor Pedro Moreira, da Universidade do Porto, por ter aceite participar na orientação deste trabalho e por todo o apoio com os Questionários de Frequência Alimentar.

Às minhas colegas do laboratório pela amizade, pelo trabalho em equipa e pela ajuda que foi indispensável para a realização desse trabalho;

Agradeço a todos os professores da universidade de Évora que foram compreensivos comigo e que me ajudaram a ganhar mais conhecimento;

Agradeço a todo e qualquer tipo de apoio que me foi dado durante esse tempo por amigos e familiares e pessoas que acabei por conhecer durante essa fase de luta, pois sem esses apoios nada conseguiria;

Às pessoas que desde os meus primeiros anos de estudo até então fizeram qualquer ação para me ajudar agradeço profundamente;

E para terminar tenho um agradecimento profundo e especial a minha querida mãe que é a razão da minha luta, da minha existência e do meu viver.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>iv</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>v</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>vi</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. Problemática</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Fundamentos teóricos</b> .....	<b>3</b>
2.1. Proteoma salivar humano .....	3
2.1.1. $\alpha$ -amilase salivar .....	4
2.2. Relevância da saliva como fonte de biomarcadores .....	5
2.3. Saliva e Genética .....	9
2.4. Fatores de variações na composição proteica da saliva .....	10
2.5. Saliva e alimentação .....	11
2.6. Hábitos Alimentares do povo Cabo-verdiano .....	12
2.7. Hábitos Alimentares dos Portugueses.....	13
<b>3. Métodos e técnicas utilizadas</b> .....	<b>14</b>
3.1. Participantes e recolha da saliva .....	14
3.2. Questionários para avaliação dos hábitos alimentares.....	15
3.3. Preparação das amostras de saliva .....	16
3.4. Quantificação em proteína total pelo método de Bradford .....	16
3.5. Taxa de secreção salivar das amostras.....	18
3.6. Determinação da atividade da amilase salivar.....	18
3.7. Comparação do Proteoma salivar .....	20
3.7.1. Concentração das amostras .....	20
3.7.2. Focagem isoeletrica .....	20
3.7.3. Segunda dimensão (SDS PAGE).....	21
3.7.4. Análise dos géis .....	22
3.8. Análise estatística .....	23
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>25</b>

4.1. Questionário de frequência alimentar .....	25
4.2. Recordatório alimentar no período de 24 horas (Anexo 2).....	29
4.3. Concentração em proteína total e taxa de secreção .....	31
4.4. Atividade da $\alpha$ -amilase salivar em amostras da saliva .....	33
4.5. Comparação de perfis salivares 2DE entre caucasianos e cabo-verdianos .....	34
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>42</b>
5.1. Estudos Futuros .....	43
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>44</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>52</b>
Anexo I .....	53
Anexo II .....	58
Anexo III .....	59
Anexo IV .....	60
Anexo V .....	62
Anexo VI .....	63
Anexo VII .....	64
Anexo VIII .....	68

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Três pares de glândulas salivares maiores.....	4
<b>Figura 2.</b> Ilustração da forma como se processa a troca de componentes entre sangue e saliva através da glândula salivar. ....	7
<b>Figura 3.</b> Resultados obtido da comparação do proteoma da saliva de coreanos face a uma lista com conjunto de proteínas pertencente a saliva humana. ....	9
<b>Figura 4.</b> Esquema da placa utilizada para a determinação das concentrações de proteínas pelo método de Bradford.....	17
<b>Figura 5.</b> Esquema da placa utilizada para a determinação da atividade da amílase salivar (adaptado das indicações do fabricante - Salimetrics).....	18
<b>Figura 6.</b> Imagem do gel 2D a ser retificado manualmente pelo software ImageMaster Platinum v.7.....	23
<b>Figura 7.</b> Imagens de alimentos típicos de Cabo verde. ....	27
<b>Figura 8.</b> Exemplo da curva da absorvância da concentração padrão. ....	31
<b>Figura 9.</b> Gráfico da comparação da média da concentração proteica das amostras relativamente aos dois grupos. ....	32
<b>Figura 10.</b> Gráfico da comparação da atividade da $\alpha$ -amílase salivar entre caucasianos e cabo-verdianos, resultados expressos em U/mL. ....	33
<b>Figura 11.</b> Exemplar dos géis de cada grupo com clara diferença de expressão de alguns spots. ....	34
<b>Figura 12.</b> Análise de componentes principais e a respetiva percentagem de variabilidade entre os grupos.....	35
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica da separação encontrada entre os grupos pela análise da PLS-DA. ....	35
<b>Figura 14.</b> Representação das variáveis mais significantes na diferenciação entre os grupos e a respetiva intensidade. ....	36
<b>Figura 15.</b> Imagem de um gel 2D que mostra a região da PRP.....	40

# Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Potenciais biomarcadores salivares referidos para diferentes patologias.. .....	8
<b>Tabela 2.</b> Diferentes diluições das amostras da saliva para a determinação da concentração proteica.....	17
<b>Tabela 3.</b> Equação usada para cálculos da atividade da $\alpha$ -amilase salivar, e a respetiva legenda.. .....	19
<b>Tabela 4.</b> Alimentos com diferenças significativas no consumo estimado entre os dois grupos em estudos (média +/- desvio padrão) g/pessoa/dia.....	25
<b>Tabela 5.</b> Alimentos com diferenças significativos de consumo estimado para os caucasianos (média +/- desvio padrão) g/pessoa/dia.....	26
<b>Tabela 6.</b> Nutrientes com diferenças significativos de consumo para os cabo-verdianos (média +/- desvio padrão) g/pessoa/dia. ....	28
<b>Tabela 7.</b> Número do spot e as proteínas correspondentes a esses spots, assim como a indicação do sentido de variação, em cabo-verdianos, comparativamente a caucasianos (média+/- desvio padrão).. .....	36



# Abreviaturas

- **2DE**: bidimensional;
- **DTT**: ditioneitol;
- **Ig**: Imunoglobulinas;
- **IgA**: Imunoglobulina A
- **OMS**: Organização Mundial da saúde;
- **PCA**: Análise de componentes principais;
- **PIP**: Proteína induzida por prolactina;
- **PLS-DA**: Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*Partial least square-discriminant analysis*);
- **PRP**: Proteínas ricas em prolina;
- **QFA**: Questionário de Frequência Alimentar;
- **VIP**: Importancia da variável em projeção (*Variable importance in projection*);

# Resumo

As proteínas salivares são reconhecidas pelo seu potencial como biomarcadores de diversas patologias, mas os seus níveis podem sofrer alterações com diversos fatores. A genética pode ter influência no proteoma salivar, apesar deste ser um assunto pouco explorado. Nesse sentido o propósito deste estudo é comparar o proteoma salivar de caucasianos com africanos, controlando para a sua alimentação, uma vez que esta poderá ser também um fator de variação. Técnicas de eletroforese bi-dimensional e determinação de atividade enzimática permitiram avaliar o proteoma salivar e Questionários de Frequência Alimentar e recordatórios das 24h anteriores, os hábitos alimentares. Foram observadas diferenças entre portugueses e cabo-verdianos, nos níveis de expressão de proteínas como imunoglobulinas e amilase, estando esta última aumentada nos cabo-verdianos. Apesar de todos os participantes terem acesso aos mesmos alimentos, os indivíduos africanos apresentam maiores consumo de doces e menor consumo de frutos, o que poderá justificar algumas das diferenças salivares.

Palavras chave: Proteoma salivar; hábitos alimentares; biomarcador.

# Abstract

## **Comparison of salivary proteome between caucasian (Portuguese) and african (Cabo-Verde): influence of dietary habits.**

The salivary proteins are recognized for their potential as pathology biomarkers. However, their levels change in response to various factors. Ethnicity may have influence in salivary proteomics, although this has not been explored so far. In this sense, the purpose of this study is to compare the salivary proteome of Caucasians with Africans, controlling for their diet, since this last can be a source of variation. Bi-dimensional electrophoresis and enzymatic activity were used to evaluate salivary proteome and food frequency questionnaires and previous 24-hours recalls were used to assess dietary habits. Differences between Portuguese and Cape Verdeans were observed in the expression levels of proteins such as immunoglobulins and amylase, with this last being increased in Cape Verdean individuals. Although all participants have access to the same food environment, African individuals consume higher amounts of sweets and lower amounts of fruits, what can explain some of the salivary differences.

Keywords: Salivary proteome; eating habits; biomarker

# 1. Problemática

A saliva corresponde ao fluido oral resultante da secreção das glândulas salivares, acrescido de moléculas provenientes do sangue, microorganismos orais e vários tipos celulares. Este fluido compreende, na sua composição, vários constituintes nomeadamente: água, eletrólitos, produtos nitrogenados, mucinas, lípidos, pequenos minerais, enzimas, imunoglobulinas, proteínas e entre outras moléculas, contendo ainda microorganismos. A saliva desempenha importantes funções como a lubrificação e proteção da cavidade oral, mantém a homeostasia e a integridade dos dentes, promove a mastigação, a deglutição, a digestão e a fala, e tem uma ação importante contra os microrganismos patogénicos (Humphrey & Williamson 2001; Cho et al. 2017). A saliva também serve como meio de diagnóstico de patologias ou processos fisiológicos, em função de variações nas quantidades de alguns dos seus constituintes. Destes últimos, as proteínas salivares são moléculas relevantes, sendo muito importante o seu estudo, identificação e caracterização.

A proteómica salivar é uma abordagem que permite obter informação acerca de um elevado número de proteínas, sendo muito utilizada na pesquisa de biomarcadores salivares. Diversas patologias como o carcinoma espinocelular, leucoplasia oral, doença do enxerto contra o hospedeiro (do inglês *graft-versus-host disease*), síndrome de Sjogren e outros distúrbios autoimunes, têm sido estudadas através do proteoma salivar (Castagnola et al. 2017).

No entanto, ao estudar o proteoma salivar há que ter presente que este fluido sofre alterações em resposta a uma grande diversidade de estímulos. Fatores como a hora do dia (ritmo circadiano), altura do ano (ritmo circannual), estado emocional e alimentação são alguns dos apontados como fazendo variar a composição proteica da saliva, pelo que devem ser tidos em conta aquando da análise deste fluido.

Anteriormente foram relatadas diferenças no proteoma salivar entre indivíduos de diferentes etnias no plasma humano, e recentemente estudos desenvolvidos a nível da saliva humana com indivíduos coreanos surgiram diferenças étnicas entre o proteoma da saliva dos coreanos e a lista atualizada de proteínas da saliva humana (Cho et al. 2017).

Tendo em conta as possíveis fontes de variação no proteoma salivar, e no sentido de poder usar o mesmo para aplicações que abrangem a maior parte da população possível, é necessário aumentar o conhecimento acerca de diferenças que possam existir entre essas diferentes populações.

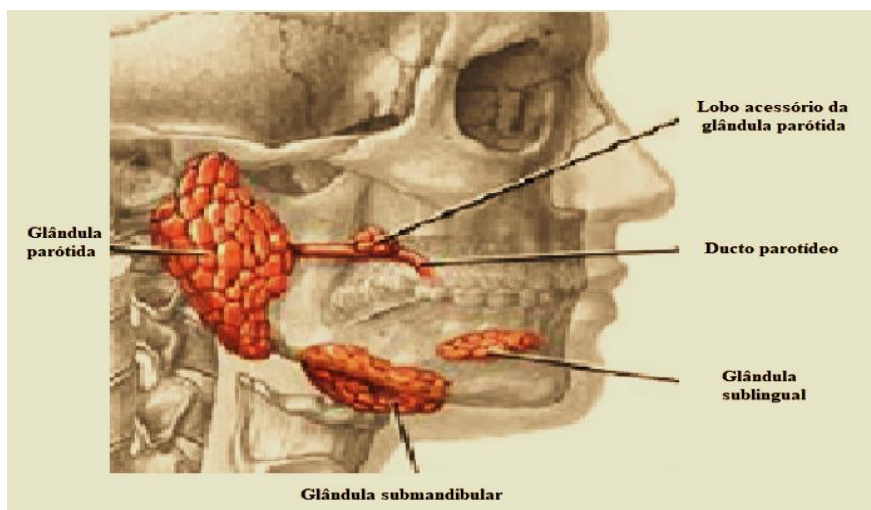
Neste sentido, este trabalho possui como objetivo geral fazer a análise comparativa do proteoma salivar de caucasianos (portugueses) e de africanos (cabo-verdianos), relacionando-o com possíveis variações nos seus hábitos alimentares. Os seus objetivos específicos, são: 1) comparar os perfis proteicos eletroforéticos bidimensionais entre os dois grupos; 2) fazer a comparação das frequências alimentares das duas populações; e 3) avaliar o consumo alimentar entre esses dois grupos a curto prazo por meio do recordatório das 24h.

## 2. Fundamentos teóricos

### 2.1. Proteoma salivar humano

Proteômica salivar refere-se ao nome dado ao estudo completo das proteínas existentes na saliva. Até ao momento, foram já detetadas/identificadas mais de 3000 proteínas salivares (Cho et al. 2017). As proteínas salivares são produzidas por glândulas salivares, existindo várias também provenientes do sangue e algumas de origem microbiana. As três glândulas salivares maiores são as glândulas parótidas, submandibular e sublinguais ((Castagnola et al. 2017); Figura 1). Para além destas, os mamíferos possuem ainda as chamadas glândulas salivares menores, as quais se encontram sob a forma de pequenas massas discretas em várias estruturas e regiões da cavidade oral (Holmberg & Hoffman 2014). De entre as glândulas salivares menores fazem parte as labiais e bucais, glossopalatinas, palatinas, e as linguais que se dividem em lingual anterior, lingual posterior mucosa, lingual posterior serosa (Tandon et al. 2013; Kessler e Bhatt 2018). As proteínas podem ainda ser provenientes de fontes não glandulares como o fluido crevicular gengival, secreções de natureza mucosa (Dsamou, et al. 2011). Microorganismos como bactérias, vírus e fungos também contribuem para a composição do proteoma salivar, assim como pequenos péptidos que são derivadas da proteólise existente na cavidade oral (Pappa, et al. 2018).

As células acinares das glândulas salivares contribuem com cerca de 85% das proteínas salivares enquanto as células do ducto glandular segregam proteínas com importantes funções biológicas para o organismo como por exemplo imunoglobulinas, fatores de crescimento, entre outras (Pappa, et al. 2018). Algumas das proteínas salivares são particularmente ricas em aminoácidos como a prolina (proteínas ricas em prolinas - PRP).



**Figura 1.** Três pares de glândulas salivares maiores. Adaptado de (Gabor 2016).

### 2.1.1. $\alpha$ -amilase salivar

A amilase salivar é uma das proteínas presentes em maior proporção na saliva estimulada. Produzida pelas células acinares epiteliais das glândulas salivares (especialmente as parótidas), a  $\alpha$ -amilase refere-se a um dos mais abundantes constituintes da saliva humana. Essa enzima corresponde a cerca de 40 a 50% da proteína total, e desempenha importantes funções nomeadamente na digestão do amido (altera a propriedade física do amido de forma instantâneo) pela hidrólise deste em maltotriose, maltose, e oligossacarídeos maiores. Esta proteína tem também funções antimicrobianas, impedindo a aderência bacteriana nas superfícies orais e permite a depuração bacteriana na boca (Arhakis et al. 2013; Sahu et al. 2013; Mandel et al. 2010).

Sendo o amido uma das principais fontes de carboidratos na dieta humana, a amilase salivar constituiu-se uma das primeiras enzimas a ser reconhecida (Butterworth et al. 2011).

Estima-se ainda que a  $\alpha$ -amilase salivar influencia a percepção do paladar e textura dos alimentos e por conseguinte as preferências alimentares. Este fato é relevante na medida em que modula a resposta sensorial aos constituintes alimentares na cavidade oral, o que conjuntamente com os fatores psicológicos e culturais conduz a motivações e escolhas alimentares diferenciadas (Tarragon et al. 2018). Contudo são necessários mais estudos

relacionados a essa área de investigação para comprovar esse conceito. Segundo Mandel et al. (2010) a associação entre a variação nos níveis da amilase salivar e a percepção do amido é de difícil revelação e além do mais a relação entre a variabilidade no número de cópias do gene AMY1 (gene que codifica a referida enzima, e influencia o número da amilase na saliva) e a percepção da viscosidade do amido terá sido pouco explorada. Há, no entanto, um trabalho recente que mostra que níveis diferentes de amilase estão relacionados com a percepção dos gostos doce e salgado de alimentos como o pão (Lamy et al. submetido).

## 2.2. Relevância da saliva como fonte de biomarcadores

O termo **biomarcador** diz respeito a moléculas biológicas que apresentam a possibilidade de serem quantificadas e servirem como indicadores das condições fisiológicas do organismo ou o seu estado de saúde (Devaraj 2013).

Um dos objetivos mais desejáveis nas pesquisas e para a melhoria dos cuidados da saúde é a detecção do início e da progressão das morbidades e a monitorização dos resultados terapêuticos pós tratamento por meio de uma abordagem não invasiva (Wong 2009). Quando se fala de métodos de diagnósticos não invasivo a saliva poderá ser uma boa opção, visto que o método para a sua recolha é simples, indolor, não causa muito desconforto aos pacientes, não carece de muita intervenção dos profissionais da saúde e é mais económica. Os procedimentos mais usados até agora para fins de diagnóstico como biópsias e recolhas de sangue de forma repetitiva, por serem um métodos invasivos e doloroso acabam por causar estresse nos pacientes especialmente quando as patologias são descobertas nos seus estágios iniciais e requerem muitas monitorizações (Yoshizawa et al. 2013).

Assim, há vários argumentos que sustentam os benefícios da utilização da saliva, comparativamente à utilização de sangue ou tecidos na pesquisa de biomarcadores para diagnóstico de patologias e doutras situações:

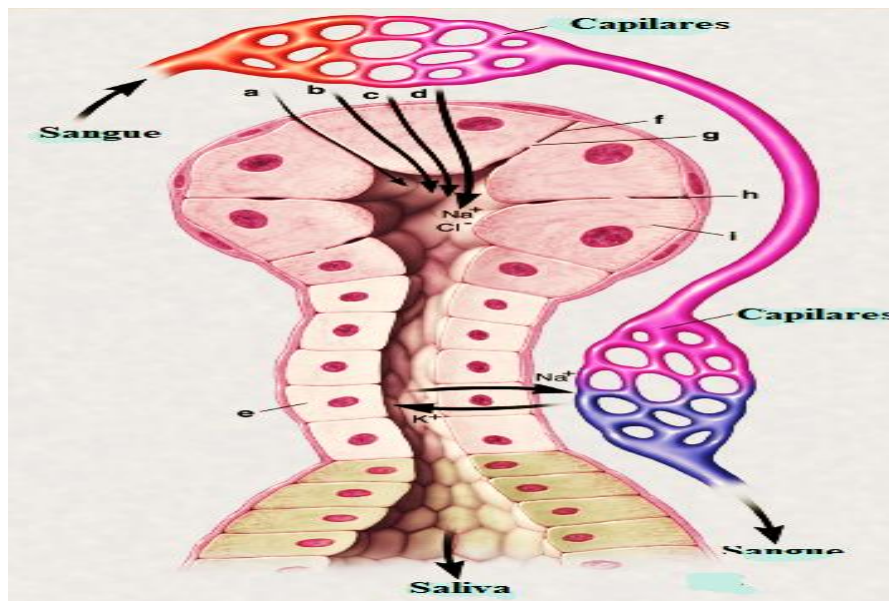
- Possibilidade da auto-recolha, sem a necessidade de um treino prévio, e com um processo de menor duração;



- É menos suscetível à adulteração por ser de fácil recolha;
- Por não causar desconforto (sendo indolor e não invasivo) torna-se um incentivo para as pessoas a participarem nas análises médicas de modo conveniente;
- A recolha e o manuseamento da amostra são seguros, pois o risco de transmissão de doenças é minimizada, sendo muito útil no caso das infeções virais e bacterianas;
- Caso da transmissão do HIV através da secreção salivar é insignificante até porque nela há fatores que inibem essa infecciosidade;
- Não requer muitas manipulações;
- É de fácil transporte e armazenamento;
- Economicamente traz menos custos tanto para os pacientes como para as instituições ligadas a cuidados de saúde (Yoshizawa et al. 2013).

Um dos motivos pelos quais o proteoma salivar humano apresenta potencial para o diagnóstico de doenças tem a ver com o facto de muitas das proteínas presentes serem proteínas presentes no sangue. Aproximadamente 27% das proteínas identificadas na saliva dos humanos são encontradas no plasma, (Cho et al. 2017), para além de muitas dessas proteínas se encontrarem na saliva de forma proporcional aos seus níveis no plasma.

Na Figura 2 pode observar-se a forma como ocorre a entrada dos constituintes do sangue (incluindo as proteínas) para a glândula salivar para se tornarem componentes da saliva. As glândulas salivares maiores são muito vascularizadas, o que facilita essa troca de componentes (Yoshizawa et al. 2013; Jasim et al. 2018).



**Figura 2.** Ilustração da forma como se processa a troca de componentes entre sangue e saliva através da glândula salivar. Adaptado de (Yoshizawa et al. 2013).

Diferentes estudos mostram o potencial da saliva como fonte de biomarcadores de diversas doenças. Por exemplo, foram observadas diferenças nos perfis proteicos salivares entre crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 bem controlado, com mau controle da diabetes tipo 1 com crianças e adolescentes saudáveis (Pappa et al. 2018). De acordo com os autores, estas diferenças refletem as alterações que ocorrem a nível da doença.

Nos últimos vinte anos a utilização da saliva como meio de diagnóstico precoce de cancro, especialmente nas regiões orofaríngeas e cavidades orais, tem atraído muito o interesse dos investigadores. Alguns estudos referem mais de cem potenciais biomarcadores salivares para a deteção do carcinoma oral de células escamosas (Cheng et al. 2014). Além dos referidos, a saliva possui componentes que podem servir de biomarcadores para outras patologias conforme indicado na tabela que se segue:

**Tabela 1.** Potenciais biomarcadores salivares referidos para diferentes patologias (Adaptado de Yin Ai et al. 2017).

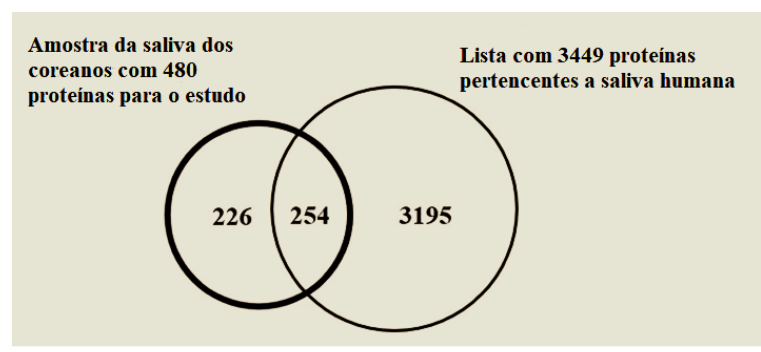
PATOLOGIAS	BIOMARCADORES
Doenças periodontais	$\beta$ -Glucoromidase; Proteína C reativa (PCR); Interleucina (IL); Metaloproteinases (MMP); Óxido nítrico
Doenças autoimunes	Cloreto de sódio (NaCl); Imunoglobulina A (IgA); Imunoglobulina G (IgG); Lactoferrina; Mediadores de inflamação (Interleucina 6; Prostaglandinas-PGE2; Tromboxanes-TXB2)
Doenças vasculares	Proteínas C reativas; Mioglobina; Creatinina quinase; Troponinas cardíacas; Mieloperoxidases
Fibrose cística	Cálcio; Fosfato; Ureia, Ácido úrico, PGE2
Diabetes mellitus (2)	IgA; Peroxidase salivar; Glicose, Potássio; Amilase e proteína total, Albumina
Doença renal	Cortisol; Nitrito; Ácido úrico; Sódio Cloreto; Amilase; Lactoferrina; Fosfato
Infeções virais	Imunoglobulina A; Imunoglobulina M (IgM); Antígeno P24
Infeções bacterianas	Anticorpos e Microorganismos

No que diz respeito ao stress, a saliva tem sido grandemente usada para diagnóstico. Este fluido possui marcadores que se elevam perante o stress, designadamente  $\alpha$ -amilase, cortisol, e Cromogranina A (Ivkovic & Racic 2015). A saliva ainda pode servir como um meio de monitorização para diversos tipos de drogas (Ooi Yin Ai, Priyanka, & Gokulraj, 2017).

## 2.3. Saliva e Genética

A possibilidade de existirem diferenças entre o proteoma salivar dos indivíduos pertencentes a populações diferentes não é de excluir, apesar de haver pouca informação na literatura disponível a esse respeito. No entanto, alguns estudos mostraram diferenças existentes nas proteínas a nível do plasma pertencentes a indivíduos de etnias distintas (Nedelkov et al. 2005; Herman e Cohen 2012; Choo et al. 2017).

As diferenças nas proteínas a nível do plasma motivaram a realização de um estudo feito por Choo et al. 2017, onde os pesquisadores participantes determinaram diferenças étnicas no proteoma da saliva humana. O resultado que obtiveram foi que das 480 proteínas consideradas da parte dos coreanos para o estudo, 226 não constaram na lista atualizada de proteínas da saliva humana. Na figura 3 consegue-se compreender melhor o resultado então obtido.



**Figura 3.** Resultados obtido da comparação do proteoma da saliva de coreanos face a uma lista com conjunto de proteínas pertencente a saliva humana. Adaptado de Choo et al 2017.

Experiências semelhantes foram realizadas para algumas espécies de animais. Segundo Lucena et al. 2018, diferentes raças caninas (Beagles, Podengos portugueses, Galgo e Rafeiro Alentejano) apresentam diferenças significativas entre-si a nível do proteoma salivar.

Outros trabalhos realizados já abordaram as questões de diferenças na saliva pertencentes a indivíduos de populações diferentes, relativamente a outros constituintes. Hajat e colaboradores (Hajat et al 2010) concluíram que o cortisol salivar (de saliva recolhida em diferentes horários ao longo do dia) apresenta níveis diferentes entre os grupos de estudos

analisados (negros, brancos e hispânicos). Verificou-se nesse estudo que os hispânicos e negros têm níveis de cortisol mais baixos ao despertar, do que brancos, mas apresentam um declínio mais lento ao longo do dia, sobretudo nas primeiras horas, tendo nos finais do dia declínio muito pequeno e mais acentuada para os hispânicos.

A variação na composição da saliva, entre indivíduos de populações diferentes também se observa em estudos acerca do microbioma oral. Estudos para a classificação do microbioma humano de indivíduos saudáveis mostram-se controversos em termos de resultados e um dos motivos para essa controvérsia é o fato da grande diversidade do microbioma, observada na saliva, se dever a divergência entre indivíduos de populações diferentes. De facto, foram analisados microbiomas salivares pertencentes a indivíduos de populações geneticamente diferentes (Alasca, Alemanha, Africa) e as amostras expressaram diferenças significativas entre si, ainda que se tenha identificado também um microbioma que é comum a todas estas populações (Gupta et al. 2017).

## 2.4. Fatores de variações na composição proteica da saliva

O proteoma salivar humano pode ser afetado por diversos fatores podendo ser além da genética também a idade, o sexo, o ritmo circadiano, variabilidade inter-individual, condições patológicas, nível de estresse (Castagnola et al. 2012; Lucena et al. 2018).

Segundo Brandão et al. 2014, a flutuação de várias variáveis salivares ao longo do dia é influenciada pelo ritmo circadiano. Nomeadamente, proteínas salivares específicas e péptidos, em que a quantidade da proteína na saliva tem o seu pico máximo no período das 14 horas. Em relação à influência da ingestão de alimentos, pela experiencia realizada, notou-se que os níveis de proteínas salivares são substancialmente maiores após a ingestão de alimento do que quando em jejum.

## 2.5. Saliva e alimentação

A saliva e a alimentação estão intrinsecamente ligadas entre si, por vários motivos. Por um lado, a saliva é conhecida pela função que desempenha no processo da alimentação nomeadamente através da sua participação na deglutição e na perceção sensorial, influenciando a escolha dos alimentos. Também interage com os constituintes dos alimentos, podendo afetar o seu acesso aos locais de receção do estímulo, ou mesmo a sua estrutura (Mosca et al. 2019). Por outro lado, a saliva dos indivíduos é afetada por parte daquilo que é ingerido. Por exemplo, segundo Tomeckova e colegas (Tomeckova et al. 2017), no caso de uma ingestão insuficiente de água, a quantidade de saliva produzida diminui, já que a mesma é formada em grande parte por água. Também no que diz respeito à ingestão de alimentos/nutrientes, há estudos que apontam para variações na composição da saliva: Mandel et al. 2010 referiram variações no número de cópias do gene AMY (que codifica para a proteína amilase salivar) entre populações com diferentes níveis de amido habitualmente presente nas dietas.

Também um estudo realizado com indivíduos adultos teve como objetivo estimar a associação entre a composição da saliva e os nutrientes ingeridos. O resultado desse estudo revelou associação positiva entre a capacidade antioxidante total da saliva e a ingestão de carboidratos simples, ainda que essa associação não tenha sido observada no caso dos carboidratos complexos. Para além disso, a capacidade amilolítica apresentou correlação com o consumo total e a ingestão de carboidratos simples (Méjean, et al. 2015). Estudos recentes têm vindo a reforçar esta associação entre a composição proteica da saliva e o consumo de diferentes alimentos. Em termos de hábitos alimentares (longo prazo) foi observado que proteínas como as cistatinas, por exemplo, estão associadas a um maior consumo de vinho (Lima 2019). De modo semelhante, foi observado que há efeitos de curto prazo, influenciados pela alimentação, com proteínas que variam de forma semelhante após o consumo de diferentes alimentos (por exemplo, decréscimo nos níveis de imunoglobulinas) e algumas outras cuja variação ocorre em resposta específica a um alimento particular (por exemplo o aumento de cistatinas em resposta a alimentos ricos em polifenóis) (Lamy et al. dados não publicados).

## 2.6. Hábitos Alimentares do povo Cabo-verdiano

Sendo os hábitos alimentares um fator com relevância em termos de composição proteica da saliva, é de interesse conhecer os hábitos alimentares de uma população, antes de poder atribuir a responsabilidade pelas variações na saliva dessa população aos genes ou à alimentação.

Os hábitos alimentares de um determinado povo são definidos por razões como a geografia e o clima respeitantes ao país, de onde têm origem produtos típicos do território, conjuntamente com as tendências para a adequação aos produtos correspondentes a outros povos (Caiado et al. 2012).

Seguindo a mesma linha do raciocínio o sistema alimentar do povo cabo-verdiano é influenciado por diversos fatores que estão intrinsecamente ligados ao território nomeadamente o fato do país apresentar baixa renda económica, condições climáticas pouco propícias para a prática da agricultura bem como uma área limitada de terreno que pode ser usado para as práticas agrícolas (terreno arável). Só aproximadamente 10% do território nacional são usados para esse propósito e as chuvas são irregulares. Tais condições fazem com que os hábitos alimentares da população comecem a seguir as tendências das dietas “globais”, começando a ser introduzidos hábitos mais ocidentalizados, dada a elevada importação de alimentos dos países desenvolvidos (Cabral et al. 2019). Ainda assim, o consumo de “fast food” é pouco frequente (Cabral et al. 2019). O país em si tem uma fraca capacidade de produção e obtenção dos alimentos primários.

De uma maneira mais ampla, a nível da alimentação, o país pode ser classificado como predisposto a mudanças nutricionais, devido às razões mencionadas anteriormente, sendo a principal a elevada importação de que o país precisa como forma de dar respostas as necessidades nutricionais da população. Segundo Cabral et al. (2015), Cabo Verde sofre de alguma forma com as questões de mudanças nutricionais. Neste estudo foram comparados os principais alimentos consumidos no país entre os anos 1989 e 2009 e foi notado um aumento do acesso aos doces e açúcares, gorduras, óleos vegetais, bebidas alcoólicas. Segundo este estudo, o país também sofre de algum modo com as questões da exportação, pois um país arquipelágico como é o caso de Cabo Verde e, portanto, com

ampla disponibilidade de área piscatória tem sido menos provido em peixes, comparativamente à disponibilidade da carne. Ainda por se tratar de um país em desenvolvimento e em processos de urbanização como referido por Craveiro et al. 2016, a transição nutricional ocorre devido ao acesso facilitado a alimentos a baixos preços e baixa qualidade nutricional que corresponde justamente a esses alimentos que são ricos em carboidratos complexos gordura, açúcar e colesterol.

Relativamente à alimentação tradicional do país, muito amplamente utilizada antigamente, mas que ainda hoje faz parte da alimentação, o milho é um alimento básico. Este tem servido como base para a elaboração de pratos como a cachupa, cuscuz, cherém, camoca, totoco, entre outros; outros alimentos comuns incluem o arroz, feijoadas, peixes, mandiocas e batatas. Fazem parte das bebidas tradicionais confeccionadas no país o ponque, a aguardente de cana de açúcar, embora hoje em dia já sejam usados outros produtos para a produção desta bebida como a banana. Segundo Cabral et al. 2019 os alimentos mais consumidos são pão, açúcar, óleos, azeite, leite, banana madura, peixes.

## 2.7. Hábitos Alimentares dos Portugueses

A gastronomia portuguesa possui um valor inestimável para a cultura do país e, apesar das suas especificidades regionais, os alimentos típicos portugueses consistem em queijos, sobremesas tradicionais como arroz doce, leite-creme, rabanadas, os peixes (sardinhas, bacalhau), carnes de aves e carnes vermelhas, vinhos e azeite como principal fonte de gordura adicionada. A alimentação portuguesa conta com influências da Dieta Mediterrânica, sendo esta última baseada num consumo elevado de vegetais e frutas, nozes e leguminosas. (Araújo 2014). Apesar do país não se situar na bacia do mediterrâneo esse tipo de dieta constitui um património cultural que fora estabelecido na população pela influência dos ancestrais dos vizinhos do mediterrâneo e especificidades dos emigrantes, e a ampla costa atlântica aumenta a disponibilidades dos peixes (Da Silva & Pinto 2016). Diversos produtos alimentícios foram incutidos na dieta portuguesa devido as descobertas no passado de várias rotas do comércio como é o exemplo das batatas, arroz, milho, condimentos, certos frutos (Caiado 2012).



Apesar de Portugal ser referido como um bom exemplo da prática da dieta mediterrânea pois a sua lista dietética é rica em vegetais, frutas, peixes e azeite, a verdade é que os hábitos alimentares que se observam hoje em Portugal incluem um nível considerável de alimentos característicos de dietas industrializadas (Vilela et al. 2014). Este afastamento do padrão de Dieta Mediterrânica também se caracteriza pelo aumento na ingestão de sódio, bebidas alcoólicas, tendo a cerveja um consumo acrescido em face ao consumo de vinho (Vieira et al. 2013).

## 3. Métodos e técnicas utilizadas

### 3.1. Participantes e recolha da saliva

Para a análise e comparação do proteoma salivar entre os dois grupos, utilizou-se como amostra um total de 88 indivíduos (alunos da universidade de Évora) com idades compreendidas entre os 18 a 40 anos, sendo 32 de origem cabo-verdiana (16 masculinos e 14 femininos) com a idade entre os 18 a 38. E 56 de origem portuguesa (38 masculinos e 18 femininos) com a idade entre os 18 a 30. Como fatores de exclusão foram considerados a presença de doenças orais evidentes e de trato respiratórios bem como patologias de ordem metabólicas reportadas (ex. diabetes, hipotireoidismo). A recolha decorreu no período entre as dez às doze horas, em 4 dias diferentes na sala 068 do colégio Luís Verney, em grupos de 10 a 15 pessoas.

Foi solicitado aos participantes que se abstivessem de comer ou beber qualquer bebida que não água no período de pelo menos 1 hora antes das recolhas. Para a recolha foi pedido aos participantes que bochechassem com um pouco de água (com o objetivo de limpar a cavidade oral) e aguardassem 30 segundos, seguindo-se a recolha, sem estimulação, num período de cinco minutos. Os participantes deixavam acumular a saliva produzida na boca, vertendo-a para dentro de um tubo de *falcon*, de cada vez que sentiam necessidade. Durante o período de recolha foi pedido que se mantivessem tranquilos e sem falar. Imediatamente após a recolha, os tubos foram colocados em gelo e transportados para um congelador a  $-28^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram armazenados até análise laboratorial.

## 3.2. Questionários para avaliação dos hábitos alimentares

Uma vez que a saliva também é influenciada pelos hábitos alimentares, para além da sua recolha, fez-se também a recolha das informações a respeito dos hábitos alimentares de cada participante. Para isso usou-se um questionário de frequência alimentar (QFA), validado para a população portuguesa (Lopes 2000) e que se observou conter alimentos conhecidos pela população cabo-verdiana, sendo assim adequado para a mesma (Anexo I). O QFA é constituído por 86 itens alimentares, para além de um campo para referir outros alimentos habitualmente consumidos, para além desses. O QFA diz respeito à frequência de consumo, tendo em conta o espaço temporal de 1 ano. Para além do QFA, e de modo a ter informação do consumo recente, foi aplicado um recordatório relativo ao consumo alimentar nas últimas 24 horas (Anexo II).

Os dados obtidos através dos QFA aplicados foram inseridos numa base de dados Access, para posterior tratamento através de software próprio (Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto). Obteve-se uma tabela com as quantidades médias diárias de consumo estimado, para cada um dos itens alimentares constantes, assim como as quantidades correspondentes de macro e micro-nutrientes de consumo estimado. Todavia essa comparação relativamente ao consumo de vários grupos de alimentos possui algumas limitações, pois é apenas com valores em bruto, não tendo sido realizado ajuste para variáveis que podem ter impacto na quantidade de alimentos ingeridos, como o consumo de energia, sexo, idade, massa corporal, estrato socio-económico, e atividade física de cada indivíduo.

No que diz respeito aos recordatórios das 24h anteriores, os dados de alimentos e quantidades de consumo estimado foram lançados numa tabela excel. A análise destes questionários foi feita apenas de forma qualitativa, no sentido de procurar eventuais diferenças nos tipos de alimentos consumidos, nomeadamente particularidades de cada etnia. Este estudo teve a aprovação da comitê de Ética em pesquisa, e todos os participantes assinaram um consentimento informado (Anexo III)

### 3.3. Preparação das amostras de saliva

Para a realização de qualquer análise às amostras de saliva foi necessário proceder à limpeza das amostras, nomeadamente pela eliminação de mucinas da cavidade oral e/ou células e partículas sólidas. As amostras foram então descongeladas (mantidas ao gelo). Cada tubo foi pesado e de seguida centrifugado com refrigeração (centrífuga – Hermle 323k, Agro 226) a uma rotação de 13000 g durante 30 minutos à temperatura de 4°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante de cada tubo foi retirado e aliquotado para diferentes tubos de 1,5mL (eppendorf), os quais foram posteriormente armazenados à temperatura de -28°C.

### 3.4. Quantificação em proteína total pelo método de Bradford

O método de Bradford é utilizado para a quantificação proteica em diversos laboratórios, dadas as vantagens de ser de fácil utilização, sensível, rápido, estável, sofrer poucas interferências de outras substâncias, económico, e compatível com agentes redutores (Nouroosi et al. 2015; Lemos et al. 2017). Este método é baseado na ligação do corante azul de Coomassie brilhante G-250 (CBBG) às proteínas, sendo capaz de detetar concentrações de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Nouroosi et al. 2015). Trata-se de um método colorimétrico onde a cor castanha do reagente se transforma em azul na presença de proteínas pelo que a tonalidade depende das concentração proteica em uma dada amostra.

A quantificação de proteínas por esse método consistiu na preparação de uma curva padrão de BSA (albumina do soro bovino), usando soluções com diferentes concentrações (25, 50, 75, 100, 150 e 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ).

Tendo em conta que o método de Bradford se mostrou linear apenas até concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , e tendo em conta a variação que existe na concentração proteica de diferentes amostras de saliva, as amostras tiveram que ser diluídas. As amostras foram diluídas, sempre a partir da amostra original (tabela 2). A diluição foi feita em água ultrapura, uma vez que esta foi a água usada para preparar os padrões de BSA.

**Tabela 2.** Diferentes diluições das amostras da saliva para a determinação da concentração proteica.

Diluições	Quantidade da amostra (µL)	Quantidade da água ultrapura (µL)
4 vezes	10	30
8 vezes	5	35
12 vezes	5	55

Numa placa de 96 poços foram adicionados 10µL de água ultrapura em triplicado, de modo a constituir o branco; do mesmo modo foram adicionados 10 µL das soluções padrão (todas em triplicado) e 10 µL das diferentes amostras diluídas. Seguidamente acrescentou-se 200µL da solução do reagente Bradford em cada poço da placa. A figura 4 é uma representação esquemática do que foi referido anteriormente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	Amostra 1 4x	Amostra 1 4x	Amostra 1 4x						
B	25	25	25	Amostra 1 8x	Amostra 1 8x	Amostra 1 8x						
C	50	50	50	Amostra 1 12x	Amostra 1 12x	Amostra 1 12x						
D	75	75	75	Amostra 2 4x	Amostra 2 4x	Amostra 2 4x						
E	100	100	100	Amostra 2 8x	Amostra 2 8x	Amostra 2 8x						
F	150	150	150	Amostra 2 12x	Amostra 2 12x	Amostra 2 12x						
G	200	200	200									
H												

**Figura 4.** Esquema da placa utilizada para a determinação das concentrações de proteínas pelo método de Bradford.

Os valores de absorvância foram lidos através da utilização de um leitor de microplacas (Glomax promega) a 600nm. O cálculo das concentrações das amostras foi feito através da reta obtida com as concentrações padrão de BSA. A partir da equação da reta ( $y = mx + b$ ), considerando o (y) como a absorvância e o (x) como a concentração, calculou-se a concentração proteica final para cada amostra de saliva. Subsequentemente multiplicou-se o valor obtido pelo fator de diluição.

### 3.5. Taxa de secreção salivar das amostras

A taxa de secreção foi calculada pela divisão do peso da saliva pelo tempo da colheita que nesse caso foi de 5 minutos. Tendo em conta que a saliva é constituída por 98-99% de água, considerou-se uma densidade de 1g/mL. O peso da saliva foi determinado no tubo de *falcon* subtraindo o peso do tubo vazio.

### 3.6. Determinação da atividade da amilase salivar

Para a determinação da atividade da amilase nas amostras da saliva utilizou-se o princípio do consumo de um substrato cromogéneo (2-cloro-p-nitrofenol ligado à maltotriose) por parte da  $\alpha$ -amilase, e a determinação da absorvância do produto resultante dessa reação (2-cloro-p-nitrofenol).

Para isso as amostras da saliva foram diluídas 200x (1  $\mu$ L da saliva e 199  $\mu$ L do diluente), seguidamente as amostras então diluídas foram aplicadas (6  $\mu$ L) em duplicado numa placa de 96 poços, bem como os controlos (alto e baixo, de acordo com indicação do kit, Salimetrics), conforme mostra a figura 5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl- alto	Ctrl- alto										
B	Ctrl-baixo	Ctrl-baixo										
C	Amostra-1	Amostra-1										
D	Amostra-2	Amostra-2										
E	Amostra-3	Amostra-3										
F	Amostra-4	Amostra-4										
G	Amostra-5	Amostra-5										
H	Amostra-6	Amostra-6										

**Figura 5.** Esquema da placa utilizada para a determinação da atividade da amilase salivar (adaptado das indicações do fabricante - Salimetrics).

Seguidamente acrescentou-se 240  $\mu$ L de substrato (previamente aquecido a 37°C) em cada poço. A placa foi incubada na estufa (Heraeus Function Line) durante 1 min, seguindo-se a primeira leitura num leitor de placas (Bio-Rad, Model 680) a 405nm. A placa foi novamente incubada a 37°C, por mais dois minutos, e ao fim desse tempo foi

feita nova leitura, no comprimento de onda referido. Os cálculos que conduziram aos resultados relativamente à atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase, foram realizados com base na equação fornecida pelo fabricante (Tabela 3).

**Tabela 3.** Equação usada para cálculos da atividade da  $\alpha$ -amilase salivar, e a respetiva legenda. Os resultados são expressos em U/mL.

<b>Equação</b>	<b>Legenda</b>	
$\frac{\Delta\text{Abs./min} * \text{TV} * \text{DF}}{\text{MMA} * \text{SV} * \text{LP}}$	$\Delta\text{Abs./Min}$	Diferença da absorvância por minuto (abs de 3 min - abs de 1 min/2)
	TV	Volume total do ensaio (0,246 U/mL)
	DF	Fator de diluição (200)
	MMA	Absortividade milimolar de 2-cloro-p-nitrofenol (12,9)
	SV	Volume da amostra (0,006 U/mL)
	LP	Percurso óptico = 0,97 (específico da placa recebida com kit)

Para a determinação da atividade enzimática da amilase em relação ao total de proteína, (atividade específica). dividiu-se o valor da sua atividade (U/L) pela respetiva concentração em proteína total da amostra.

## 3.7. Comparação do Proteoma salivar

### 3.7.1. Concentração das amostras

Para a análise e comparação das proteínas salivares através da eletroforese 2DE selecionaram-se catorze amostras da saliva (sete para cada grupo) dos participantes, de forma aleatória.

As amostras da saliva selecionadas foram concentradas através de ultrafiltração em membranas com um *cut-off* de 3kDa. A centrifugação (centrífuga – Hermle 323k, Agro 226) realizou-se a 4°C e 13000g pelo tempo necessário para ter uma quantidade de proteína total de 125µg num volume final inferior a 25µL.

### 3.7.2. Focagem isoeétrica

Após a concentração das amostras, as mesmas foram misturadas com tampão de re-hidratação [4% (m/v) 1- propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio (CHAPS), 7M ureia, 2M tiourea, 40mM ditioneitol (DTT), 2% (v/v) mistura de anfólitos (IPG *buffer*, GE healthcare)]. A quantidade de tampão adicionado à amostra dependeu do volume desta última, sendo o necessário para que em conjunto com a amostra totalizasse 125µL (volume recomendado para re-hidratação das tiras de gel para focagem isoeétrica).

A mistura foi incubada à temperatura ambiente pelo período de uma hora, seguindo-se uma centrifugação à temperatura ambiente (centrífuga – eppendorf 5424) durante 10 minutos a uma velocidade de 10000rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi aplicado em cada uma das diferentes ranhuras do suporte para tiras, do sistema Multiphor II (GE healthcare).

As tiras de gel foram colocadas de forma a que o gel ficasse em contato com as amostras, re-hidratando, de forma passiva por um período de 16 a 20 horas, à temperatura ambiente e cobertas com óleo mineral.

Após re-hidratação, as tiras foram colocadas no sistema Multiphor II (PHARMACIA LKB), para focagem isoeétrica das proteínas (primeira dimensão), a uma temperatura de 18°C, segundo o seguinte programa: passo 1 –

subida para 100V (0:01h), passo 2 - 300V (1:00h), passo 3 – subida para 3500V (4:00h), passo 4 – 3500V (3:00h).

### 3.7.3. Segunda dimensão (SDS PAGE)

Após a realização da focagem isoeétrica, as tiras de gel foram armazenadas a -28°C até realização da separação proteica através das massas moleculares das proteínas.

Foram preparados géis de poliacrilamida de 14%. Essa preparação consistiu na preparação dos géis através da adição de água bidestilada (8,25mL); Tris 1,5M, pH 8,8 (7,5mL); SDS (300µL); acrilamida/bis 30% (13,95ml); Persulfato de amónio (225µL) e TEMED (15 µL). Estes dois últimos reagentes são adicionados no final pelo fato de serem agentes polimerizantes. Após a adição desses dois reagentes coloca-se a solução no sistema já montado com o auxílio de uma pipeta, evitando a criação de bolhas, adicionando por cima deste a água destilada, para prevenir contacto de gel com oxigénio.

Para o gel de concentração (preparado após o gel de resolução), utilizaram-se os seguintes reagentes: água bidestilada (4,86mL); Tris 0,5M, pH 6,8 (2mL); SDS 10% (m/v) (80µL); Acrilamida/bis 30% (1,06mL); APS (48µL) e TEMED (8,8µL).

Após preparação dos géis, as tiras de gel, onde previamente se realizou a focagem isoeétrica, passaram por um procedimento designado equilíbrio. Realizaram-se dois passos de equilíbrio, de 15 minutos cada, o equilíbrio das tiras consiste em desfazer as pontes persulfureto existente nas proteínas pela ação de um agente redutor o ditioneitol (DTT), já o agente alquilante (iodoacetamida) impede o restabelecimento dessas ligações.

A solução de equilíbrio consistiu em 6M ureia, 75mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Para o primeiro passo (de redução) foi adicionado, a esta solução, DTT, a uma concentração final de 1% (m/v) e para o segundo passo (de alquilação) foi adicionada iodoacetamida, a uma concentração final de 2,5% (m/v).

Após o equilíbrio das tiras, os géis previamente preparados foram colocados nos suportes da tina eletroforética (Bio-Rad PowerPac basic), e as tiras foram colocadas

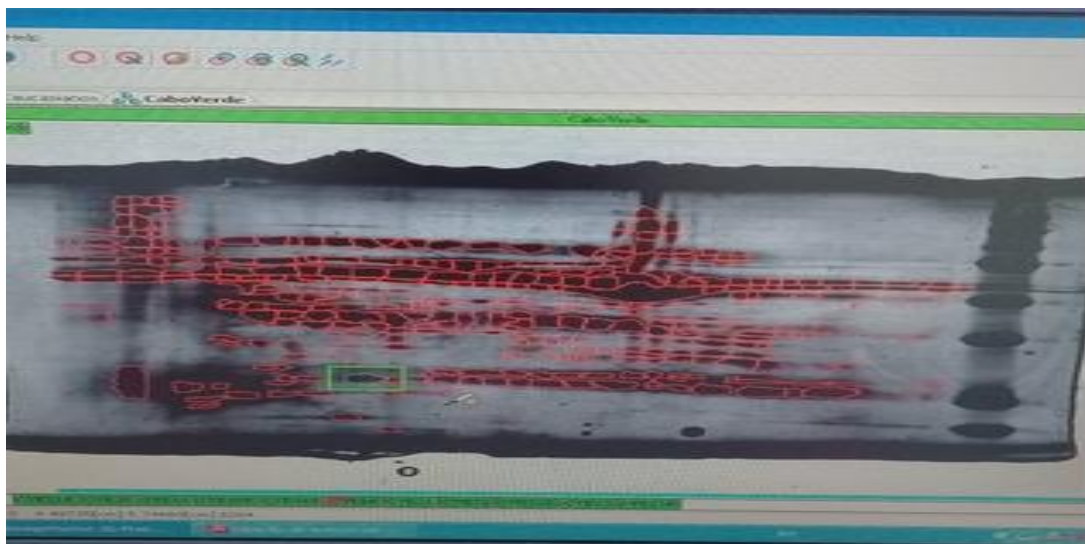


com muito cuidado entre os vidros. No caso de alguns géis, foi feito um poço, no topo do gel, para adição de 3 $\mu$ L de um marcador de massas moleculares (Dual Color, BioRad). A tina foi preenchida com o tampão de corrida (Tris-HCl 25mM pH 8,3; 0,192M glicina, 0,1% (m/v) SDS), tendo a corrida eletroforética decorrido a uma voltagem constante (140V). Quando a frente da corrida atingiu o fim do gel a corrente foi desligada (período de 1.30h a 2h).

Após a corrida os géis foram fixados (10% ácido acético, 40% metanol) durante 2 horas, e de seguida corados com uma solução de azul brilhante *Coomassie* G-250 (0,125%) durante 2 horas e descorados em várias mudanças de água destilada, até o background azul ficar o mais claro possível. Os géis foram digitalizados utilizando o scanner ImageScanner III (GE Healthcare) e o *software* Labscan.

#### 3.7.4. Análise dos géis

Para as análises dos géis 2D utilizou-se o *software* ImageMaster Platinum v.7, o qual permite que os spots dos géis correspondentes as proteínas sejam reconhecidas e assinalados automaticamente. Após esta deteção automática, houve uma edição manual, para garantir uma correta deteção. Todos os erros foram retificados no programa (Figura 6). Após a retificação de todos os géis fez-se o emparelhamento dos spots entre os diferentes géis. Este emparelhamento, numa primeira fase, consistiu na atribuição de *landmarks*, manualmente, seguindo-se um emparelhamento automático que usou essas *landmarks* como referência do posicionamento dos spots nos géis. Após o emparelhamento, os valores de percentagem de volume foram exportados para um ficheiro excel, através do qual os dados foram tratados para posterior análise estatística.



**Figura 6.** Imagem do gel 2D a ser retificado manualmente pelo software ImageMaster Platinum v.7 (Fonte própria).

### 3.8. Análise estatística

Os dados obtidos relativamente à quantidade média dos alimentos de consumo estimado diariamente pelos participantes e a equivalente parcela dos nutrientes, bem como os resultados obtidos da concentração proteica, da atividade da  $\alpha$ -amilase salivar bem como a sua concentração em relação às proteínas totais e da taxa de secreção de cada indivíduo, após aplicação das respetivas fórmulas, foram inseridos no programa SPSS versão vinte. Os dados foram testados para a normalidade e homocedasticidade através dos testes de Shapiro Wilk e Levene, respetivamente. Cada alimento e cada nutriente, obtido através do QFA foi comparado entre os grupos através de teste T (amostras independentes) ou equivalente não paramétrico (Mann Whitney), no caso dos pressupostos de normalidade e homocedasticidade não se verificarem. Procedeu-se de modo semelhante para comparar a concentração proteica, atividade da  $\alpha$ -amilase salivar e taxa de secreção. Foram aceites como significativos os resultados com  $\text{sig} < 0,05$ . Os resultados obtidos foram exibidos através de gráficos e tabelas.

Relativamente a análise estatística feita para a comparação dos perfis proteicos, os valores a comparar foram as percentagens de volume de cada spot. Para o caso de géis em que

alguns spots não foram visualizados, as células da tabela estavam em branco. Nesses casos, foi-lhes atribuído um valor abaixo dos demais valores.

Foram utilizadas duas abordagens. Primeiro, cada spot proteico foi comparado entre os grupos, de forma univariada. Neste caso, o procedimento estatístico foi semelhante ao descrito para os outros parâmetros salivares. Em segundo lugar, e tendo em conta que pode haver efeitos de umas variáveis relativamente às outras, usou-se uma abordagem multivariada, para comparar os grupos. Neste caso, a análise foi feita com recurso ao software Metaboanalyst. (calculado pelo software). Foi usado o log para transformação e o “mean centering” para o “data scaling” para a normalização dos dados e isso permitiu obter uma distribuição próxima da distribuição normal (Anexo V e VI). Este critério foi utilizado com base num artigo em que testaram a validade do PLS-DA (Análise discriminante por mínimos quadrados parciais) para a análise de perfis 2DE (Karp et al. 2005). Inicialmente, foi feita a análise do PCA (Análise de Componentes Principais), de modo a avaliar a separação entre os grupos e a possível existência de algum indivíduo outlier depois uma análise PLS-DA. Variable important plot (VIP) scores superiores a 1,5 foram considerados para as proteínas com maior contributo para a separação entre os grupos.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Questionário de frequência alimentar

Relativamente aos questionários de frequência alimentar que foram aplicados aos participantes, a tabela abaixo indica os alimentos para os quais se observaram diferenças significativas entre os grupos, em termos de consumo. O questionário aplicado avalia a frequência de ingestão de 86 itens alimentares (anexo 1), no entanto, apenas estes diferiram significativamente entre portugueses e cabo-verdianos os resultados da média e desvio padrão dos demais itens encontram-se exibidos no Anexo VII. No entanto ao ordenar os alimentos em diferentes grupos (lácteos, carnes, peixes, óleos e gorduras, pão cereais e similares, hortaliças e legumes, frutos, bebidas e miscelaneas) o resultado obtido não foi significativo para nenhum dos grupos de alimentos.

**Tabela 4.** Alimentos com diferenças significativas no consumo estimado entre os dois grupos em estudos (média +/- desvio padrão) g/pessoa/dia. Alguns alimentos que possuem tendência em serem significativos também estão na tabela, mas nesse caso o respetivo *p value* apresentam uma cor menos intensa

<i>Alimentos</i>	<b>Grupos (consumo médio)</b>		<b>P value</b>
	Portugueses	Cabo-verdianos	
<i>Leite meio gordo</i>	70,9+/-88,2	210,6+/-208,3	0,0003
<i>Leite magro</i>	45,6+/-80,1	11,8+/-45,3	0,018
<i>Iogurte</i>	25,3+/-29,6	50,9+/-61,3	0,045
<i>Perú e Coelho</i>	21,5+/-25,0	3,5+/-5,6	<0,0001
<i>Peixe magro</i>	12,9+/-11,4	4,5+/-5,2	<0,0001
<i>Peixe conserva</i>	12,2+/-13,6	23,9+/-23,8	0,022
<i>Lula e Polvo</i>	4,8+/-3,7	1,9+/-3,4	<0,0001
<i>Camarão</i>	1,7+/-2,6	0,6+/-1,1	0,010
<i>Óleo</i>	0,98+/-2,0	3,4+/-5,0	0,055
<i>Broa</i>	4,1+/-7,7	0,6+/-1,7	0,003
<i>Arroz</i>	49,7+/-27,7	153,8+/-95,7	<0,0001
<i>Açúcar</i>	2,3+/-3,0	6,2+/-6,5	0,016
<i>Couve Branca</i>	11,1+/-18,9	4,4+/-7,7	0,049
<i>Grelos</i>	7,4+/-9,3	1,8+/-1,3	0,0002
<i>Cebola</i>	27,7+/-34,1	66,1+/-54,1	0,0002
<i>Leguminosas secas</i>	35,3+/-42,3	47,4+/-41,0	0,058
<i>Refrigerante</i>	49,7+/-73,1	118+/-159,4	0,006
<i>Café</i>	26,6+/-31,5	13,8+/-24,3	0,012
<i>Sopa</i>	152,5+/-127,2	38,5+/-74,1	<0,0001

Quer os portugueses, quer os cabo-verdianos avaliados são estudantes universitários, estando a residir na mesma região geográfica, com acesso ao mesmo tipo de alimentos. Mesmo assim, observam-se diferenças particularmente marcadas em termos de consumo de açúcar e de frutos.

O povo português passa, atualmente, por um período em que estão a ser estabelecidos programas, a nível regional e nacional, para a promoção da alimentação saudável e para a aproximação à “Dieta Mediterrânica”. É possível que, devido aos enormes incentivos para uma alimentação saudável, muitos dos jovens universitários portugueses possam estar sensibilizados para estas questões.

Por outro lado, os alimentos cujo consumo foi superior para os Cabo-verdianos são alimentos já preferidos pelos habitantes do próprio país. A população Cabo-verdiana é caracterizada por um alto consumo de arroz, embora não produzida no arquipélago, peixes de conserva e, segundo Cabral et al. (2019), um consumo acrescido de óleos e açúcares, concordando com estes resultados.

Relativamente aos frutos, também se observou um consumo significativamente menor por parte dos cabo-verdianos, para vários (Tabela 5).

**Tabela 5.** Alimentos com diferenças significativas de consumo estimado para os caucasianos (média +/- desvio padrão) g/pessoa/dia. Alguns frutos que possuem tendência em serem significativos também estão na tabela, mas nesse caso o respetivo *p value* apresentam uma cor menos intensa

<i>Frutos</i>	<b>Grupos (consumo médio)</b>		<b>P value</b>
	Portugueses	Cabo-verdianos	
<i>Morango</i>	11,0+/-16,7	1,4+/-2,9	0,0004
<i>Cereja</i>	11,0+/-25,3	1,8+/-5,5	0,0004
<i>Melão</i>	16,2+/-26,5	3,0+/-5,0	0,010
<i>Uvas</i>	35,6+/-40,7	18,9+/-33,9	0,013
<i>Frutos secos</i>	11,4+/-15,3	5,5+/-10,9	0,011
<i>Figos, Nêspers e Damasco</i>	6,3+/-14,8	1,0+/-3,8	0,076
<i>Pêssego</i>	11,6+/-24,9	3,4+/-7,2	0,053
<i>Frutos frescos (soma)</i>	279,4+/-218,5	181,8+/-105,9	0,013

Várias hipóteses podem ajudar a compreender esta diferença, por um lado, o menor consumo desses frutos por parte dos cabo-verdianos pode ter a ver com um menor “conhecimento” de alguns, por parte destes indivíduos, uma vez que esses frutos são escassos em Cabo Verde. Por outro lado, apesar de Cabo Verde se situar na região tropical, com produção de frutos tropicais, como é o caso da papaia, banana e manga, o consumo destes frutos, mesmo no próprio país é pouco frequente (Couto e Santos 2010). Há ainda a hipótese de caucasianos e africanos diferirem noutros aspetos que afetam as preferências alimentares. Podem existir diferenças na forma como as duas populações percebem os alimentos, que não foram avaliadas neste estudo. Por exemplo, em termos de sensibilidade gustativa os grupos étnicos podem diferenciar-se significativamente na intensidade do sabor percebido (hispânicos, afro-americanos, brancos não hispânicos) (Williams et al. 2016).

#### Outros alimentos (alimentos típicos de Cabo verde)

Para além dos itens constituintes dos QFA, foram indicados consumos de outros alimentos por parte dos cabo-verdianos. Esses alimentos são: Cachupa, Cherém, Papa, Camoca, Cuscuz, Feijão Congo, Djagacida, Ponche, Bolacha CV, Mandioca, Massa CV, ilustrados na figura 7.



**Figura 7.** Imagens de alimentos típicos de Cabo verde (cachupa = 1, ponche = 2, bolacha = 3, feijão congo = 4, cuscuz = 5, xerém = 6, massa = 7, camoca = 8).

A frequência de consumo destes produtos foi da ordem de 2 a 4 vezes/semana a 1 vez/mês, o que mostra que os estudantes cabo-verdianos residentes em Portugal, apesar de não estarem no país de origem, não abandonam completamente os hábitos típicos alimentares do seu país.

Ao analisar as frequências de consumo em termos de macro- e micro-nutrientes (lista apresentada no Anexo IV), observaram-se diferenças significativas apenas a nível da vitamina K, biotina, molibdénio e iodo, tendo esses micronutrientes uma maior frequência de consumo estimado por parte dos Cabo-verdianos (Tabela 6). Já os carboidratos complexos apresentam uma ligeira tendência para estar aumentados em cabo-verdianos, ainda que as diferenças não sejam estatisticamente significativas.

**Tabela 6.** Nutrientes com diferenças significativas de consumo para os cabo-verdianos (média +/- desvio padrão) g/pessoa/dia. Os carboidratos complexos por apresentar apenas uma tendência o seu *p value* está representado com uma cor menos intensa.

<i>Portugueses</i>	<b>Grupos (consumo médio)</b>		<b>P value</b>
	Portugueses	Cabo-verdianos	
<i>Carboidratos complexos</i>	75,6+/-29,3	102,1+/-59,6	0,078
<i>Vitamina K</i>	12,9+/-7,2	19,2+/-11,3	0,014
<i>Biotina</i>	6,8+/-3,2	10,2+/-5,9	0,004
<i>Iodo</i>	47,5+/-34,8	79,8+/-56,3	0,008
<i>Molibdénio</i>	5,6+/-3,2	8,5+/-5,1	0,006

Segundo um trabalho prático realizado por Hattori et al. (2004), onde foi feita a quantificação do molibdénio em amostras de alimentos, concluiu-se que os cereais como o arroz são fontes do molibdénio, tendo-se observado um consumo significativamente maior de arroz por parte dos cabo-verdianos do que dos portugueses. Pode-se dizer o mesmo a respeito dos carboidratos complexos que segundo Panawala (2017) podem ser encontrados nos alimentos como milho e feijão que são muito consumidos pelos cabo-verdianos, segundo o questionário e o recordatório alimentar aplicados nesse estudo. Já a biotina é encontrada nos vegetais, leite, tecidos animais (Woollard & Indyk 2013). O iodo é um micronutriente essencial para a síntese das hormonas tiróideas que são essenciais no controle dos processos metabólicos do organismo e possui como fonte os peixes, os frutos do mar, leite e produtos lácteos, ovos, pão, carnes, o sal (Carlsen et al. 2018), que entra na constituição de diversos alimentos. A vitamina k encontra-se presente nos vegetais (folhas) verdes, contribuindo para cerca de 60% do total da ingestão da vitamina k pois estas contém concentrações mais conhecidas (Booth 2012). É de realçar que ambos os grupos apresentam um consumo destes nutrientes abaixo da dose diária recomendada para um adulto. A média e o desvio padrão para os outros nutrientes estão no Anexo VIII.

## 4.2. Recordatório alimentar no período de 24 horas (Anexo 2)

De modo a fazer uma avaliação de consumo mais próximo das datas das recolhas, optou-se por recolher informação através de um recordatório do consumo nas 24h anteriores.

Foi feita uma análise qualitativa, obtendo-se os seguintes resultados:

1) Antes do pequeno almoço - Nesse período, portugueses e cabo-verdianos comportaram-se de modo semelhante. No que diz respeito aos portugueses, dos 56 questionários aplicados, a maioria (46 pessoas) não ingeriu qualquer alimento nesse período, quanto aos cabo-verdianos, dos 32 questionários, 26 pessoas referiram não ter comido nada. No que diz respeito às pessoas que comeram, o tipo de alimentos foi o mesmo para portugueses e cabo-verdianos (ex. pão, queijo e fiambre, cereais, leite).

2) Pequeno almoço – Quanto ao pequeno almoço, apesar de alguns indivíduos não o terem feito, esses constituíram uma minoria, não havendo diferenças consideráveis entre os dois grupos em estudo. Os alimentos que são igualmente ingeridos nos dois grupos são o pão, queijo, fiambre, leite com cereais ou chocolate, tostas e torradas, manteiga, bolo, bolachas, café, sumos naturais, iogurtes naturais, frutas e batido de frutas. Normalmente os pequenos almoços foram feitos em casa ou na universidade. Apesar de pontualmente, apareceram alguns alimentos de forma particular para cada um dos grupos: para os portugueses foram broa com azeite, maçã cozida, os chás, pão e bolachas integral, chouriço, manteiga de amendoim, croissant, frutos vermelhos; para os cabo-verdianos são referidos a camoca (usada com alguma frequência para os pequenos almoço em Cabo verde), pão com marmelada ou com chocolate, leite condensado e pizza. Olhando para os alimentos que foram frequentes apenas para um determinado grupo, volta-se a observar um consumo mais acentuado de açúcar por parte dos cabo-verdianos.

3) Meio da manhã – A grande maioria dos portugueses referiu fazer uma refeição a meio da manhã. Os alimentos mais consumidos são bolachas de água e sal ou integrais, iogurte, barras de chocolate, cereais, leite, café, croissants, frutas como banana e maçã. Já no caso dos cabo-verdianos, a maioria referiu não comer nada nesse período do dia, correspondendo a 22 das 32 pessoas questionadas. Contudo das que consumiram algum alimento no meio da manhã estes foram semelhantes para os dois grupos.



4) Almoço – Nesta refeição não se observaram grandes diferenças entre os dois grupos, até porque um número considerável de indivíduos pertencentes a ambos os grupos almoçaram nas cantinas da universidade. No entanto houve algumas divergências, como é o caso do hábito dos portugueses acompanharem as refeições de sopa e pão, tiveram também maior frequência em acompanhar o prato principal com salada. Ambos os grupos apresentaram regularmente no seu almoço alimentos como: peixe, carnes de porco e frango preparados de diversas formas, arroz, batatas, esparguete, feijão, arroz de pato, e também pizzas, hambúrguer, omeletas.

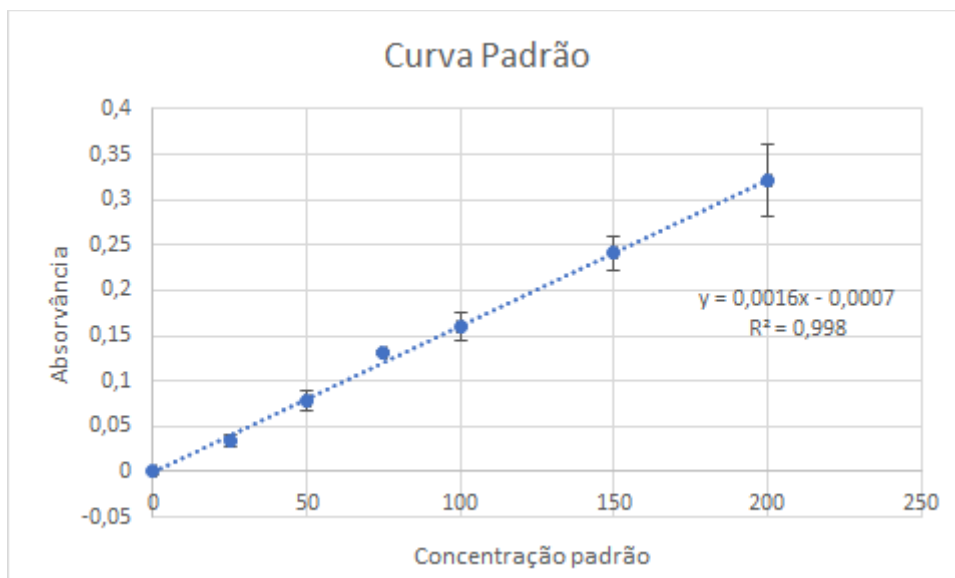
5) Meio da tarde – Relativamente ao tipo de alimentos que os dois grupos consomem, não há muitas diferenças. A diferença situa-se em termos de quantidade dos alimentos ingeridos, com os cabo-verdianos a consumirem mais alimentos. No caso dos portugueses estes fazem uma refeição simples como comer um iogurte ou beber um sumo de frutas, um chá, uma peça de fruta ou barritas de chocolate.

6) Jantar – Para esta refeição, os participantes portugueses podem dividir-se em dois grupos: aqueles que ao jantar fazem uma refeição mais leve à base de sopa, ovos cozidos, alimentos a base de soja, frutos, e aqueles em que há o consumo de maiores quantidades de alimentos como carnes de porco, vaca e frango, arroz, feijão e massas. Há também referência à ingestão de bebidas alcoólicas como vinho ou sangria nesta refeição. No caso dos cabo-verdianos a maioria referiu uma refeição semelhantemente ao almoço.

7) Ceia – A maior parte dos participantes refere não fazer esta refeição e aqueles que referiram fazer comeram um lanche simples como um iogurte, bolachas, cereais, leite, barras de chocolate. Já no caso dos cabo-verdianos, mais de metade referiram ter ingerido alimentos antes de dormir, consumindo alimentos similares ao dos portugueses mais em uma quantidade maior. Alguns chegaram mesmo a referir uma refeição semelhante à do almoço, nessa hora.

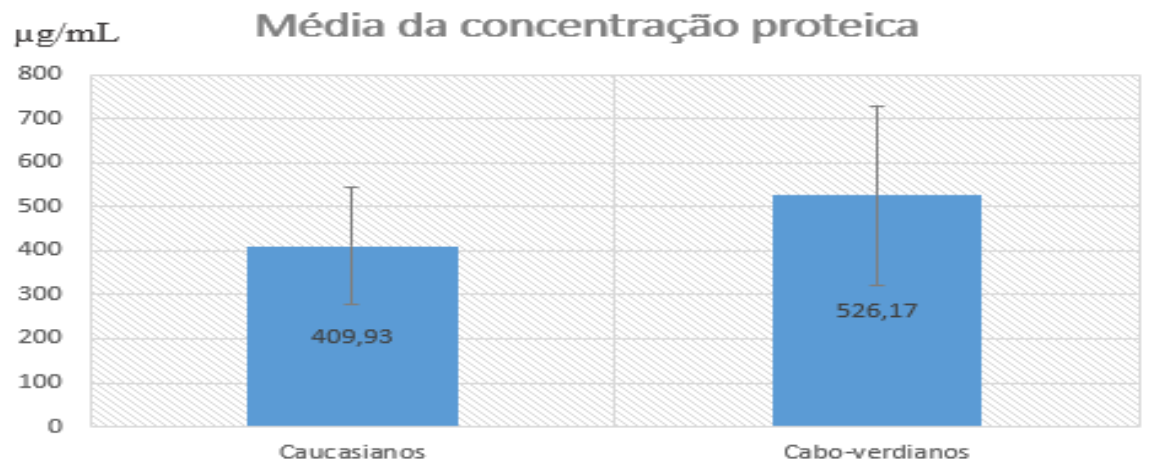
### 4.3. Concentração em proteína total e taxa de secreção

O gráfico abaixo representado (Figura 8) mostra um exemplo de uma curva padrão obtida.



**Figura 8.** Exemplo da curva da absorvância da concentração padrão.

Baseado na equação da reta exibida no gráfico acima fez-se o cálculo das concentrações de proteínas da saliva de todos os indivíduos do estudo. Nos resultados obtidos e apresentados no gráfico abaixo (Figura 9), vê-se que a média das concentrações proteicas é diferente entre os dois grupos, com os indivíduos cabo-verdianos a apresentarem concentrações proteicas significativamente mais elevadas.



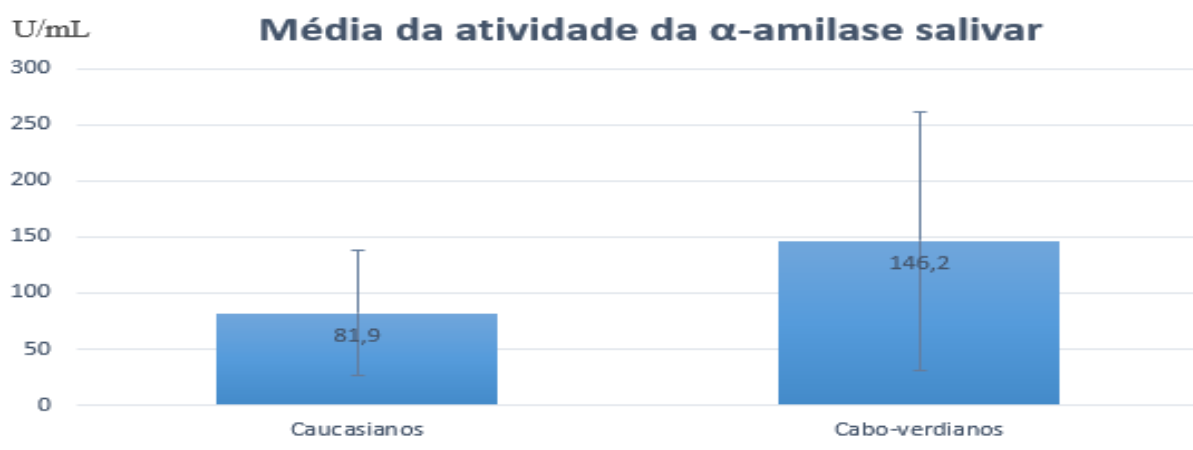
**Figura 9.** Gráfico da comparação da média da concentração proteica das amostras relativamente aos dois grupos.

O valor de  $p$  para a comparação entre as médias das concentrações proteicas foi de 0,020. Vários fatores (condição patológica, sexo, idade) podem influenciar a concentração das proteínas salivares (Shaila et al. 2013; Lamy et al. 2014), mas no que diz respeito a etnia não se encontrou qualquer trabalho estudo que exprima esse facto. As amostras foram recolhidas nas mesmas condições (mesmo intervalo de tempo, mesmo período do dia, indivíduos com idade aproximada) e as condições patológicas constituíram fatores de exclusão. Sendo assim, tal diferença encontrada pode se dever a outros fatores que não estes apontados, podendo ser, portanto, a genética ou hábitos alimentares.

Em muitos casos o fato da concentração proteica apresentar-se mais ou menos elevada tem a ver também com o fato da taxa de secreção ser menos ou mais elevada respetivamente (Shaila et al. 2013). Para averiguar tal fato fizeram-se cálculos da taxa de secreção para cada individuo e fez-se a comparação da média entre os grupos, não se observando diferenças significativas entre os grupos (Portugueses 0,45/0,24; Cabo-verdianos 0,54/0,28,  $p = 0,219$ ) reforçando a hipótese de que a concentração das proteínas salivares são maiores nos cabo-verdianos do que nos portugueses.

#### 4.4. Atividade da $\alpha$ -amilase salivar em amostras da saliva

A atividade enzimática da proteína  $\alpha$ -amilase foi comparada entre os dois grupos estudados. Observaram-se atividades amilolíticas significativamente mais elevadas nos indivíduos cabo-verdianos, comparativamente aos portugueses (Figura 10) ( $P=0,021$ ).



**Figura 10.** Gráfico da comparação da atividade da  $\alpha$ -amilase salivar entre caucasianos e cabo-verdianos, resultados expressos em U/mL.

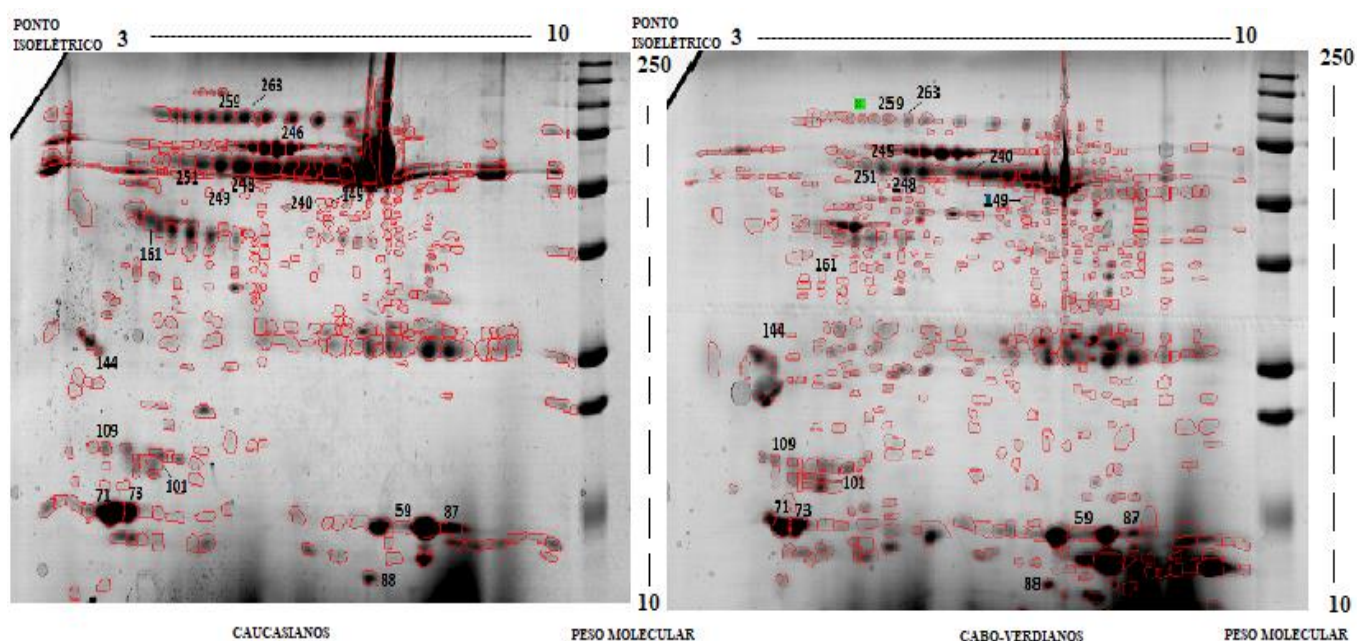
Vários são os fatores que são indicados como influenciadores da concentração da  $\alpha$ -amilase, nomeadamente o stresse físico (causado por exercício), stresse psicológico, taxa de fluxo salivar, depressão, idade, consumo de álcool (Arhakis et al. 2013; Sahu et al. 2013). A amilase salivar é uma enzima de grande importância na digestão do amido, um polissacarídeo presente nos vegetais (semente, folhas, caules, frutos e raízes), encontrando-se em quantidades consideráveis em alimentos como arroz, batata, trigo, milho, mandioca. Diferentes estudos sugerem que os níveis de amilase salivar estão associados ao conteúdo em amido habitualmente presente na dieta (Mandel et al. 2010; Santos et al. 2012). Alimentos ricos em amido, como milho e mandioca, são alimentos com um contributo significativo para a dieta dos cabo-verdianos. O milho desde a antiguidade que se constituiu como um produto base da alimentação, servindo de matéria prima para a confeção de vários pratos tradicionais que ainda hoje são consideravelmente consumidos pela sociedade Cabo-verdiana. Assim, é possível que estes níveis aumentados de amilase nesta população se devam a um processo adaptativo dada a necessidade de digestão do amido presente nestes alimentos. Também o arroz aparece como um alimento indispensável na vida diária dos Cabo-Verdianos, o que pode ser

conferido em vários artigos (Cabral et al. 2019; Couto & Santos 2010). De realçar que ao estimar a atividade enzimática da amilase em relação à concentração em proteína total, da saliva, não se observaram diferenças significativas (Cabo-verdianos  $0,2467 \cdot 10^{-3}/0,14$ ; Portugueses =  $0,1963 \cdot 10^{-3}/0,24$ ,  $p = 0,152$ ), o que significa que apesar da concentração proteica ser mais alta nos Cabo-verdianos a proporção da amilase em relação às outras proteínas salivares, para ambos os grupos, são equiparáveis.

#### 4.5. Comparação de perfis salivares 2DE entre caucasianos e cabo-verdianos

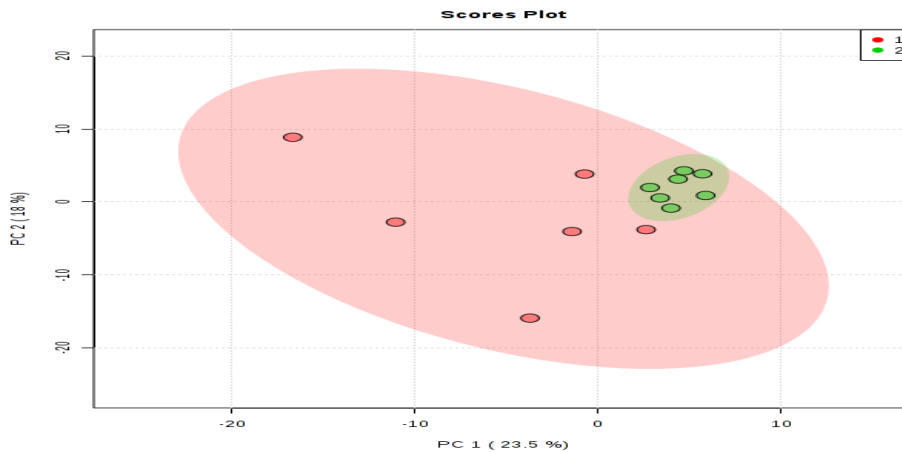
Após a análise dos géis obtidos através de eletroforese 2DE, a percentagem de volume de cada spot proteico foi comparada entre os dois grupos (caucasianos e africanos). Foi feita uma comparação univariada (spot a spot, individualmente) e uma comparação multivariada, tendo em conta possíveis interações que pudessem existir entre (alguns) spots. Numa primeira fase foi feita uma análise univariada (Teste T).

Alguns spots proteicos foram observados como estando diferencialmente expressos entre os grupos de indivíduos caucasianos e africanos (spots 10, 71, 78, 88, 109, 161, 186, 247, 248, 249, 251, 259 e 263) (Figuras 11 e 14).



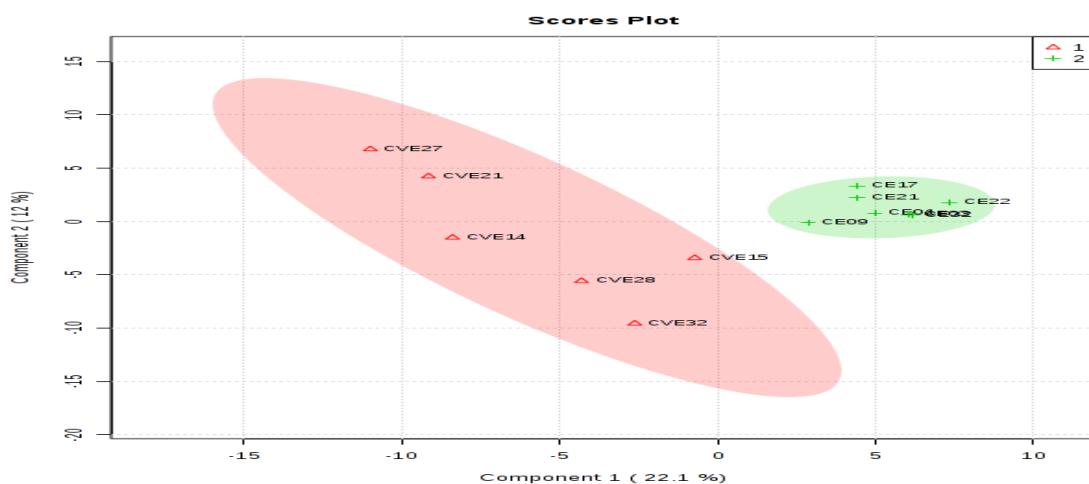
**Figura 11.** Exemplo dos géis de cada grupo com clara diferença de expressão de alguns spots.

Tendo em conta a natureza da saliva e o facto da variação de algumas proteínas salivares poderem ocorrer em associação com outras, a comparação entre caucasianos e Africanos foi feita, também, por análise multivariada. Numa primeira fase, através de PCA, os dois grupos não ficaram muito separados, mas nenhum dos indivíduos apareceu como outlier (Figura 12)



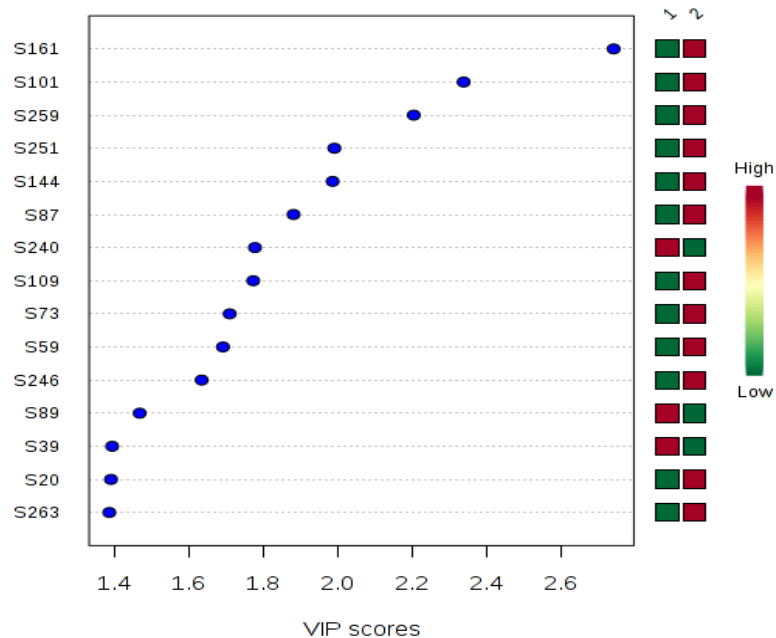
**Figura 12.** Análise de componentes principais e a respetiva percentagem de variabilidade entre os grupos (1 = Cabo-verdianos; 2 = Caucasianos)

Através de “Partial Least Square – Discriminant Analysis” (PLS-DA), observou-se uma boa separação dos grupos (Figura 13).



**Figura 13.** Representação gráfica da separação encontrada entre os grupos pela análise da PLS-DA. (1 = cabo-verdianos; 2= caucasianos; CE = caucasianos; CVE = cabo-verdianos).

No que diz respeito às variáveis que mais contribuem para esta separação dos grupos, tem-se os spots que têm  $VIP > 1.5$ , nomeadamente os spots 161, 101, 259, 251, 144, 87, 240, 109, 73, 59 e 246 (Figura 14).



**Figura 14.** Representação das variáveis mais significantes na diferenciação entre os grupos e a respetiva intensidade (à esquerda tem-se o número de match que representa proteínas e à direita a intensidade com a qual são expressas; 1 corresponde aos cabo-verdianos).

De acordo com trabalhos prévios, onde os spots de perfis proteicos salivares foram identificados por espetrometria de massa (ex. Rodrigues et al., 2017a; Rodrigues et al., 2017b; Rodrigues et al., 2019) as proteínas que correspondem aos spots que diferem entre grupos são as apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Número do spot e as proteínas correspondentes a esses spots, assim como a indicação do sentido de variação, em cabo-verdianos, comparativamente a caucasianos (média +/- desvio

padrão). A média e o desvio padrão estão representadas apenas para as proteínas que foram identificadas por análise univariadas.

<b>Número do spot</b>	<b>Proteína correspondente</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>	<b>P value</b>
71	Cistatina	3,57+/-2,66	1,44+/-0,69	0,014
73	Cistatina S			
109	PIP	0,41+/-0,16	0,19+/-0,12	0,022
144	“Possível PRP”			
161		0,35+/-0,21	0,082+/-0,029	0,006
240	Amilase			
246	Albumina			
248	Cadeia alfa de imunoglobulina	1,06+/-0,31	0,52+/-0,16	0,003
249	Cadeia alfa de imunoglobulina	0,79+/-0,21	0,42+/-0,23	0,013
251	Cadeia alfa de imunoglobulina	0,51+/-0,19	0,17+/-0,09	0,004
259	Recetor polimérico de imunoglobulinas	0,24+/-0,11	0,09+/-0,01	0,009

De entre as várias proteínas observadas como diferindo entre portugueses e cabo-verdianos, só para 3 se observaram níveis de expressão mais elevados, estando as restantes diminuídas em cabo-verdianos. A existência de diferenças entre etnias vai de encontro a trabalhos prévios, que indicam diferenças a nível da saliva de indivíduos de populações diferentes. Por exemplo, Choo et al. (2017) tinham sugerido a existência de diferenças no proteoma da saliva entre populações. Tais diferenças podem dever-se tanto à genética como também a questões de hábitos alimentares pois quando se fala mais especificamente das proteínas catalíticas que possuem funções sobre determinados componentes dos alimentos a sua disposição será proporcional ao seu contato com o componente em questão (Morzel et al. 2017).

As proteínas salivares cistatina, albumina e amilase apresentaram diferenças entre caucasianos e cabo-verdianos. Quanto à amilase, um dos spots desta proteína está aumentado na saliva dos indivíduos cabo-verdianos. Esse resultado vai no sentido do resultado obtido para a atividade enzimática desta proteína. No entanto, são necessários mais estudos que ajudem a perceber o porquê das restantes formas de amilase não apresentarem diferenças entre os dois grupos.

A cistatina S, que representa uma das proteínas mais comuns pertencentes à saliva, e que esta presente em níveis mais baixos em cabo-verdianos, provém principalmente da



secreção das glândulas submandibulares e corresponde, segundo Martini et al. (2017), a uma proteína de defesa envolvida na imunidade oral inata. As cistatinas em geral desempenham importantes funções, são inibidores reversíveis das peptidases de cisteína (Dickinson 2002; Oliveira et al. 2003). Segundo Dickinson (2002), as cistatinas salivares em especial possuem o potencial de inibir muitas enzimas devido à alta concentração que apresentam neste fluido. Ainda que seja este o primeiro trabalho, que seja do nosso conhecimento, em que é referida uma diferença nos níveis de cistatinas entre caucasianos e africanos, Dickinson (2002) havia já referido que existe uma variação considerável na concentração dos níveis de cistatina em populações diferentes, ainda que igualmente saudáveis.

A diferença referida pode ser atribuída à genética. No entanto, estas diferenças podem dever-se também a outros fatores. Por exemplo, Martini et al. (2017) referiram que a cistatina S possui a função de inibir patógenos endógenos (parasitários e bacterianos), o que significa que diferentes níveis de exposição a estes pode influenciar os níveis desta proteína na saliva.

A variação nos níveis desta proteína pode ainda dever-se aos hábitos alimentares. Trabalhos recentes, realizados no nosso laboratório, mostraram que os níveis desta proteína aumentam em resposta ao consumo de alimentos ricos em polifenóis, como o vinho e as nozes (dados não publicados). Também o fato destas proteínas terem funções de inibidores de proteases cisteína e tendo em conta que essas proteases, segundo Malek et al. (2016), são encontradas principalmente nos frutos e em latex dos vegetais, então é expectável que possam estar presentes em níveis mais elevados em indivíduos com maiores consumos desses alimentos. Tendo em conta os resultados observados, em termos de hábitos alimentares, onde se observou um maior consumo de frutas por parte dos portugueses, não se pode descartar a hipótese de que alguma desta variação seja consequência desses diferentes tipos de consumo.

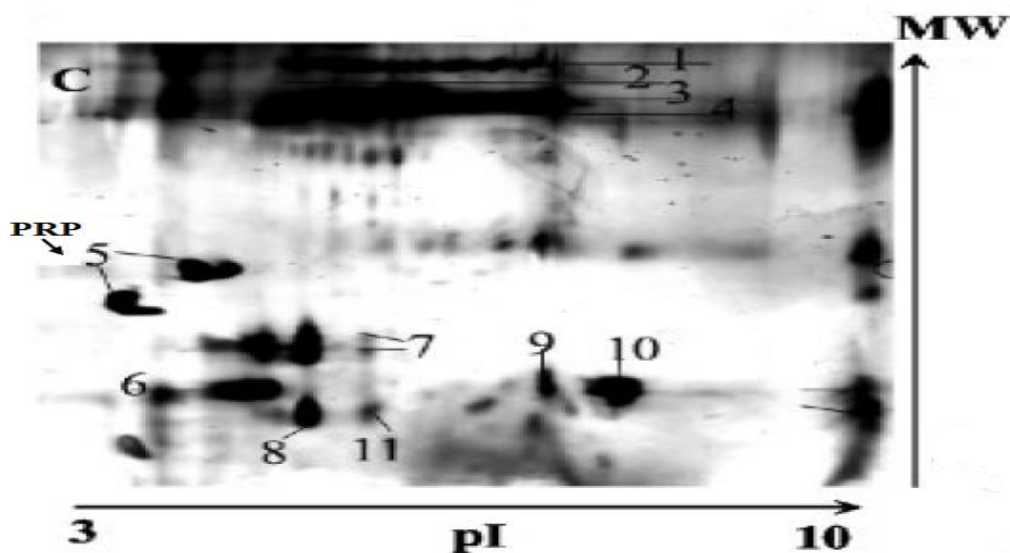
Relativamente à diferença encontrada na proteína induzida por prolactina (PIP), mais estudos são necessários para compreender o motivo. Apesar dos vários estudos já realizados, as funções biológicas desta proteína ainda não estão totalmente compreendidas (Baniwal et al., 2013; Urbaniak et al., 2018). Funções relacionadas com

a dinâmica do citoesqueleto, proliferação, silenciamento, foram já referidas (Baniwal et al. 2013). Segundo estes mesmos autores, a PIP possui também uma grande capacidade de adesão pois consegue ligar-se a outras proteínas (fibronectina, actina, fibrinogénio,  $\beta$ -tubulina, albumina sérica), a células (TCD4, macrófagos, espermatozóides), o que leva a presumir que ela pode ter funções imunomoduladoras. Quando se fala das PIP salivares humanas foi verificado que estas conseguem ligar-se às bactérias (Gemella, Streptococcus, Staphylococcus) o que sugere que a PIP faz parte do mecanismo de defesa oral contra os patógenos bacterianos (Urbaniak et al. 2018).

Uma outra proteína cujos níveis foram mais baixos em Cabo-verdianos foi a imunoglobulina A (IgA). Spots de cadeia alfa de imunoglobulina e spots de recetor polimérico de imunoglobulinas, apresentarem níveis de expressão mais baixos nos géis deste grupo. Enquanto a cadeia alfa é uma das cadeias constituintes da IgA, o recetor polimérico de imunoglobulinas possui função de captar e transportar as IgAs (Sakaguchi et al., 2013). As IgAs são consideradas como principais isótipos das imunoglobulinas (Ig) presentes nas secreções das mucosas (Endsley et al. 2010), onde desempenham importantes funções na defesa contra ataques de microrganismos patogénicos através da aglutinação impedindo a adesão destes à superfície da mucosa. Na saliva a IgA encontra-se ligada a um componente, denominado de secretor, formando o complexo o IgA-secretor. Esta constitui a primeira linha de defesa contra os patógenos orais, e por conseguinte, ajuda a manter a integridade da superfície dentária e epitelial, o que faz com que uma baixa concentração na saliva esteja relacionada com o aumento das doenças periodontais e caries (Khan et al. 2016). Relacionando estes factos com os resultados observados no presente trabalho, é possível colocar a hipótese de que menores níveis desta proteína em africanos os possa expor a mais problemas orais. Segundo Naorungroj et al (2017), existe ligação entre heterogeneidade racial e periodontite (numa investigação que teve a participação de populações brancas e afro-americanas). Neste, e num outro estudo semelhante, realizado por Wu et al. (2011), estimou-se a saúde oral entre os brancos não hispânicos, pretos não hispânicos e mexicanos e o resultado revelou um número significativamente maior de dentes cariados por parte dos negros e mexicanos.

Segundo Khan et al. (2016), a concentração da IgA na saliva está intimamente associada à idade, no entanto, no presente trabalho esse não será o motivo da variação, pois os participantes do estudo tinham idades semelhantes.

Relativamente spot144, apesar deste não ter sido identificado, encontra-se numa zona em que é expectável encontrar PRP (proteínas ricas em prolinas), pois ao comparar o spot 144 da figura 15 (resultado do nosso trabalho) com o spot 5 da imagem obtida por Vitorino et al. (2006) (figura 15) vê-se que se situam na mesma área.



**Figura 15.** Imagem de um gel 2D que mostra a região da PRP que nesse caso corresponde ao spot 5. Spot 1 = Recetor polimérico da imunoglobulina; spot 2 = IgA; spot 3 = Lactoferrina; spot 4 = Amilase; spot 6 = Cistatina S ; spot 7 = Lipocalina 1; spot 8 = Cistatina SN1; spot 9= Cistatina SN2, spot 10 = Precursor da película de cistatina SA-III; spot 11 = Calgranulina B, (Adaptado de Vitorino et al 2006).

No entanto caso seja este, os seus níveis estão aumentados nos portugueses, comparativamente aos cabo-verdianos (facto que pode ser confirmado ao analisar os spots 144 da imagem dos géis dos portugueses e dos cabo-verdianos da figura 14). As PRPs presentes na saliva pertencem a 3 classes: ácidas, glicosiladas e básicas. Enquanto que as PRPs ácidas têm funções de proteção da cavidade oral, estando muito ligadas à saúde oral, as PRPs básicas têm sido particularmente referidas em relação a capacidade de ligação a polifenóis. Os níveis destas proteínas aparece aumentado em espécies animais

que têm consumos de polifenóis (particularmente taninos) aumentado (ex. Shimada 2006; Lamy et al. 2010). Assim, variações nos níveis desta proteína podem dever-se a diferenças nas dietas (Tian et al. 2015). Níveis mais elevados de taninos podem ser encontrados em frutos, frutos secos e vinhos. Considerando o resultado obtido para os hábitos alimentares, os estudantes portugueses consomem muito mais frutos e frutos secos de que os cabo-verdianos, sendo o consumo de vinho um hábito típico de países com Dieta Mediterrânica, como é o caso de Portugal.

A albumina salivar enquadra-se no grupo das proteínas correspondentes a potenciais biomarcadores, nomeadamente como marcadores de patologias como diabetes mellitus, caries dentarias, carcinomas (Vaziri et al. 2009; Koduru et al. 2017). A diferença observada neste estudo, em pelo menos uma forma proteica da albumina, indica que alguns resultados indicando esta proteína como biomarcador de algumas patologias, terão que ser vistos com cuidado para uma população que não a caucasiana.

## 5. Conclusão

A realidade que é conhecida por todos e que é indiscutível, é que há diferenças a nível da genética e dos hábitos alimentares entre estes dois povos. Por outro lado, verifica-se que também há semelhanças perante aquilo que ambos consomem, mas o que este trabalho quis perceber é se essas diferenças contribuem para as diferenças encontradas no proteoma salivar entre estas duas populações. Para dar resposta a esta questão, com base nos resultados conseguidos neste trabalho podemos dizer que sim. Com efeito proteínas como as imunoglobulinas, cistatinas e amílases, apresentam diferenças entre caucasianos e africanos. Se isso se deve exclusivamente a uma componente genética ou também ao facto de existirem diferenças alimentares, fica por esclarecer. No entanto, é importante realçar que, perante estes resultados, é importante não generalizar os trabalhos que sugerem biomarcadores salivares.

Para finalizar a nossa saliva conta com uma ampla variabilidade a nível da proteómica cuja influência vai muito além da genética e dos hábitos alimentares, o que faz com que as particularidades sejam não apenas de um determinado grupo mas sim individuais. Assim, há ainda uma grande necessidade de mais estudos que ajudem a caracterizar e conhecer melhor a composição da saliva e dos fatores que a podem fazer variar, de modo a que este fluido possa começar a ser realmente usado na pesquisa e quantificação de biomarcadores.

## 5.1. Estudos Futuros

Para dar continuidade a esse estudo e perceber com outro nível de detalhe quais as proteínas expressas em ambas os grupos, e as que apenas o são para um determinado grupo, o próximo passo seria submeter os resultados obtidos nos géis 2DE a técnica de espectrometria de massa a fim.

Ainda relativamente a este trabalho, ele pode ser ainda mais desenvolvido pelo que, para determinar com maior eficiência o efeito da influência dos hábitos alimentares sobre o proteoma salivar, seria interessante a utilização de populações geneticamente semelhantes mas com uma grande diversidade a nível da alimentação. E para inferir melhor a respeito da influência da genética, ter como participantes do estudo populações de raças diferentes mas que não apresentem diferenças a nível alimentar e convivam em ambientes semelhantes, com as mesmas condições de higiene e exposições. Ainda para dar contributo a nível do conhecimento do proteoma salivar, vários outros fatores específicos conhecidos como seus influenciadores podem e devem ser suprimidos ou considerados, para com outro grau de certeza afirmar quais são fatores (internos ou externos) que afetam a sua variabilidade, concentração e constituição. Pois esse estudo não ficou integralmente elucidado o que suscita a um compromisso e encorajamento para futuras investigações.

## 6. Referências Bibliográficas

Araujo, Maria J. S. L.; Marques, Isabel A (2014). *Valor Patrimonial da Gastronomia Portuguesa - Impacto na Satisfação dos Turistas no Destino Porto*, Dissertação apresentada na Universidade Lusófona do Porto para obtenção do grau de Mestre, Porto.

Arhakis, Aristidis; Karagiannis, Vasilis; Kalfas, Sotirios (2013). *Salivary Alpha-Amylase Activity and Salivary Flow Rate in Young Adults*, The Open Dentistry Journal 7, 7-15, Grécia, doi: 10.2174/1874210601307010007.

Baniwal, Sanjeev K.; Nyam-Osor, Chinge; Jordan, Craig V.; Tripathy, Debu; Frenkel, Baruch (2013). *Prolactin-Induced Protein (PIP) Regulates Proliferation of Luminal A Type Breast Cancer Cells in an Estrogen-Independent Manner*, PLOS ONE, Volume 8 Issue 6 e62361, DOI: 10.1371/journal.pone.0062361 · Source: PubMed.

Booth, Sarah L (2012). *Vitamin K: food composition and dietary intakes*, Food & Nutrition Research 2012.56:5505 -DOI: 10.3402/fnr.v56i0.5505, Estados Unidos.

Brandão, Elsa; Soares, Susana; Mateus, Nuno; De Freitas, Victor (2014). *Human saliva protein profile: Influence of food ingestion*, Food Research International 64 (2014) 508–513, doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.022.

Butterworth, Peter J.; Warren, Frederick J.; Peter R. Ellis (2011), *Human  $\alpha$ -amylase and starch digestion: An interesting marriage*, starch-journal 63, 395–405, DOI 10.1002/star.201000150.

Cabral, Diva; Cunha, Luís M.; Almeida, Maria D. V (2019). *Food choice and food consumption frequency of Cape Verde inhabitants*, Appetite, APPET 4245, doi.org/10.1016/j.appet.2019.04.005.

Caiado, Luis A. R. R.; Santos, José A. C.; Santos, Margarida C (2015). *A importância da Gastronomia na experiência turística: O caso do Algarve*, Tese de Mestrado-Escola Superior de Gestão, Hotelaria e Turismo, Portugal.

Canon, Francis; Neiers, Fabrice; Guichard, Elisabeth (2018). *Saliva and Flavor Perception: Perspectives*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 66, 7873–7879, DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01998.

Carlsen, Monica H.; Andersen, Lene F.; Dahl, Lisbeth; Norberg, Nina; Hjartåker, Anette (2018). *New Iodine Food Composition Database and Updated Calculations of Iodine Intake among Norwegians*, Nutrients, doi:10.3390/nu10070930.

Castagnola, Massimo; Cabras, Tiziana; Lavarone, Federica; Fanali, Chiara; Nemolato, Sonia; Peluso, Giusy; Bosello, Silvia L.; Faa, Gavino; Ferraccioli, Gianfranco; Messana,

I (2012). *The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms*. Expert Review of Proteomics, doi: 10.1586/epr.11.77.

Castagnola, Massimo; Scarano, E.; Passali, G. C.; Messina, I.; Cabras, T.; Iavarone, F.; Paludetti, G (2017). *Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities*, Acta Otorhinolaryngologica Italica 2017;37:94-101; doi: 10.14639/0392-100x-1598.

Cheng, Yi-Shing L.; Rees, Terry; Wright, John (2014). *A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection*, Clinical and Translational Medicine, doi: 10.1186/2001-1326-3-3.

Cho, Ha R.; Kim, Han S.; Park, Jun S.; Park, Seung C.; Kim, Kwang P.; Wood, Cho, Ha R.; Kim, Han S.; Park, Jun S.; Park, Seung C.; Kim, Kwang P.; Wood, Troy,.; Choi, Yong S (2017). *Construction and characterization of the Korean whole saliva proteome to determine ethnic differences in human saliva proteome*, Plos One, doi.org/10.1371, Estados Unidos.

Couto, Carlos F.; Santos, Ana (2010). *Habitos Alimentares numa Pequena Comunidade Rural da Ilha de Santiago de Cabo Verde Dietary Habits in a Small Rural Community of Santiago Cape Verde Island*, Revista portuguesa de endocrinologia, diabetes e metabolismo.

Craveiro, Isabel; Alves, Daniela; Amado, Miguel; Santos, Zélia; Fortes, Argentina Tomar; Delgado, António P.; Correia, Artur; Gonçalves, Luzia (2016). *Determinants, Health Problems, and Food Insecurity in Urban Areas of the Largest City in Cape Verde*, International journal of Environmental Research and Public Health 13, 1155, doi:10.3390/ijerph13111155.

Da Silva, Luis P.; Pinto, Elisabete (2016). *Low Adherence to Mediterranean Diet in Portugal: Pregnant Women Nutrition in Portugal and its Repercussions*, Acta Med Port 2016 Oct;29(10):658-666, doi.org/10.20344/amp.7344.

Devaraj, Sharmila D (2013). *Salivary Biomarkers – A Review*, Journal of Pharmaceutical Sciences, and Researc, India.

Dickinson, D. P (2003). *Salivary (sd-type) cystatins: over one billion years in the making—But to what purpose?*, Crit Rev Oral Biol Med, 13(6):485-508,

Dsamou, Micheline; Palicki, Olivier; Septier, Chantal; Chabane, Claire; Lucchi, Géraldine; Ducoroy, Patrick; Morzel, Martine (2011) *Salivary Protein Profiles and Sensitivity to the Bitter Taste of Caffeine*, doi:10.1093/chemse/bjr070, França.

Endsley, Mark A.; Njongmeta, Leo M.; Shell, Elisabeth; Ryan, Matthew W.; Alexander J (2009). *Human IgA inducing protein from dendritic cells induces IgA production by*



*naïve IgD+ B cells*, J Immunol. 2009 February 15; 182(4): 1854–1859. doi:10.4049/jimmunol.0801973.

Ferreira, R (2019). *Comparação do perfil proteico salivar antes e após a degustação de vinhos*; Trabalho de estágio da licenciatura em Bioquímica, Universidade de Évora.

François, Chevalier (2010), *Standard Dyes for Total Protein Staining in Gel-Based Proteomic Analysis*, Materials 3, 4784-4792, doi:10.3390/ma3104784.

Gabor, Varga (2016). *Saliva – salivary glands*, Apresentação disponível em <http://semmelweis.hu/oralbiologia/files/2016/02/16-Salivary-lecture-Varga-English.pdf>.

Gupta, Sonia; Ahuja, Nitin (2018). *Salivary Glands*, Intechopen, doi.org/10.5772/intechopen.81213.

Gupta, Vinod K.; Paul, Sandip; Dutta, Chitra (2017). *Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity*, Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2017.01162.

Graça, Pedro; Gregório, Maria J.; Sousa, Sofia M.; Brás, Sónia; Penedo, Tatiana; Carvalho, Telmo; Bandarra, Narcisa M.; Lima, Rui M.; Simão, Ana P.; Goiana-da-Silva, Francisco; Freitas, Maria G.; Araújo, Fernando F (2018). *A new interministerial strategy for the promotion of healthy eating in Portugal: implementation and initial results*, Health Research Policy and Systems 16:102, doi.org/10.1186/s12961-018-0380-3.

Hajat, Anjum; Rouxa, Ana D.; Franklina, Tracy G.; Seemanb, Teresa; Shragerc, Sandi; Ranjitud, Nalini; Castroe, Cecilia; Watsonf, Karol; Sanchezg, Brisa; Kirschbaumh, Clemens (2010). *Socioeconomic and race/ethnic differences in daily salivary cortisol profiles: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*, National Institutes of Health 35(6): 932–943, doi:10.1016/j.psyneuen.2009.12.009.

Hattori, Hiroyuki; Ashida, Akane; Itô, Chie; Yochida, Munehiro (2004). *Determination of molybdenum in foods and human milk, and an estimate of average molybdenum intake in the Japanese population*, J Nutri Sci Vitaminol, 50, 404-409, Japão.

Hemadi, Abdullah S; Huang, Ruijie; Zhou, Yuan; Zou, Jing (2017). *Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment*, International Journal of Oral Science, doi:10.1038/ijos.2017.35.

Herman, William H.; Cohen, Robert M (2012). *Racial and Ethnic Differences in the Relationship between HbA1c and Blood Glucose: Implications for the Diagnosis of Diabetes*, J Clin Endocrinol Metab. 2012 Apr; 97(4): 1067–1072, doi: 10.1210/jc.2011-1894.

Holmberg, Kyle V.; Hoffman, Matthew P (2014). *Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands*, Monographs in oral science, 2014; 24:1–13. doi:10.1159/000358776.

Humphrey, Sue P.; Williamson, Russell T (2001). *A review of saliva: Normal composition, flow, and function*, The journal of prosthetic dentistry 85:162-9, DOI:10.1067/mpr.2001.113778, Estados Unidos.

Ivkovic, N.; Racic, M. (2015). *Biomarkers of Stress in Saliva*. Acta Facultatis Medicae Naissensis, 2015; 32(2):91-99, DOI: 10.1515/afmnai-2015-0010.

Jasim, Hajer; Carlsson, Anders; Carlsson, Hedenberg-Magnusson ,Britt; Ghafouri, Bijar; Ernberg, Malin (2018). *Saliva as a medium to detect and measure biomarkers related to pain*, Scientific Reports, DOI:10.1038/s41598-018-21131-4, Suécia.

Karp, Natacha A.; Griffin, Julian L.; Lilley, Kathryn S (2005). *Application of partial least squares discriminant analysis to two-dimensional difference gel studies in expression proteomics*, Proteomics 5, 81–90, DOI 10.1002/pmic.200400881, Cambridge.

Kessler, Alexander T and Bhatt Alok A (2018). *Review of the Major and Minor Salivary Glands, Part 1: Anatomy, Infectious, and Inflammatory Processes*, Journal of clinical imaging science, 8:47, DOI:10.4103/jcis.JCIS\_45\_18.

Khan, Sayeda F.; Katti, Girish; Baba, Irfan; Khan, Naved (2016). *Age-related changes of salivary IgA among healthy subjects*, Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology, 27:203-6, DOI:10.4103/0972-1363.170138.

Koduru, Mallikarjuna R.; Ramesh, Amitha; Adapa, Swathi; Shetty, Jayarama (2017). *Salivary Albumin as a Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma and Chronic Periodontitis*, Annals of Medical and Health Sciences Research, India.

Lamy, Elsa; Capela, F.; Graça, G.; Costa, G.; Coelho, A. V.; Baptista, E. S (2007). *Utilização da proteômica para compreender o comportamento*, Revista de Ciências Agrárias.

Lamy, E. C.; Rodrigues, L. A.; Amado, F. M (2017). *O Envolvimento de Proteínas Salivares na Sensibilidade Gustativa*, O Envolvimento de Proteínas Salivares na Sensibilidade Gustativa, Évora.

Lemos, I. A.; Silva Júnior, J. G.; Spisso, B. F (2017). *Avaliação de Métodos Espectrofotométricos para a Determinação de Proteínas em Polissacarídeo Capsular de Haemophilus influenzae Tipo b (PRP)*, Revista Virtual de Química, 9 (6).

Lima, W (2019). *Proteoma salivar como fonte de biomarcadores de ingestão?*, Trabalho de estágio de licenciatura em Bioquímica, Universidade de Évora.

Loo, J. A.; Yan, W.; Ramachandran, P.; Wong, D. T (2010). *Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes*, International & American Associations for Dental Research 89(10):1016-1023, DOI: 10.1177/0022034510380414.

Lopes, C (2000). *Reprodutibilidade e Validação de um questionário semi-quantitativo de frequência de consumo alimentar. In: Alimentação e enfarte agudo do miocárdio: um estudo caso-controlo de base populacional*, Tese de Doutoramento, Universidade do Porto 2000. p.79-115.

Lucena, Sónia; Coelho, A. V.; Capela, F. S.; Tvarijonaviciute, A.; Lamy, E (2018). *The Effect of Breed, Gender, and Acid Stimulation in Dog Saliva*, BioMed Research International, 7456894, doi.org/10.1155/2018/7456894.

Malek, Khairuddin; Norazan, Muadz; Ramaness P.; Othman, Nor Zalina; Malek, RoslindaAbd; Aziz, Ramlan; Aladdin, Azzam; Enshasy, Hesham El (2016). *Cysteine Proteases from Carica papaya: An important enzyme group of many industrial applications*, IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS) e-ISSN:2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Volume 11, Issue 2 Ver. I, DOI: 10.9790/3008-11211116.

Mandel, Abigail L.; Des Gachons, Catherine P.; Plank, Kimberly L.; Alarcon, Suzanne; Breslin, Paul A. S (2010), *Individual Differences inAMY1Gene Copy Number, SalivaryAmylase Levels, and the Perception of OralStarch*, Plosone, doi.org/10.1371/journal.pone.0013352, Estados Unidos.

Martini, Daniela; Gallo, Alessia; Vella, Serena; Sernissi, Francesca; Cecchettini, Antonella; Luciano, Nicoletta; Polizzi, Enza; Conaldi, Pier G.; Mosca, Marta; Baldini, Chiara (2017). *Cystatin S—a candidate biomarker for severity of submandibular gland involvement in Sjögren's syndrome*, Rheumatology 2017;56:1031\_1038, doi:10.1093/rheumatology/kew501.

Méjean, Caroline; Morzel, Martine; Neyraud, Eric; Issanchou, Sylvie; Martin, Christophe; Bozonnet, Sophie; Urbano, Christine; Schlich, Pascal; Herberg, Serge; Péneau, Sandrine; Feron, Gilles (2015). *Salivary Composition Is Associated with Liking and Usual Nutrient Intake*, Plos One 10(9): e0137473 doi:10.1371.

Morzel, Martine; Truntzer, Caroline; Neyrauda, Eric; Brignot, Hélène; Ducoroy, Patrick; Lucchi, Géraldine; Canlet, Cécile; Gaillard, Ségolène; Nicod, Florian; Nicklaus, Sophie; Peretti, Noël; Feron, Gilles (2017). *Associations between food consumption patterns and saliva composition: Specificities of eating difficulties children*, Physiology & Behavior 173 (2017) 116–123, doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.005.

Mosca, Ana C.; Feron, Gilles; Chen, Jianshe (2019). *Saliva and Food Oral Processing*, Journal of Texture Studies. 2019;50:4–5, DOI: 10.1111/jtxs.12389.

Naorunroj, S.; Slade, GD.; Divaris, D.; Heiss, G.; Offenbacher S.; Beck, JD (2017). *Racial Differences in Periodontal Disease and 10-Year Self-Reported Tooth Loss among Late Middle-Aged and Older Adults: The Dental ARIC Study*, J Public Health Dent, 77(4): 372–382. doi:10.1111/jphd.12226.

Natarajan, Sudha; Remick, Daniel G (2008). *The ELISA Standard Save: Calculation of sample concentrations in assays with a failed standard curve*, National Institutes of Health- J Immunol Methods 336(2): 242–245, doi:10.1016/j.jim.2008.04.001.

Nedelkov, Dobrin; Kiernan, Urban A.; Niederkofler, Eric E.; Tubbs, Kemmons A.; Nelson, Randall W (2005). *Investigating diversity in human plasma proteins*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug 2; 102(31): 10852–1085, doi: 10.1073/pnas.0500426102.

Nouroozi, R. V.; Noroozi, M. V.; Ahmadizadeh, M (2015). *Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay*, International Electronic Journal of Medicine, 4(1), Iram.

Ohshiro, Kazufumi; Rosenthal, David I.; Koomen John M.; Streckfus, Charles F.; Chambers, Mark; Kobayashi, Ryuji; El-Naggar, Adel K (2007). *Pre-analytic saliva processing affect proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma*, International Journal of Oncology 30: 743-749, Estados Unidos.

Oliveira, Adelianna S.; Xavier-Filho, José; Sales, Maurício P (2003). *Cysteine Proteinases and cystatins*, Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol.46, n.1:pp.91-104, doi.org/10.1590/S1516-89132003000100014..

Ooi Yin Ai1; Priyanka, P.; Sabitha, Gokulraj (2018). *Saliva as Biomarkers*, Journal of Academy of Dental Education, 25–29; DOI: 10.18311/jade/2017/20170.

Pais, J (2019). *Biomarcadores salivares de ingestão: as variações no proteoma salivar e sua relação com a ingestão de vinho*; Trabalho de estágio da licenciatura em Biotecnologia, Universidade de Évora.

Panawala, Lakna (2017); *Difference Between Simple and Complex Carbohydrates*, ResearchGate.

Pappa, Eftychia; Vastardis, Heleni; Mermelekas, George; Gerasimidi-Vazeou, Andriani; Zoidakis, Jerome; Vougas, Konstantinos (2018). *Saliva Proteomics Analysis Offers Insights on Type 1 Diabetes Pathology in a Pediatric Population*, Frontiers in Physiology, doi: 10.3389/fphys.2018.00444, Grécia.

Rodrigues, L.; Lamy, L.; Amado, F.; Pinheiro, C (2017). *O Envolvimento de Proteínas Salivares na Sensibilidade Gustativa*, Tese apresentada à Universidade de Évora.

Sahu, Gopal K.; Upadhyay, Seema; Panna, Shradha M (2013). *Salivary Alpha Amylase Activity in Human Beings of Different Age Groups Subjected to Psychological Stress*, Ind J Clin Biochem 485–490, DOI 10.1007/s12291-013-0388-y.

Shaile, Mulki; Prakash Pai G.; Shetty, Pushparaj (2013). *Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis*, Journal of Indian Society Periodontol 17(1): 42–46, doi: 10.4103/0972-124X.107473.

Sakaguchi, K.; Yokota, H.; Miyasho, T.; Maeda, N.; Nakamura, K.; Onaga, T.; Koiwa, M.; Matsuda, K.; Okamoto, M.; Hirayama, K.; Taniyama, H (2013). *Polymeric immunoglobulin receptor expression and local immunoglobulin A production in bovine sublingual, submandibular and parotid salivary glands*, The Veterinary Journal 197 (2013) 291–296, doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.030.

Santos, J. L.; Saus E.; Smalley S.V.; Cataldo L.R.; Alberti G.; Parada J.; Gratacòs M.; Estivill X.; *Copy number polymorphism of the salivary amylase gene: implications in human nutrition research*, J Nutrigenet Nutrigenomics, 2012;5(3):117-31, doi: 10.1159/000339951.

Sharif, Rabab; Bak-Nielsen, Sashia; Sejersen, Henrik; Ding, Kai; Hjortdal, Jesper; Karamichos, Dimitrios (2018). *Prolactin-Induced Protein is a novel biomarker for Keratoconus*, Experimental Eye Research, S0014-4835(18)30640-7, doi.org/10.1016/j.exer.2018.10.015.

Sun, Fanyue; Reichenberger, Ernst J (2014). *Saliva as a Source of Genomic DNA for Genetic Studies: Review of Current Methods and Applications*, Oral health and dental management.

Tandon, Ankita; Singh, Narendra N.; Sreedhar, Gadiputi (2013). *Minor salivary glands and dental caries: Approach towards a new horizon*, Journal of natural science, Biology and Medicine, 4(2):364-368, doi:10.4103/0976-9668.117000.

Tarragon, Ernesto; Stein, Jakob; Meyer, Jobst (2018) *Basal Levels of Salivary Alpha-Amylase Are Associated with Preference for Foods High in Sugar and Anthropometric Markers of Cardiovascular Risk*, Behavioral Sciences 8, 94, doi:10.3390/bs8100094.

Tian, Na; Messana, Irene; Leffler, Daniel A.; Kelly, Ciaran P.; Hansen, Joshua; Cabras, Tiziana; D'Alessandro, Alfredo; Schuppan, Detlef; Castagnola, Massimo; Helmerhorst, Eva J (2015). *Salivary proline-rich proteins and gluten: Do structural similarities suggest a role in celiac disease?*, Proteomics Clin Appl. 2015 October; 9(0): 953–964. doi:10.1002/prca.201400170.

Tomečková, Vladimíra; Krajčíková, Kristína; Dolinská, Slavomíra; Komanický, Vladimír; Samuely, Tomáš (2017). *The Effect of Different Diet on Saliva*, Scientific Research Publishing, DOI: 10.4236/sar.2017.54004.

Urbaniak, Anna; Jablonska, Karolina; Podhorska-Okolow, Marzenna; Ugorski, Maciej; Dziegiel, Piotr (2018). *Prolactin-induced protein (PIP)-characterization and role in breast cancer progression*, Am J Cancer Res, 2018;8(11):2150-2164.

Vaziri, P.B.; Vahedi, M.; Abdollahzadeh, S. H.; Abdolsamadi, H. R.; Hajilooi, M.; Kasraee, S. H (2009). *Evaluation of Salivary Albumin in Diabetic Patients*, Iranian J Publ Health, Vol. 38, No.3, 2009, pp.54-59.

Vieira, Viviane L.; Gregório, Maria J.; Cervato-Mancuso, Ana M.; Graça, António P. S. R (2013). *Ações de alimentação e nutrição e sua interface com segurança alimentar e nutricional: uma comparação entre Brasil e Portugal TT - Food and nutrition actions and their interface with food security: a comparison between Brazil and Portugal*, Saúde e Sociedade, 22(2), 603–607. Retrieved from [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010412902013000200028&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org/pdf/sausoc/v22n2/v22n2a28](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010412902013000200028&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org/pdf/sausoc/v22n2/v22n2a28)

Vilela, Sofia; Santos, Susana; Padrão, Patrícia; Caraher, Martin (2014). *Length of Migration and Eating Habits of Portuguese University Students Living in London, United Kingdom*, Ecology of Food and Nutrition, 53(4), 419-435, doi.org/10.1080/03670244.2013.834818.

Vitorino, R.; de Moraes, G. S.; Ferreira, R.; Lobo, M.J.C.; Duarte, J.; Ferrer-Correia, A. J.; Tomer, K.B.; Domingues, P. M.; Amado, F. M. L (2006). *Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility*, Eur J Oral Sci 2006; 114:147–153, doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00328.x.

Williams, Johnny A.; Bartoshuk, Linda M.; Fillingim, Roger B.; Dotson Cedrick D (2016). *Exploring Ethnic Differences in Taste Perception*, Chemical Senses, Volume 41, Issue 5, June 2016, Pages 449–456, doi.org/10.1093/chemse/bjw021.

Woollard, David C; Indyk, Harvey E (2013), *Biotin Analysis in Dairy Products*, ResearchGate, Nova Zelandia.

Wong, D. T. (2009). *Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases*. Estados Unidos.

Wu, Bei; Liang, Jersey; Plassman, Brenda L.; Remle, Corey R.; Bai, Lina (2011). *Oral health among white, black, and Mexican-American elders: an examination of edentulism and dental caries*, J Public Health Dent, 71(4): 308–317. doi:10.1111/j.1752-7325.2011.00273.x.

Yoshizawa, Janice M.; Schafer, Christopher A.; Schafer, Jason J.; Farrell, James J.; Paster, Bruce J.; Wong, David T. W (2013). *Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities*, Clinical Microbiology Reviews p. 781–791, doi:10.1128/CMR.00021-13, Estados Unidos.

## 7. Anexos

# Anexo I

## ➤ Questionário de frequência alimentar



18535

ID

O questionário seguinte tem como objectivo avaliar a sua alimentação. Por favor, procure responder às questões de uma forma sincera, indicando aquilo que realmente come e não o que gostaria de comer, ou pensa que seria correcto comer.

O questionário pretende identificar o consumo de alimentos do ano anterior. Assim para cada alimento, deve assinalar, no respectivo círculo, quantas vezes por dia, semana ou mês comeu em média, nos últimos 12 meses, cada um dos alimentos referidos nesta lista. Não se esqueça de assinalar os alimentos que nunca comeu, ou que come menos de 1 vez por mês na coluna nunca ou menos de 1 por mês.

Não se esqueça de ter em conta não só as vezes que o alimento é consumido sozinho mas também, aquelas em que é adicionado a outros alimentos ou pratos (ex: o café do café com leite, os ovos das omeletas, etc).

Para os alimentos que só comeu em determinadas épocas do ano (por ex: cerejas ou diospiros), assinale as vezes em que comeu o alimento nessa época, colocando uma cruz (x) na última coluna (Sazonal).

No item nº 86, anote a frequência com que comeu sopa de legumes. Quando consome caldo verde, canja ou sopa instantânea, com uma frequência de pelo menos 1 vez por semana, deve assinalar a frequência com que comeu este alimento no quadro existente para "OUTROS ALIMENTOS", tendo o cuidado de não o contar na frequência que refere para a sopa de legumes.

Se houver algum alimento não mencionado na lista de alimentos e que tenha consumido pelo menos 1 vez por semana, assinale, no quadro que existe para "OUTROS ALIMENTOS", a respectiva frequência e indique a quantidade média que costuma comer de cada vez. Por ex: frutos tropicais, sumos de fruta natural, farinha de pau, canja, alheiras, cevada, rebuçados, etc.

Por exemplo: Uma pessoa que bebe leite 2 vezes por dia e o leite que bebe é meio gordo, se a maior parte dos gelados que come é no verão e nessa época come um gelado por dia deve assinalar:

I. PRODUTOS LÁCTEOS	Porção Média	Frequência alimentar								Sazonal	
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia		6 ou mais por dia
1. Leite gordo	1 chávena - 250 ml	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
2. Leite meio-gordo	1 chávena - 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
3. Leite magro	1 chávena - 250 ml	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
7. Gelados	Um ou 2 bolas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Preencha assim:

Não preencha assim:

Por exemplo: se come sopa uma vez por dia, mas 1 vez por semana é canja e não sopa de legumes assinala:

VIII. BEBIDAS E MISCELANEAS	Porção Média	Frequência alimentar								Sazonal	
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia		6 ou mais por dia
86. Sopa de legumes	1 prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

OUTROS ALIMENTOS	Porção Média	Frequência alimentar								Sazonal	
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia		6 ou mais por dia
CANJA	PRATO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>







18535

ID 

Pense nos últimos 12 meses quantas vezes por dia, semana ou mês, em média, comeu cada um dos alimentos referidos. Não se esqueça de assinalar os alimentos que nunca comeu, ou comeu menos de 1 vez por mês na coluna (Nunca ou menos de 1 por mês).

No grupo I. PRODUTOS LÁCTEOS - Não se esqueça de considerar o leite que bebe com o café (exemplo: meia de leite, galão,...).

I. PRODUTOS LÁCTEOS	Porção Média	Frequência alimentar								Assinalar	
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia		6 ou mais por dia
1. Leite gordo	1 chávena = 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
2. Leite meio-gordo	1 chávena = 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
3. Leite magro	1 chávena = 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
4. Iogurte	Um = 125g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
5. Queijo (de qualquer tipo incluindo queijo fresco e requeijão)	1 fatia = 30g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
6. Sobremesas lácteas: pudim flan, pudim de chocolate, etc	Um ou 1 prato de sobremesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
7. Gelados	Um ou 2 bolas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

No grupo II. OVOS, CARNES E PEIXES - considere também as vezes que come cada um destes alimentos como elementos de outros pratos, por exemplo: o frango do arroz de frango, os ovos das omeletas, as salsichas dos cachorros.

II. OVOS, CARNES E PEIXES	Porção Média	Frequência alimentar								Assinalar	
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia		6 ou mais por dia
8. Ovos	Um	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
9. Frango	2 peças ou 1/4 de frango	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
10. Peru, Coelho	1 porção ou 2 peças	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
11. Carne: vaca, porco, cabrito	1 porção = 120g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
12. Figado de vaca, porco, frango	1 porção = 120g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
13. Língua, Mão de vaca, Tripas, Chispe, Coração, Rim	1 porção = 100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
14. Fiambre, Chouriço, Salpicão, Presunto, etc	2 fatias ou 3 rodelas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
15. Salsichas	3 médias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
16. Toucinho, Bacon	2 fatias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
17. Peixe gordo: sardinha, cavala, carapau, salmão, etc	1 porção = 125g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
18. Peixe magro: pescada, faneca, dourada, etc	1 porção = 125g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
19. Bacalhau	1 posta média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
20. Peixe conserva: atum, sardinhas, etc	1 lata	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
21. Lulas, Polvo	1 porção = 100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
22. Camarão, Amêijoas, Mexilhão, etc	1 prato de sobremesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>





18535

ID 

No grupo III. ÓLEOS E GORDURAS - responda apenas ao que é adicionado em saladas, no prato, no pão, etc. e não considere a utilizada para cozinhar.

III. ÓLEOS E GORDURAS	Porção Média	Frequência alimentar									+ . . . . . . . . . .
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia	6 ou mais por dia	
23. Azeite	1 colher de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
24. Óleos: girassol, milho, soja	1 colher de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
25. Margarina	1 colher de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
26. Manteiga	1 colher de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

No grupo IV. PÃO CEREAIS E SIMILARES - não se esqueça de considerar também o que come fora das refeições, por exemplo: as batatas fritas da refeição e as que come fora das refeições.

IV. PÃO, CEREAIS E SIMILARES	Porção Média	Frequência alimentar									+ . . . . . . . . . .
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia	6 ou mais por dia	
27. Pão branco ou Tostas	Um ou 2 tostas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
28. Pão (ou tostas), integral, centeio, mistura	Um ou 2 tostas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
29. Broa, Broa de avintes	1 fatia - 80g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
30. Píccos cereais: muesli, corn-flakes, chocapic, etc.	1 chávena (sem leite)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
31. Arroz	½ prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
32. Massas: esparguete, macarrão, etc.	½ prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
33. Batatas fritas caseiras	½ prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
34. Batatas fritas de pacote	1 pacote pequeno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
35. Batatas cozidas, assadas, estufadas e puré	2 batatas médias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

No grupo V. DOCES E PASTÉIS - no item 42 (açúcar) considere quantas colheres ou pacotes de açúcar adiciona aos seus alimentos.

V. DOCES E PASTÉIS	Porção Média	Frequência alimentar									+ . . . . . . . . . .
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia	6 ou mais por dia	
36. Bolachas tipo maria, água e sal ou integrais	3 bolachas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
37. Outras bolachas ou Biscoitos	3 bolachas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
38. Croissant, Pasteis, Bolicao, Doughnut ou Bolos caseiros	Um; 1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
39. Chocolate (tablete ou em pó)	3 quadrado; 1 colher sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
40. Snacks de chocolate (Mars, Twix, Kit Kat, etc)	Um	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
41. Marmelada, Compota, Geleia, Mel	1 colher sobremesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
42. Açúcar	1 colher sobremesa; 1 pacote	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>





18535

ID 

No grupo VI - HORTALIÇAS E LEGUMES - responda pensando nos que são consumidos no prato (cozidos ou em saladas) e não nos que entram na confecção da sopa. Nos que come só numa determinada época do ano não se esqueça de assinalar na coluna sazonal (x).

VI. HORTALIÇAS E LEGUMES	Porção Média	Frequência alimentar									Sazonal
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia	6 ou mais por dia	
43. Couve branca, Couve lombarda	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
44. Penca, Tronchuda	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
45. Couve galega	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
46. Brócolos	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
47. Couve-flor, Couve-bruxelas	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
48. Grelos, Nabiças, Espinafres	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
49. Feijão verde	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
50. Alface, Agrião	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
51. Cebola	½ média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
52. Cenoura	1 média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
53. Nabo	1 médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
54. Tomate fresco	3 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
55. Pimento	6 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
56. Pepino	¼ médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
57. Leguminosas: feijão, grão de bico	1 chávena ou ½ prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
58. Ervilha em grão, Fava	½ chávena ou ¼ prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

No grupo VII - FRUTOS - recorde que para os alimentos que só comeu em determinadas épocas do ano (por exemplo, cerejas), deve assinalar as vezes em que comeu o alimento nessa época, colocando uma cruz (x) na última coluna (Sazonal).

VII. FRUTOS	Porção Média	Frequência alimentar									Sazonal
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia	6 ou mais por dia	
59. Maça, pêra	1 média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
60. Laranja, Tangerinas	1 média; 2 médias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
61. Banana	1 média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
62. Kiwi	1 médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
63. Morangos	1 chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
64. Cerejas	1 chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
65. Pêssego, Ameixa	1 médio; 3 médias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
66. Melão, Melancia	1 fatia média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
67. Diospiro	1 médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
68. Figo fresco, Nêspers, Damascos	3 médios	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
69. Uvas frescas	1 cacho médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
70. Frutos conserva: pêssego, ananás	2 metades ou rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
71. Amêndoas, Avelãs, Nozes, Amendóins, Pistachio, etc.	½ chávena descascado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
72. Azeitonas	6 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>





18535

ID 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

No grupo VIII - BEBIDAS E MISCELANEAS - neste grupo não considere os sumos naturais (estes devem ser registados na tabela "OUTROS ALIMENTOS"), não se esqueça dos que são adicionados a outras bebidas, por exemplo: considere aqui o café da meia de leite.

VIII. BEBIDAS E MISCELANEAS	Porção Média	Frequência alimentar								* + o - + *	
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia		6 ou mais por dia
73. Vinho	1 copo - 125ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
74. Cerveja	1 garrafa ou 1 lata	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
75. Bebidas brancas: whisky, aguardente, brandy, etc	1 cálice - 40 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
76. Coca-cola, Pepsi-cola ou outras	1 garrafa ou 1 lata	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
77. Ice-tea	1 garrafa ou 1 lata	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
78. Outros refrigerantes, Sumos de fruta ou Néctares embalados	1 garrafa ou 1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
79. Café (incluindo o adicionado a outras bebidas)	1 chávena café	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
80. Chá preto e verde	1 chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
81. Croquetes, Rissóis, Bolinhos de bacalhau, etc.	3 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
82. Maionese	1 colher sobremesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
83. Molho de tomate, ketchup	1 colher sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
84. Pizza	Meia pizza-média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
85. Hambúrguer	Um médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
86. Sopa de legumes	1 prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

Coloque neste quadro informação relativa aos restantes alimentos ou bebidas que não estejam na lista anterior e que tenha consumido pelo menos 1 vez por semana mesmo em pequenas quantidades, ou numa época em particular. Por exemplo: farinha de pau, canja, alheiras, farinheiras, frutos secos (figos, ameixas, alperces), cevada, etc.

OUTROS ALIMENTOS	Porção Média	Frequência alimentar								* + o - + *	
		Nunca ou menos de 1 por mês	1 a 3 por mês	1 por semana	2 a 4 por semana	5 a 6 por semana	1 por dia	2 a 3 por dia	4 a 5 por dia		6 ou mais por dia
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>



## Anexo II

### ➤ Recordatório das 24 horas

#### Questionário às 24h anteriores

A que horas se levantou ontem?

Pedia-lhe que respondesse com pormenor sobre tudo o que comeu e bebeu ontem, desde essa hora.

	Horas	O que comeu e bebeu	Quantidades	Local
Antes do pequeno almoço				
Pequeno almoço				
Meio da manhã				
Almoço				
Meio da tarde				
Jantar				
Ceia (ao longo da noite)				

## Anexo III

### ➤ Consentimento informado



#### CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO

Comparação do Proteoma Salivar entre Caucasianos (Portugueses) e Africanos (Cabo-Verdianos): Influência dos Hábitos Alimentares

Caro/a voluntário/a,

A equipa de investigação do laboratório de fisiologia animal aplicada da Universidade de Évora está a realizar um estudo sobre a “Comparação do Proteoma Salivar entre Caucasianos (Portugueses) e Africanos (Cabo-Verdianos): Influência dos Hábitos Alimentares”. A sua participação consiste na resposta a um questionário de frequência alimentar, ao preenchimento de um recordatório alimentar das 24h anteriores e à recolha de saliva, em condições de não-estimulação, para posterior avaliação, em laboratório, da composição proteica.

No decorrer do estudo será assegurado o devido respeito pelos cuidados éticos e deontológicos exigidos - o processo será mantido confidencial e os dados obtidos irão servir apenas para os efeitos desta investigação, não sendo tratados de forma individual mas sim no seu conjunto. Os dados serão processados de forma estatística e posteriormente divulgados em evento e/ou revista científica. Desejamos muito que participe neste projeto.

Desde já agradecemos a sua disponibilidade.

✂

Autorização:

Eu, \_\_\_\_\_ tendo lido e compreendido o objetivo e os procedimentos do estudo, autorizo/não autorizo (riscar o que não interessa), a participação neste estudo e que os dados recolhidos sejam utilizados para análise.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## Anexo IV

### ➤ Lista de nutrientes QFA



Unidade de Epidemiologia Nutricional  
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

#### Questionário de Frequência Alimentar

##### Lista de nutrientes e respectivas unidades

Nome variável	Descrição (unidades/dia)
CALORIES	Energia (kcal)
PROTEIN	Proteínas (g)
CARBOHYDRA	Hidratos de carbono (g)
FATTOTAL	Total de gordura (g)
SATURATEDF	Gordura Saturada (g)
MONOFAT	Gordura monoinsaturada (g)
POLYFAT	Gordura polinsaturada (g)
CHOLESTERO	Colesterol (mg)
DIETARYFIB	Fibra Alimentar (g)
COMPLEXCAR	Hidratos de carbono complexos (g)
SUGARS	Açúcares (g)
ALCOHOL	Alcool (g)
CAFFEINE	Cafeína (mg)
TOTALVITA	Total de vitamina A (RE)
ARETINOL	Retinol (RE)
ACAROTENOI	Carotenoides $\alpha$ (RE)
THIAMINB1	Tiamina B1 (mg)
RIBOFLAVIN	Riboflavina B2 (mg)
NIACINB3	Niacina B3 (mg)
NIACINEQUI	Equivalentes de Niacina (mg)
VITAMINB6	Vitamina B6 (mg)
VITAMINB12	Vitamina B12 (mcg)
FOLATE	Folato (mcg)
PANTOTHENI	Ácido Pantoténico (mg)
VITAMINC	Vitamina C (mg)
VITAMIND	Vitamina D (mcg)
VITEALPHA E	Vitamina E (mg)
VITAMINK	Vitamina K (mcg)
CALCIUM	Cálcio (mg)
COPPER	Cobre (mg)
IRON	Ferro (mg)
MAGNESIUM	Magnésio (mg)
MANGANESE	Manganésio (mcg)
PHOSPHORUS	Fósforo (mg)
POTASSIUM	Potássio (mg)
SELENIUM	Selénio (mcg)
SODIUM1	Sódio intrínseco (mg)
SODIUM2	Estimativa sódio intrínseco + adicionado confecção (mg)
ZINC	Zinco (mg)
WATER	Água (%)
BIOTIN	Biotina (mcg)
BORON	Boro (mg)
CHLORIDE	Cloro (mg)
CHROMIUM	Crómio (mcg)
FLUORIDE	Flúor
IODINE	Iodo (mcg)
MOLYBDENUM	Molibdénio (mcg)

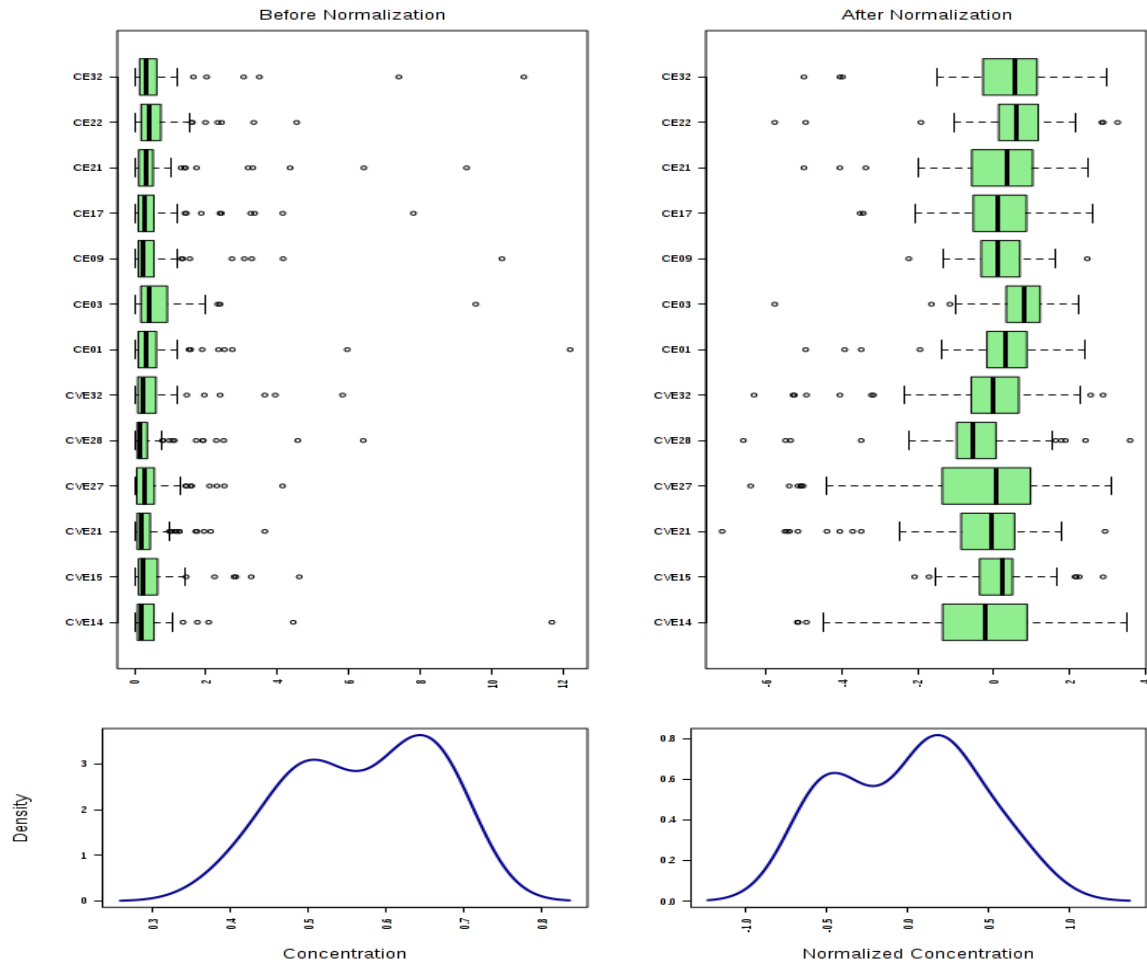


INSOLFIBER	Fibra insolúvel (g)
SOLUBLEFIB	Fibra solúvel (g)
ALANINE	Alanina (g)
ARGININE	Arginina (g)
ASPARTATE	Aspartato (g)
CYSTINE	Cistina (g)
GLUTAMATE	Glutamato (g)
GLYCINE	Glicina (g)
HISTIDINE	Histidina (g)
ISOLEUCINE	Isoleucina (g)
LEUCINE	Leucina (g)
LYSINE	Lisina (g)
METHIONINE	Metionina (g)
PHENYLALAN	Fenilalanina (g)
PROLINE	Prolina (g)
SERINE	Serina (g)
THREONINE	Treonina (g)
TRYPTOPHAN	Triptofano (g)
TYROSINE	Tirosina (g)
VALINE	Valina (g)
N40BUTRIC	Ácido Bútrico (g)
N60CAPRIOIC	Ácido Caproico (g)
N80CAPRYLI	Ácido Caprílico (g)
N100CAPRIC	Ácido Capríco (g)
N120LAURIC	Ácido Laurico (g)
N140MYRIST	Ácido Mirístico (g)
N160PALMIT	Ácido Palmítico (g)
N180STEARI	Ácido Estearico (g)
N200ARACHI	Ácido Araquídico (g)
N220BEHENA	Behenate (g)
N141MYRIST	Ácido Miristoleico (g)
N161PALMIT	Ácido Palmitol (g)
N181OLEIC	Ácido Oleico (g)
N201EICOSE	Ácido Eicosanoico (g)
N221ERUCIC	Ácido Erucico (g)
N182LINOLE	Ácido Linoleico (g)
N183LINOLE	Ácido Linolenico (g)
N184STEARI	Ácido Estearidónico (g)
N204ARACHI	Ácido Araquídónico (g)
N205EPA	Ácido Eicosopentanóico (g)
N225DPA	Ácido docosopentanóico (g)
N226DHA	Ácido docosohexanóico (g)
TRANSFA	Ácidos gordos Trans (g)
OMEGA3FA	Ácidos gordos ómega 3 (g)
OMEGA6FA	Ácidos gordos ómega 6 (g)
ASH	Cinza (g)
GRAMWEIGHT	Quantidade total de alimentos (g)



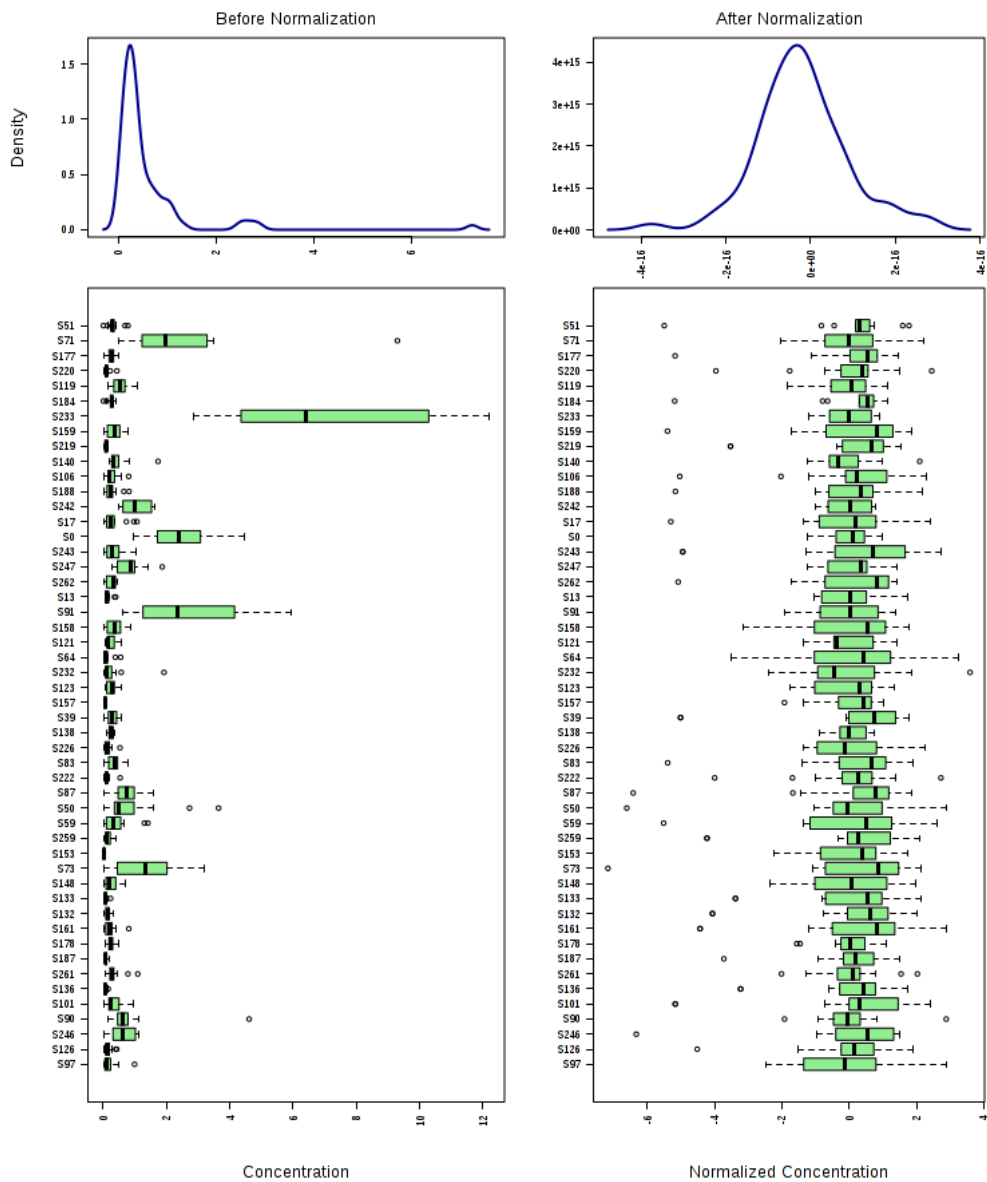
# Anexo V

➤ Gráfico que demonstra a normalização dos dados realizados (indivíduos)



# Anexo VI

➤ Gráfico que demonstra a normalização dos dados realizados (spot)



## Anexo VII

- Resultados (média/desvio padrão) dos itens do Questionário da frequência alimentar.

<b>Questionário de Frequência alimentar</b>		
<b>I. Produtos lácteos</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
1. Leite gordo	8,7/42,09	6,2/28,44
2. Leite meio-gordo	60,9/84,91	181,5/190,96
3. Leite magro	51,9/86,03	15,9/55,51
4. Iogurte	30,8/32,07	39,8/55,51
5. Queijo (de qualquer tipo incluindo queijo fresco e requeijão)	24,6/38,56	13,8/18,58
6. Sobremesas lácteas: pudim flan, pudim de chocolate, etc	12,1/12,59	25,2/66,38
7. Gelado	11,6/19,26	6,5/11,98
Total lácteos	200,8/103,58	310,8/239,80

<b>II. Ovos, Carnes e Peixes</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
8. Ovos	15,6/12,50	16,6/14,16
9. Frango	48,6/30,92	54,4/47,17
10. Peru, Coelho	25,1/27,52	6,0/9,29
11. Carne: Porco, Vaca, Cabrito	41,4/36,77	39,4/52,40
12. Fígado de vaca, porco, frango	4,0/16,36	5,2/15,72
13. Língua, Mão de vaca, Tripas, Chispe, Coração, Rim	0,6/1,92	0,9/2,25
14. Fiambre, Chouriço, Salpicão, Presunto, etc	6,7/9,18	8,8/12,40
15. Salsichas	5,2/7,10	15,0/31,81
16. Toucinho, Bacon	2,1/2,27	1,4/1,99
17. Peixe gordo: sardinha, cavala, carapaus, salmão	13,1/13,49	14,1/36,28
18. Peixe magro: pescada, faneca, dourada, etc	12,8/11,97	6,8/7,81
19. Bacalhau	13,1/17,12	9,2/10,49
20. Peixe conserva: atum, sardinhas, etc	10,7/12,78	21,1/21,791
21. Lulas e polvo	4,9/3,96	2,4/3,59
22. Camarão, Amêijoas, Mexilião, etc	1,5/1,34	0,7/1,21
Carnes Total	149,2/76,49	148,9/106,07
Peixes total	57/43,89	59,8/74,15

<b>III. Óleos e gorduras</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
23. Azeite	13,4/12,33	12,0/10,97
24. Óleos: girassol, milho, soja	0,9/2,09	2,8/4,52
25. Margarina	1,0/2,28	0,7/1,42
26. Manteiga	2,9/3,29	2,1/2,32
Óleos e gorduras total	18,1/13,06	18,4/14,43

<b>IV. Pão, Cereais e Similares</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
27. Pão branco ou tostas	26,1/27,07	37,4/48,26
28. Pão (ou tostas), integral, centeio, mistura	29,8/38,14	23,1/56,31
29. Broa, Broa de avintes	4,4/8,69	1,4/2,94
30. Flocos cereais: muesli, corn-flakes, chocapic, etc.	13,7/13,08	14,9/18,85
31. Arroz	47,2/29,68	128,4/93,24
32. Massas: Esparguete, Macarão	51,0/26,64	68,0/75,20
33. Batatas fritas caseiras	10,3/9,74	11,3/18,87
34. Batatas fritas de pacote	4,6/5,56	5,4/7,72
35. Batatas cozidas, assadas, estufadas e puré	23,0/20,89	23,5/34,07
Pão, Cereais e similares Total	216,0/78,04	316/210,27

<b>V. Doces e Pasteis</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
36. Bolachas tipo maria, água e sal ou integrais	7,4/11,22	5,2/7,82
37. Outras bolachas ou Biscoitos	12,2/23,02	8,1/8,61
38. Croissant, Pasteis, Bolicão, Doughnut ou Bolos caseiros	14,3/29,88	9,6/11,72
39. Chocolate (tablete ou em pó)	3,8/4,52	3,7/6,18
40. Snacks de chocolate (Mars, Twix, Kit Kat, etc)	4,9/5,80	8,0/18,65
41. Marmelada, Compota, Geleia, Mel	2,6/3,94	2,4/5,48
42. Açúcar	2,1/2,87	5,2/6,01
Doces e pasteis Total	48,3/65,96	43,0/43,43

<b>VI. Hortaliças e Legumes</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
43. Couve branca, Couve lombarda	9,2/16,48	7,6/14,92
44. Penca, Tronchuda	7,3/28,27	1,7/7,52
45. Couve galega	4,3/11,99	1,9/4,58
46. Brócolos	14,6/36,77	8,1/13,41
47. Couve-flor, Couve-bruxelas	2,0/3,09	2,8/5,02
48. Grelhos, Nabijas, Espinafres	5,5/6,12	4,6/8,79
49. Feijão verde	5,1/5,36	8,1/13,24
50. Alface, Agrião	4,8/5,06	4,0/5,32
51. Cebola	30,3/37,25	53,6/51,75
52. Cenoura	31,3/36,28	31,0/32,62
53. Nabo	2,0/2,92	9,7/30,36
54. Tomate fresco	27,5/39,14	38,5/78,56
55. Pimento	8,2/9,78	11,7/18,63
56. Pepino	10,1/23,31	7,9/14,55
57. Leguminosas: feijão, grão de bico	34,7/42,92	44,5/41,26
58. Ervilha em grão, Fava	9,3/17,05	10,6/15,63
<b>Hortaliças e legumes Total</b>	<b>213,6/189,07</b>	<b>283,5/335,15</b>

<b>VII. Frutos</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
59. Maça, pêra	58,2/50,84	81,1/122,74
60. Laranja, tangerinas	45,0/78,62	38,8/56,74
61. Banana	42,0/34,13	51,1/41,58
62. Kiwi	11,0/19,87	5,9/12,55
63. Morangos	11,3/12,71	3,9/13,43
64. Cerejas	9,1/11,85	5,7/24,12
65. Pêssego, Ameixa	12,6/27,87	5,0/10,17
66. Melão, Melancia	17,6/26,79	5,5/14,43
67. Diospiro	5,7/11,05	1,7/6,71
68. Figo fresco, Nêspersas, Damascos	7,4/16,94	1,6/4,75
69. Uvas frescas	44,1/42,28	17,0/31,54
70. Frutos conserva: pêssego, ananás	1,9/3,81	4,8/10,13
71. Amêndoas, Avelãs, Nozes, Amendoins, Pistachio, etc	12,1/15,73	6,6/12,04
72. Azeitonas	2,1/2,84	2,0/4,63
<b>Frutos Total</b>	<b>300,7/234,19</b>	<b>192,6/156,10</b>

<b>VIII. Bebidas e Miscelaneas</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
73. Vinho	5,5/5,76	7,7/11,92
74. Cerveja	32,8/50,12	14,2/18,28
75. Bebidas brancas: Whisky, aguardente, brandy	2,2/2,09	1,1/1,69
76. Coca-cola, Pepsi ou outras	57,9/78,11	93,6/143,82
77. Ice-tea	61,4/97,93	54,0/82,74
78. Outros refrigerantes, Sumos de fruta, ou Nectares embalados	15,5/18,46	19,5/35,41
79. Café (incluindo o adicionado a outras bebidas)	27,8/31,44	16,6/27,01
80. Chá preto e verde	28,3/68,72	30,0/93,95
81. Croquetes, Rissóis, Bolinhos de bacalhau, etc	8,3/9,44	7,7/10,64
82. Maionese	0,2/0,29	0,4/0,66
83. Molho de tomate, Ketchup	1,0/1,57	2,2/3,57
84. Pizza	25,3/27,58	25,9/35,90
85. Hamburguer	13,1/19,60	8,3/10,64
86. Sopa de legumes	152,0/135,22	70,5/98,58
Bebidas Total	329,7/401,31	264,2/282,63
Miscelaneas total	200,0/136,85	121,0/108,48

## Anexo VIII

- Resultados (média/desvio padrão) da parcela dos nutrientes correspondentes aos itens QFA.

<b>Nutrientes</b>	<b>Portugueses</b>	<b>Cabo-verdianos</b>
Calorias (kcal)	2081,6/581,58	2125/1005,97
Proteínas (g)	96,5/27,75	94,4/45,41
Hidratos de carbono(g)	228,5/77,34	263,8/156,75
Gordura total (g)	85,7/21,52	81,0/37,04
Gordura saturada (g)	25,9/8,00	24,3/12,18
Gordura monoinsaturada (g)	38,7/11,10	37,0/21,57
Gordura polinsaturada (g)	14,0/4,28	16,3/11,49
Colesterol (mg)	342,7/152,22	351,6/210,34
Fibra alimentar (g)	22,9/10,15	21,7/14,96
Hidratos de carbono complexos (g)	77,3/28,02	94,1/55,38
Açúcares (g)	97,1/37,20	112,9/78,66
Álcool (g)	6,9/18,13	2,1/2,80
Cafeína (mg)	41,5/31,61	32,8/35,19
Total Vitamina A (RE)	1980,5/1475,38	1942,9/1942
Retinol (RE)	703,4/1208	855,6/1242
Carotenoides $\alpha$ (RE)	1261,2/1025	1246,8/1498,02
Tiamina B1 (mg)	1,6/0,49	1,8/1,18
Riboflavina (mg)	1,9/0,67	2,2/1,26
Niacina B3 (mg)	24,4/7,19	26,2/16,58
Equivalentes de Niacina (mg)	24,6/7,22	26,5/16,98
Vitamina B6 (mg)	2,2/0,60	2,3/1,58
Vitamina B12 (mg)	9,9/9,11	9,9/10,11
Folato (mg)	330,3/151,10	369/301,08
Ácido Pantoténico (mg)	4,3/1,51	4,9/2,84
Vitamina C (mg)	117,3/68,74	104,1/73,68
Vitamina D (mcg)	3,8/1,78	5,1/6,10
Vitamina E (mcg)	9,7/3,55	10,0/6,78
Vitamina k (mcg)	12,6/7,14	17,7/10,60
Cálcio (mg)	781,0/280,92	849,9/4961,21
Cobre (mg)	1,7/0,73	1,7/1,25
Ferro (mg)	15,7/5,08	17,2/10,50
Magnésio (mg)	321,3/105,12	328,9/210,26
Manganésio (mcg)	3,5/1,25	3,6/2,68
Fósforo (mg)	1337,3/353,29	1440,0/843,03
Potássio (mg)	3059,1/988,41	3266,6/2242
Selénio (mcg)	101,1/33,73	107,0/75,58
Sódio intrínseco (mcg)	2012,1/629	2104/1325,77
Estimativa sódio intrínseco + adicionado confecção (mg)	3200,1/796,54	3365,5/1898,10
Zinco (mg)	12,2/3,79	12,9/7,72
Água (%)	1153,2/504,61	1237,6/837,79
Biotina (mcg)	6,8/2,88	9,2/5,61
Boro (mg)	3,6/2,58	4,7/3,71
Cloro (mg)	578,1/449,43	578,9/383,76
Crómio (mcg)	0,0/0,00	0,0/0,00
Flúor	0,0/0,00	0,0/0,00
Iodo (mcg)	44,1/25,77	73,4/55,62
Molibdénio (mcg)	5,4/2,93	7,9/4,89
Fibra insolúvel (g)	13,8/6,48	15,0/13,96
Fibra solúvel (g)	5,6/3,19	5,9/5,37

Alanina (g)	4,4/1,40	4,6/2,90
Arginina (g)	5,2/1,54	5,4/3,53
Aspartato (g)	8,1/2,37	8,4/5,43
Cistina (g)	1,1/0,32	1,2/0,70
Glutamato (g)	15,7/4,40	16,3/9,74
Glicina (g)	3,9/1,26	4,0/2,65
Histidina (g)	2,6/0,82	2,7/1,80
Isoleucina (g)	4,1/1,24	4,3/2,64
Leucina (g)	6,9/2,06	7,3/4,48
Lisina (g)	6,6/2,16	6,8/4,54
Metionina (g)	2,1/0,66	2,2/1,40
Fenilalanina (g)	3,8/1,11	4,0/2,45
Prolina (g)	5,2/1,61	5,3/3,03
Serina (g)	3,9/1,12	4,1/2,42
Treonina (g)	3,5/1,08	3,7/2,37
Triptofano (g)	1,0/0,31	1,1/0,66
Tirosina (g)	3,1/0,96	3,2/1,90
Valina (g)	4,8/1,43	5,1/3,49
Ácido Bútrico (g)	0,4/0,34	0,3/0,25
Ácido Caproico (g)	0,2/0,16	0,2/0,13
Ácido Caprilico (g)	0,1/0,11	0,1/0,09
Ácido Caprico (g)	0,3/0,24	0,3/0,22
Ácido Laurico (g)	0,4/0,22	0,4/0,24
Ácido Mirístico (g)	1,8/1,08	1,7/1,17
Ácido Palmítico (g)	13,7/3,98	13,7/8,63
Ácido Estearico (g)	5,7/1,88	5,9/3,99
Ácido Araquídico (g)	0,0/0,01	0,0/0,02
Behenate (g)	0,0/0,001	0,0/0,03
Ácido Miristoleico (g)	0,0/0,00	0,0/0,00
Ácido Palmitol (g)	1,5/0,51	1,5/1,10
Ácido Oleico (g)	33,3/10,48	31,3/18,71
Ácido Eicosanoico (g)	0,3/0,11	0,3/0,29
Ácido Erucico (g)	0,1/0,12	0,2/0,40
Ácido Linoleico (g)	10,5/3,52	12,0/9,13
Ácido Estearidónico (g)	1,1/0,33	1,3/0,89
Ácido Araquidónico (g)	0,0/0,01	0,0/0,03
Ácido Ecosopentanoico (g)	0,2/0,10	0,2/0,12
Ácido docosopentanoico (g)	0,1/0,08	0,1/0,23
Ácido docosohexanoico (g)	0,2/0,23	0,3/0,61
Ácidos gordos Trans (g)	0,2/0,15	0,3/0,42
Ácidos gordos ómega 3 (g)	1,1/0,55	1,0/0,62
Ácidos gordos ómega 6 (g)	10,8/3,55	12,4/9,33
Cinza (g)	19,7/15,92	17,6/11,17
Quantidade total de alimentos (g)	1737,3/707	1849/1132,12