



**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

**Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão**

Laura Regula Eustáquio Carreira

Orientador(es) | Cláudia Alexandra Colaço Lourenço Viegas  
Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

Évora 2019





**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

**Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão**

**Laura Regula Eustáquio Carreira**

Orientador(es) | Cláudia Alexandra Colaço Lourenço Viegas  
Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

Évora 2019

---

---

---

---



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

- Presidente | Célia M. Antunes (Universidade de Évora)
- Vogal | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy (Universidade de Évora)



Aos meus pais e à minha madrinha

“Toute réussite deguise une abdication.”

Simone de Beauvoir



## Apoios





## Agradecimentos

Gostaria de expressar o meu agradecimento à Universidade de Évora e ao ICAAM por ter tido a oportunidade de realizar a minha dissertação no laboratório de Fisiologia Animal Aplicada.

Quero agradecer à minha orientadora, Doutora Elsa Lamy pela ajuda, apoio, paciência, ensinamentos, por toda a simpatia, por toda a dedicação e disponibilidade que sempre demonstrou em orientar o meu trabalho. Muito obrigado por me ter dado a oportunidade de estar num laboratório com tão bom ambiente.

Quero agradecer também à minha coorientadora, a Doutora Cláudia Viegas por ter aceite coorientar o meu trabalho e por me dar um perspetiva diferente do trabalho.

Quero também deixar um agradecimento especial à Doutora Paula Castelo pela ajuda que me deu com o tratamento estatístico.

Gostaria, em especial, de agradecer a todos os funcionários com os quais convivi diariamente que sempre me ajudaram incansavelmente.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório, querendo deixar um agradecimento especial à minha colega Carla Simões, pela partilha de momentos difíceis e dos dias bons, um muito obrigada pelo apoio, pela amizade e pelos conselhos que levo para a vida. Agradeço também às minhas colegas de curso, Sara Conceição e Marta Otílio, pelo apoio, pelo desespero em conjunto e pela força em seguirmos sempre juntas.

E por último, mas não menos importante, à minha família! Tenho de agradecer-lhes tudo! O esforço realizado, o apoio que me deram, o ânimo quando as coisas corriam menos bem, por sempre acreditarem em mim. A vós devo tudo.



## Índice geral

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Abreviaturas e convenções</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão</b> .....	<b>ii</b>
<i><b>The influence of food odor in salivary proteome: the particular case of bread odor</b></i> .....	<b>iv</b>
<b>Capítulo I - Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Saliva</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Proteoma Salivar</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3. Saliva e consumo alimentar</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4. Relação entre o olfato e a percepção de alimentos e a salivação</b> .....	<b>13</b>
<b>Capítulo II - Problemática e Objetivos</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Problemática</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2. Objetivo geral</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3. Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>Capítulo III - Metodologia</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1. Estratégia</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.1. Local de realização</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.2. Apoio de financiamento</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.3. Período de realização</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.4. Modelo biológico</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2. Ensaio</b> .....	<b>25</b>

<b>3.2.1. Parâmetros analisados</b> .....	25
<b>3.2.2. Técnicas utilizadas</b> .....	26
□ Quantificação proteica pelo método de Bradford .....	26
□ Eletroforese bidimensional .....	26
□ Determinação da atividade enzimática da $\alpha$ - amilase .....	27
□ Quantificação do cortisol por ELISA .....	28
<b>3.3. Procedimento experimental</b> .....	28
<b>3.3.1. Desenho experimental</b> .....	29
<b>3.3.2. Recolha de amostras</b> .....	30
<b>3.3.3. Questionário emocional</b> .....	31
<b>3.3.4. Remoção do material insolúvel das amostras</b> .....	31
<b>3.3.5. Quantificação de proteína total</b> .....	32
<b>3.3.6. Separação proteica com recurso a eletroforese bidimensional</b> .....	33
<b>3.3.6.1. Preparação das amostras</b> .....	34
<b>3.3.6.2. Re-hidratação das tiras</b> .....	34
<b>3.3.6.3. Focagem das tiras</b> .....	34
<b>3.3.6.4. Equilíbrio e separação SDS-PAGE</b> .....	35
<b>3.3.7. Determinação da atividade enzimática da amilase</b> .....	36
<b>3.3.8. Quantificação do cortisol</b> .....	37
<b>3.3.9. Análise estatística</b> .....	37
<b>3.3.9.1. Avaliação da influência do contacto olfativo nas proteínas do proteoma salivar</b> .....	37
<b>3.3.9.1.1. Alterações entre os dois períodos de recolha</b> .....	38
<b>3.3.9.1.2. Interação entre os períodos e os tratamentos</b> .....	38
<b>3.3.9.2. Avaliação da relação entre a componente bioquímica da saliva e as emoções</b> .....	38

3.3.9.2.1. Análise fatorial – componentes principais .....	38
3.3.9.2.2. Correlações bivariadas .....	39
<b>Capítulo IV - Resultados.....</b>	<b>41</b>
4.1. Influência do odor no proteoma salivar .....	43
4.2. Relação entre as emoções e as alterações na componente bioquímica da saliva.....	59
4.2.1. Principais emoções sentidas .....	59
4.2.2. De que forma a saliva se associa às emoções? .....	61
<b>Capítulo V - Discussão .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo VI - Conclusão.....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo VII - Referências Bibliográficas .....</b>	<b>75</b>
<b>Capítulo VIII - Anexos .....</b>	<b>87</b>
Anexo I- Lista de reagentes.....	89
Anexo II- Lista de material.....	90
Anexo III- Lista de equipamentos .....	91
Anexo IV- Consentimento informado para participação em estudo de investigação .....	92
Anexo V- Questionário fornecido aos voluntários .....	94
Anexo VI- Níveis de saciedade percebida e tempo decorrido após a última refeição dos indivíduos do estudo. ....	97

## Índice de Figuras

Figura 1: Localização das glândulas salivares maiores: 1- glândula parótida; 2- glândula submandibular; 3- glândula sublingual (Roblegg <i>et al.</i> 2019).....	4
Figura 2: Anatomia de um ducto salivar (adaptado de Regezi <i>et al.</i> 2017).....	6
Figura 3: Localização da via retro e ortonasal. (adaptado de <a href="http://blog.monell.org/05/19/the-journey-from-wow/">http://blog.monell.org/05/19/the-journey-from-wow/</a> ). ....	15
Figura 4: Curva padrão de albumina de soro de bovino.....	33
Figura 5: Variação na taxa de secreção salivar (mL/min) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)]. ....	43
Figura 6: Variação na concentração proteica total ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)]. ....	44
Figura 7: Variação nos níveis de cortisol salivar ( $\mu\text{g/dL}$ ) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)]. ....	45
Figura 8: Variação da atividade enzimática da amilase (U/L) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)]......	46
Figura 9: Imagem representativa de um gel de eletroforese bidimensional com a localização de todos os <i>spots</i> que tinham alterações significativas (N=7).....	51
Figura 10: Imagem representativa de um gel bidimensional onde se encontram assinalados os <i>spots</i> que se encontram significativamente alterados por influência do cheiro do pão. [a azul os <i>spots</i> que se encontram aumentados após o estímulo e a vermelho os que se encontram diminuído após o estímulo (N=7)]......	53
Figura 11: Imagem representativa de um gel bidimensional onde se estão assinalados os <i>spots</i> que se encontram alterados pelo estímulo mastigatório do mesmo modo que se encontram alterados pelo estímulo olfativo. [a verde o <i>spot</i> que está, tendencialmente	

diminuído após o estímulo olfativo e mastigatório e a amarelo os que aumentam significativamente a sua expressão após o estímulo olfativo e mastigatório (N=7)]. ... 55

Figura 12: Variação na percentagem de volume dos *spots* para os quais houve interação significativa (p value < 0,05). [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado o estímulo olfativo, a verde o estímulo mastigatório com o pão e a amarelo o estímulo mastigatório com o arroz)]. ..... 59

Figura 13: Gráfico representativo das respostas dos voluntários relativamente às emoções sentidas no momento de contacto olfativo com o pão. As diferentes cores correspondem aos diferentes níveis de emoção percebida e os números em cada uma das barras indicam a percentagem de indivíduos para cada nível de resposta..... 60

Figura 14: Níveis de saciedade percebida pelos indivíduos no momento de recolha de saliva. .... 97

Figura 15: Tempo decorrido após a refeição que antecedeu as recolhas de saliva aos indivíduos. .... 97

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Preparação das solução com diferentes concentrações de BSA para a curva padrão. ....	32
Tabela 2: Volumes para a preparação das diluições das amostras.....	32
Tabela 3: Características da focagem isoeétrica.....	35
Tabela 4: Proteínas onde se observou variação nos níveis de expressão (% volume dos <i>spots</i> ), induzida pelos diferentes tratamentos. ....	47
Tabela 5: Proteínas que se encontram significativamente alteradas após o estímulo olfativo. ....	52
Tabela 6: Proteínas que se encontram alteradas após o estímulo olfativo e após o estímulo mastigatório, no mesmo sentido. ....	54
Tabela 7: Emoções que contribuem para a explicação de cada componente principal. ....	61

## Abreviaturas e convenções

- \*- significativo;
- AMP- adenosina monofosfato ( do Inglês “*adenosine monophosphate*”);
- APS – Persulfato de amónio (do Inglês “*ammonium persulfate*”);
- Bis- bisacrilamida;
- BSA – Albumina de soro de bovino ( do Inglês “*Bovine Serum Albumin*”);
- CA- anidrase carbónica (do Inglês “*carbonic anhydrase*”);
- CHAPS- Propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio (do Inglês “*3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate*”);
- DTT- Ditiotreitól (do Inglês “*Dithiothreitol*”);
- ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática (do Inglês “*Enzyme-linked immunosorbent assay*”);
- Ex- exemplo;
- HCl – Ácido clorídrico(do Inglês “*Hydrochloric acid*”);
- ICAAM- Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas;
- Id- identificação;
- IEF- Focagem isoelétrica (do Inglês “*Isoelectric focusing*”);
- Ig- imunoglobulina (do Inglês “*immunoglobulin*”);
- IPG buffer- Mistura de anfólitos;
- Milli Q- Água desionizada (ultrapura);
- MUC- mucinas (do Inglês “*Mucins*”);;
- N- Número de amostras;
- P- p-value;
- pH- Ponto de hidrogénio iónico;
- pI- Ponto isoelétrico;
- PRPs- Proteínas ricas em prolina (do Inglês “*protein rich in proline*”);
- SDS- Dodecil sulfato de sódio (do Inglês “*sodium dodecyl sulfate*”);
- SDS-PAGE – Electroforese desnaturante em gel de poliácridamida ( do Inglês “*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis*”);
- Temed- Tetrametiletilenodiamina (do Inglês “*Tetramethylethylenediamine*”).

## • Unidades

- %- Percentagem;
- $\mu\text{g}$ - Microgramas;
- $\mu\text{L}$ - Microlitro;
- Abs- absorvência;
- cm- centímetros;
- dL- decilitros;
- $g$  – Força centrífuga;
- $g$  – Gramas;
- h – Horas;
- kDa- Quilo-Dalton;
- L- Litro;
- M – Molar (mol/L);
- m/v- Massa/volume;
- mg- Micrograma;
- min – Minutos;
- mL – Mililitro;
- mM- Milimolar;
- nm – Nanómetro;
- $^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius;
- $R^2$ - coeficiente de correlação ajustado;
- rpm- Rotações por minuto;
- V -Volt;
- v/v- Volume/volume.
- $\Delta$ - variação (delta).

## **Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão**

### **Resumo**

Cheirar um alimento desencadeia emoções e a salivação. Contudo, não se sabe que alterações esse estímulo induz na composição proteica da saliva.

Este trabalho tem como objetivo identificar alterações induzidas pelo odor do pão no proteoma salivar, relacionando-as com emoções desencadeadas e avaliando a sua semelhança com a mastigação. As técnicas utilizadas foram: quantificação em proteína total, eletroforese bidimensional, ELISA e determinação de atividade enzimática.

Observaram-se aumentos nos níveis de expressão de *spots* proteicos de  $\alpha$ -amilase e cistatinas, com o cheiro, semelhantes às induzidas pela mastigação do mesmo alimento. Já os níveis de imunoglobulinas não diminuem com o cheiro, ao contrário da mastigação. O desejo desencadeado pelo odor do pão resultou em maiores aumentos de taxa de secreção, cortisol e amilase salivares. Conclui-se que, o proteoma salivar responde ao odor dos alimentos e que algumas alterações são semelhantes às resultantes da mastigação desse alimento.

**Palavras-chave:** Aroma alimentar; pão; proteômica salivar; percepção alimentar; eletroforese bidimensional



## ***The influence of food odor in salivary proteome: the particular case of bread odor***

### ***Abstract***

Smelling food causes emotions and induces salivation. However, it is not known which changes this stimulus causes in the salivary protein composition.

This paper aims to identify changes induced by bread odor in salivary proteome, relating them to perceived emotions and assessing their similarity with changes induced by chewing. The techniques used were: total protein quantification, two-dimensional electrophoresis, ELISA and enzymatic activity quantification.

Increases in expression levels of  $\alpha$ -amylase and cystatins' protein spots, induced by food odor were observed, which were similar to the ones induced by chewing the same food. Immunoglobulin levels do not decrease with odor, by opposition to chewing. The desire caused by the odor of bread resulted in higher increases in salivary secretion, cortisol and amylase rates. It is concluded that salivary proteome responds to food odor and some changes are similar to those resulting from chewing of this food.

***Keywords:*** Food aroma; Bread; Salivary proteomics; Food perception; Two-dimensional electrophoresis;





---

# Capítulo I - Introdução

---





## 1.1. Saliva

A saliva é um fluido transparente que banha toda a cavidade oral. É constituído por mais de 90% de água, levemente ácido (pH compreendido entre 6,2 – 7,4), composto por uma mistura dos fluidos resultantes da secreção exócrina das glândulas salivares maiores (glândulas submandibulares, sublinguais e parótidas), das glândulas salivares menores (como a glândula de Von Ebner, entre outras) e do fluido gengival crevicular (Huang, 2004; Schipper *et al.*, 2007; Neyraud *et al.*, 2011; Neyraud, 2014; El *et al.*, 2019). Esta saliva designa-se saliva total (Nater & Rohleder, 2009). Todas as glândulas possuem um elevado nível de vascularização que auxilia a troca de moléculas com o sangue por transporte ativo ou por difusão passiva (El *et al.*, 2019; Sturque *et al.*, 2019). As glândulas salivares são constituídas por células mioepiteliais, células acinares e ductos (Lamy, 2013). As células mioepiteliais estão ligadas aos ductos e às células acinares pela superfície externa e contraem para auxiliar na libertação de secreções (Ellis, 1991).

A saliva tem como função lubrificar a boca, proteger os dentes e toda a cavidade oral de micro lesões provocadas pelo atrito alimentar e/ou microrganismos patogénicos, ajuda na mastigação, na formação do bolo alimentar, na deglutição e na digestão, auxilia na perceção do aroma e do paladar, na fala e contribui para a homeostase e para o pH da cavidade oral, tem ação antibacteriana, antiviral e antifúngica (Huang, 2004; Neyraud *et al.*, 2011; Lamy, 2013; El *et al.*, 2019; Roblegg *et al.*, 2019).

É de salientar que a composição da saliva apresenta variabilidade inter-individual devido aos fatores intrínsecos de cada um, tal como a idade, o sexo, a dieta, o estado de saúde, o stress e o uso de prótese dentária (Mosca & Chen, 2017a). Embora exista esta variabilidade, a saliva é um fluido frequentemente estudado como tendo potencial para diagnóstico, por possuir moléculas que variam em função de determinadas situações, como por exemplo o cortisol que permite avaliar o stress, e por ser de recolha fácil e não invasiva (Zhang *et al.*, 2013; García-blanco *et al.*, 2016; Sienicka *et al.*, 2018). Existem algumas disfunções salivares como a xerostomia, que consiste na sensação de boca seca; a sialadenite, que é uma inflamação das glândulas salivares; e os cálculos na glândulas salivares semelhantes aos cálculos renais (Roblegg *et al.*, 2019).

Um adulto saudável produz diariamente entre 500 e 1000 mL de saliva com uma taxa de fluxo salivar entre os 300-400  $\mu\text{L}/\text{min}$  (El *et al.*, 2019).

O fluido salivar humano é constituído por eletrólitos, como o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio, o bicarbonato e os fosfatos; por proteínas, entre elas enzimas, mucinas, imunoglobulinas e por compostos azotados (Déléris *et al.*, 2016; Muñoz-González *et al.*, 2018). Os compostos azotados como a ureia e o amónio auxiliam na manutenção do pH e da capacidade tamponante da cavidade oral (Humphrey & Williamson, 2001). Na saliva também existem hormonas tais como a insulina, a glucagina, a leptina, a ocitocina, entre outras (Neyraud, 2014).

As glândulas salivares maiores (Figura 1) são compostas pelas glândulas parótidas, pelas glândulas submandibulares e pelas glândulas sublinguais (Huang, 2004). São responsáveis por produzir saliva, maioritariamente em resposta a estímulos nervosos, de entre os quais, os induzidos pela percepção alimentar. As glândulas maiores são inervadas quer pelo sistema autónomo simpático quer pelo parassimpático, sendo que este último com os seus recetores muscarínicos e colinérgicos é normalmente responsável pelo aumento do fluido salivar, enquanto que o sistema autónomo simpático com os recetores  $\beta$ -adrenérgicos é responsável pela síntese proteica (tais como os recetores de imunoglobulinas,  $\alpha$ -amilase, entre outros) (Emmelin N, 1987).

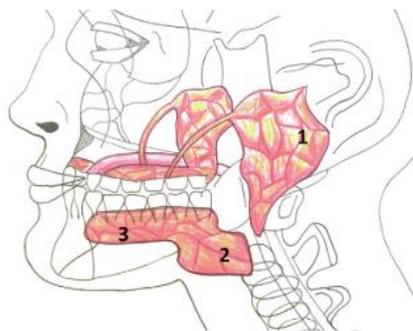


Figura 1: Localização das glândulas salivares maiores: 1- glândula parótida; 2- glândula submandibular; 3- glândula sublingual (Roblegg *et al.* 2019).

Nas glândulas submandibulares o fluido produzido é um fluido seromucoso. Estas glândulas estão localizadas sob a mandíbula, de cada um dos lados, como o próprio nome indica (Dinnella *et al.*, 2010). Pesam entre 7-16 g (cada) e possuem uma

consistência mais dura que as outras glândulas. São inervadas parassimpaticamente pelo nervo facial e simpaticamente, tal como as glândulas parótidas, pelo nervo espinhal (Sienicka *et al.*, 2018). Nalgumas espécies, de entre as quais se destacam os roedores, as glândulas submandibulares são constituídas por um tipo de ductos característicos, os ductos granulares (Ellis, 1991).

As glândulas sublinguais são responsáveis pela secreção de um fluido mucoso, sendo estas glândulas as mais pequenas dos três pares de glândulas salivares maiores, com cerca de 3-5 g (Dinnella *et al.*, 2010). Encontram-se por baixo da língua cobertas por uma membrana mucosa (Sienicka *et al.*, 2018). Estas glândulas produzem um fluido rico em glicoproteínas e pobre em enzimas (Leite, 2006).

As glândulas parótidas são as de maior tamanho, tendo entre 15-30 g, cada (Dinnella *et al.*, 2010). Produzem um fluido seroso, proveniente de células serosas (Wang *et al.*, 1994) e ficam localizadas de ambos os lados da cavidade oral, por baixo das orelhas e sensivelmente próximas das glândulas submandibulares. As glândulas parótidas encontram-se encapsuladas em tecido conjuntivo e são inervadas parassimpaticamente pelo nervo glossofaríngeo e simpaticamente pelo nervo espinal (Sienicka *et al.*, 2018). A saliva produzida por esta glândula não possui mucinas nem níveis elevados de outras glicoproteínas o que lhe confere uma viscoelasticidade perto do valor da água (Carpenter, 2013).

As glândulas salivares menores estão distribuídas pela mucosa oral, localizando-se em diferentes zonas como o lábio inferior, língua, palato, bochechas e faringe (Mosca & Chen, 2017b). As glândulas menores serosas são as glândulas de Von Ebner enquanto que todas as outras produzem um fluido mucoso (Carpenter, 2013).

As glândulas salivares maiores possuem um ducto principal (Figura 2) que se ramifica, dando origem a vários ductos estriados progressivamente menores, que por sua vez também se ramificam em ductos intercalares, terminado em ácidos (Ellis, 1991). Os ácidos são compostos de células acinares, as quais são responsáveis pela produção de saliva. (Ellis, 1991). As células acinares serosas produzem proteínas ricas em prolina, amilase, histatinas e cistatinas, que são fundamentais para o processo de ingestão de alimentos. Os ácidos das glândulas parótidas e as glândulas de Von Ebner são constituídas por estas células (Dinnella *et al.*, 2010). Já no que diz respeito às

células mucosas, estas produzem um fluido rico em mucinas que são responsáveis pela lubrificação (Dinnella *et al.*, 2010) . O processo de secreção das proteínas salivares é composto pela síntese, armazenamento e libertação. Cada uma destas fases é regulada pela fosforilação de proteínas alvo, como é o caso da proteína cinase A, que está dependente do AMP cíclico (Nater & Rohleder, 2009).

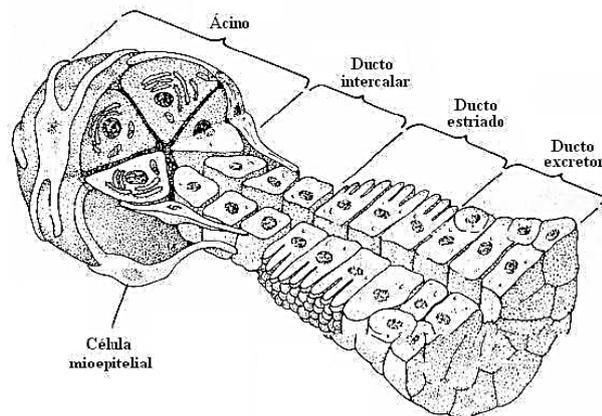


Figura 2: Anatomia de um ducto salivar (adaptado de Regezi *et al.* 2017).

As células acinares estão, constantemente, a expelir constituintes salivares, no entanto esta secreção pode ser aumentada ou diminuída por estímulos, maioritariamente provenientes dos nervos simpáticos ou parassimpáticos (Nater & Rohleder, 2009).

A grande maioria das proteínas, de origem glandular, são sintetizadas pelas células acinares, passando estas e eletrólitos para o sistema de ductos. Este movimento de íões no lúmen acinar dá origem a um gradiente osmótico, que resulta numa saída de água passivamente, para fora da célula. A solução que sai das células acinares é hipotónica. Nos ductos o sódio é, maioritariamente, reabsorvido enquanto que o potássio e o bicarbonato são excretados para o fluido final (Harris M, Edgar M, 1998).

Se esta saliva for produzida sem que seja em resposta a algum estímulo, designa-se saliva não estimulada e tem baixa taxa de fluxo salivar, 0.1 – 0.5 mL/min (Mosca & Chen, 2017a), e alta concentração de mucinas (Dinnella *et al.*, 2010). Nesta situação de ausência de estímulo, são as glândulas submandibulares que têm maior contribuição (Brandão *et al.*, 2014). Em situação de estimulação (mecânica ou sensorial), a taxa de

fluxo salivar é mais elevada, variando entre 1.0 – 3.0 mL/min (Mosca & Chen, 2017a), é segregada como resposta a um estímulo visual, olfativo, orofaríngeo ou esofágico. As glândulas parótidas têm uma contribuição elevada para a saliva estimulada (Dinnella *et al.*, 2010), a qual é libertada junto dos molares, ajudando assim na digestão (Carpenter, 2013). Em Humanos, a saliva recolhida é uma secreção mista, devido à anatomia dos ductos salivares. Todavia é possível recolher saliva glandular mas não de forma completamente não invasiva, e os sistemas que nos permitem fazê-lo diretamente da parótida, recolhem quantidades limitadas e é difícil fazê-lo sem estimulação (Carpenter, 2013).

## 1.2. Proteoma Salivar

A definição de proteoma diz respeito ao conjunto de proteínas sintetizadas por um organismo. O termo “proteoma” resulta da contração da palavra “PROteína” codificada por um determinado “genOME” (Esteves *et al.*, 2019).

O estudo do proteoma salivar começou a ganhar interesse há menos de 2 décadas, o que se deveu, por um lado aos grandes avanços no desenvolvimento de métodos e equipamentos, e conseqüentemente, na utilização de abordagens proteómicas, e por outro lado, às crescentes evidências de que a saliva pode ter potencial para utilização em diagnóstico (Amado *et al.*, 2013; Esteves *et al.*, 2019). Para além da utilização na pesquisa de biomarcadores de patologias orais e sistémicas, a saliva começa agora também a ser estudada em termos de envolvimento na ingestão e perceção dos alimentos.

O proteoma salivar é influenciado pela taxa de fluxo salivar, pelo ritmo circadiano, tipo e tamanho da glândula, duração e tipo de estímulo, dieta, a toma de medicamentos, nível de exercício físico, idade, sexo, tipo de sangue e estado fisiológico (Schipper *et al.*, 2007; El *et al.*, 2019; Sarkar *et al.*, 2019). Por isso, a mastigação, que se trata de um estímulo mecânico, induz a salivação (Carpenter, 2013).

Foram já identificadas mais de 3000 proteínas presentes na saliva (Amado *et al.*, 2013). As proteínas presentes na saliva são diversas, tais como a  $\alpha$ -amilase, albuminas, imunoglobulinas, lizosimas, histatinas, estaterinas, proteínas ricas em prolina,

aglutininas, enzimas com ação antimicrobiana, mucinas entre outras glicoproteínas, cistatinas (Huang, 2004; Lamy, 2013; Roblegg *et al.*, 2019). Grande parte das proteínas que constituem o proteoma salivar têm ação enzimática ou de transporte (Neyraud, 2014).

As abordagens usadas para o estudo do proteoma baseiam-se, principalmente, na separação proteica e na espectrometria de massa. Há abordagens “*gel-based*” e “*gel-free*”. As primeiras dizem respeito a abordagens que consistem na separação das proteínas, por eletroforese em gel, antes da sua identificação por espectrometria de massa, enquanto que nas “*gel-free*” a amostra é tratada sem que ocorra a separação das proteínas em gel (Rabilloud *et al.*, 2010; Scherp *et al.*, 2011; Lamy *et al.*, 2015a). Pode haver uma separação das proteínas prévia à espectrometria de massa, por cromatografia ou por eletroforese capilar, por exemplo, e pode haver uma digestão conjunta das proteínas constituintes da amostra, sendo a mistura resultante submetida a espectrometria de massa, para identificação das proteínas presentes. Esta última abordagem é aquela frequentemente usada quando se fala em estudos “*bottom-up*” ou de “*high throughput*”, pois permitem o “jorrar” de uma grande quantidade de informação (Rotilio *et al.*, 2012).

A abordagem baseada em gel consiste numa separação prévia das proteínas por eletroforese. Neste caso, pode fazer-se uma separação apenas numa dimensão, por massas moleculares (SDS-PAGE), ou por ponto isoelétrico da proteína (focagem isoelétrica), ou pode optar-se por uma separação das proteínas através de eletroforese bidimensional, permitindo uma maior separação. Neste último caso, as proteínas são separadas, numa primeira fase, pelo seu ponto isoelétrico nativo e numa segunda fase, pelas suas massas moleculares (Rabilloud & Lelong, 2011; Bernhardt, 2018). Os métodos baseados em gel apresentam a desvantagem de ser métodos morosos e exigentes, em termos de tempo. Para além disso, só permitem que se trabalhe com proteínas que tenham características de ponto isoelétrico e massa possíveis de ser separadas em gel. Ou seja, proteínas cujas massas estejam compreendidas entre os 250 e os 5kDa (Rotilio *et al.*, 2012). Também proteínas de pontos isoelétricos extremos, ou muito hidrofóbicas e difíceis de solubilizar, acabam por não ser passíveis de separação por eletroforese bidimensional (Rotilio *et al.*, 2012). No entanto, a eletroforese

bidimensional tem uma grande vantagem, a qual é particularmente importante para amostras como as de saliva, que é o facto de permitir a separação e visualização de diferentes formas de uma mesma proteína (por exemplo, resultantes de glicosilação, fosforilação, proteólise, etc.) (Görg *et al.*, 2004; Bernhardt, 2018). No caso da saliva (e de muitos outros fluidos corporais) várias proteínas existem nestas diferentes formas, podendo essas formas corresponder a funções diferentes, ou representar processos diferentes, informação essa que seria perdida usando uma abordagem de proteómica “gel-free” (Hu *et al.*, 2006).

De entre as proteínas que constituem o proteoma salivar, as mucinas são as glicoproteínas mais abundantes, sendo segregadas pelas glândulas submandibulares e pelas sublinguais (Carpenter, 2013). As mucinas têm uma elevada massa molecular com uma longa estrutura que confere viscoelasticidade à saliva (Carpenter, 2013). Estas glicoproteínas são fortemente glicosiladas possuindo vários domínios hidrofóbicos e são responsáveis pela lubrificação e pela proteção da cavidade oral (Mouta, 2011; El *et al.*, 2019). As glicoproteínas em questão são proteínas com ponto isoelétrico negativo, e como tal repelem-se mutuamente, no entanto na boca elas podem agregar-se porque o pH e os sais existentes na cavidade oral podem “mascarar” o ponto isoelétrico da proteína, e esta agregação pode alterar a viscosidade (Roblegg *et al.*, 2019). As mucinas (MUC) podem ser classificadas em solúveis e insolúveis. Dentro das solúveis, a MUC5B é a mucina mais abundante na saliva, sendo a que possui a maior massa molecular e é segregada nas glândulas submandibulares e sublinguais. A MUC7 possui aminoácidos como a serina, a prolina e a treonina. Dentro das insolúveis, existem a MUC4, MUC16 e a MUC1 que é segregada pelas glândulas salivares e também pelas células da superfície do epitélio (Roblegg *et al.*, 2019).

A  $\alpha$ -amilase é a enzima mais abundante na saliva, com estrutura tridimensional possui duas variantes, uma delas é glicosilada e a outra não, com massa molecular entre os 55 - 67 kDa (Nater & Rohleder, 2009; Ployon *et al.*, 2017a). É a enzima que está diretamente ligada à digestão alimentar, pois é a responsável pela degradação da ligação  $\alpha$ -1,4 do amido, transformando-o em maltose, o que desencadeia a digestão dos polissacarídeos no entanto, ao contactar com o ácido gástrico fica inibida (Carpenter, 2013). Esta enzima é segregada por todas as glândulas salivares, no entanto é mais

abundante na saliva proveniente das glândulas parótidas (Roblegg *et al.*, 2019). A amilase, por ter afinidade com a hidroxiapatite, ajuda na formação do esmalte (Vacca Smith & Bowen, 2000). Esta é ainda um biomarcador de stress sendo que a sua secreção é aumentada nessas situações (Nater & Rohleder, 2009; Petrakova *et al.*, 2015).

O papel das enzimas presentes na saliva é de atuação curta pois degrada o alimento, apenas durante o tempo em que este permanece na cavidade oral. E é durante esta degradação que algumas moléculas são libertadas e percebidas na cavidade oral, como a maltose que associamos ao gosto doce (Neyraud *et al.*, 2011).

Existem, também na saliva, outras proteínas tais como as proteínas ricas em prolina (PRPs), que podem ser básicas, ácidas ou glicosiladas, as estaterinas, as histatinas e as cistatinas. As cistatinas do tipo S, maioritariamente produzidas pelas glândulas submandibulares, são inibidoras de proteases e de lisozimas e a diminuição da sua expressão parece estar correlacionada com a perceção da cafeína (Neyraud, 2014), auxiliando também na proteção contra microrganismos. As estaterinas tal como as PRPs ácidas auxiliam na fixação do cálcio, enquanto a histatina é uma proteína que forma uma película que reveste o esmalte dentário e também controla o crescimento fúngico. As PRPs básicas foram referidas como tendo uma participação na ligação aos taninos. Nalgumas espécies animais, elas foram referidas como tendo funções de defesa contra os seus potenciais efeitos negativos, sendo capazes de “neutraliza-los” (Beverly *et al.*, 2012; Carpenter, 2013; Brandão *et al.*, 2014). Por esta sua capacidade de complexar taninos, as PRPs básicas foram referidas também como tendo um papel importante na perceção da adstringência. As PRPs são produzidas pelas glândulas parótidas, tanto as ácidas como as alcalinas, no entanto estas últimas também parecem ser produzidas nas submandibulares (Carpenter, 2013).

Existem proteínas que são comuns em todas as secreções salivares, independentemente da glândula onde esta seja produzida, tal como a proteína transportadora do principal anticorpo da saliva, a imunoglobulina A (Carpenter, 2013). Esta é produzida por células plasmáticas dos tecidos conjuntivos e são transportadas pelo recetor de imunoglobulinas poliméricas, pelas células acinares e ductais das

glândulas, posteriormente excretadas. As IgA combatem os microrganismos extrínsecos na cavidade oral (Roblegg *et al.*, 2019).

A anidrase carbônica é uma enzima que contribui para a manutenção do pH, pois neutraliza os ácidos provenientes do metabolismo bacteriano (Lamy, 2013; El *et al.*, 2019). Esta enzima foi também associada a indivíduos com variações na percepção do paladar dos alimentos (Neyraud, 2014), associação essa que se deve, em parte à sua capacidade para se ligar ao zinco. Déficits nesta proteína foram associados a menor ligação ao zinco e conseqüente menos desenvolvimento dos gomos gustativos (Henkin *et al.*, 1999; Patrikainen *et al.*, 2014; Morzel *et al.*, 2017). Esta enzima encontra-se também correlacionada com a percepção dos refrigerantes (Neyraud, 2014).

A lisozima é outra proteína abundante no proteoma e contribui para a imunidade salivar pois hidrolisa a parede celular das bactérias (El *et al.*, 2019).

As lípases digerem a gordura proveniente dos alimentos (El *et al.*, 2019). E há estudos que correlacionam a atividade da lipase em repouso com a percepção de soluções ricas em triglicérides, pois ao serem hidrolisados por esta libertam ácidos gordos (Neyraud, 2014).

### **1.3. Saliva e consumo alimentar**

Como já referido ao longo deste trabalho, alguns estudos têm sugerido a existência de relação entre a saliva e a percepção oral. Para além disso, há também associação entre a composição deste fluido e o tipo de alimentos consumido.

A relação da saliva com a percepção alimentar não pode ser ignorada. Durante a mastigação, o fluido que banha a cavidade oral mistura-se com os alimentos, servindo de solvente e de meio de transporte para que as partículas dissolvidas atinjam os locais de receção do gosto. Para além disso, os constituintes salivares, ao serem misturados com os alimentos, podem também interagir com estes, fazendo com que o que é percebido pelo indivíduo não sejam as características básicas do alimento, mas sim as características desta mistura (Neyraud, 2014). Sendo o paladar uma das propriedades organoléticas dos alimentos que definem a aceitabilidade do mesmo pelo consumidor

(Pagès-hélary *et al.*, 2014a), esta relação entre saliva e paladar pode ter uma importância maior em termos de percepção e aceitação dos alimentos.

Estudos como o de Davies *et al.*, 2009, demonstram que o papel da saliva no transporte das moléculas para os locais de recepção dos estímulos é muito importante, pois ter a boca hidratada é essencial para que o consumidor consiga entender as diferenças entre os alimentos.

Algumas proteínas produzidas por glândulas salivares menores, localizadas muito próximo de papilas gustativas, como é o caso das glândulas de Von Ebner, que se localizam junto das papilas circunvaladas, foram apontadas como grandemente responsáveis pela sensibilidade ao gosto amargo (Henkin *et al.*, 1999; Neyraud, 2014; Patrikainen *et al.*, 2014).

Alguns estudos realizados em ratinhos ilustram que a glândula submandibular e sublingual são menos reativas à composição da dieta, isto é, estas contribuem para o fluxo total salivar mas a sua resposta não altera tanto em função desta quanto a glândula parótida (Hall & Schneyer, 1964, citado por Carpenter, 2013). Existem três estímulos que induzem a salivação: o estímulo mecânico, isto é a mastigação, o estímulo gustativo, como por exemplo o estímulo ácido, e o estímulo olfativo, como por exemplo o aroma a baunilha (Mosca & Chen, 2017a). Nos últimos tempos têm surgido inúmeros estudos que tentam correlacionar a ingestão de diferentes alimentos com a alteração da composição salivar, isto porque percebeu-se que diferentes estímulos, sejam estes internos à cavidade oral, como a ação mecânica ou o sabor dos alimentos, ou externos à boca, como é o caso dos odores, podem causar alterações no proteoma salivar ou na taxa de fluxo (Engelen *et al.*, 2003).

Para além da relação entre anidrase carbónica VI (CA VI) e gosto amargo, referida anteriormente, a relação entre o proteoma salivar e a sensibilidade gustativa tem vindo a ser reforçada em estudos recentes. Proteínas como a CA VI, cistatinas e amilase, foram observadas como estando expressas em níveis diferentes em indivíduos muito e pouco sensíveis aos gostos amargo (Rodrigues *et al.*, 2017a) e doce (Rodrigues *et al.*, 2017b). Uma relação entre o proteoma salivar e a sensibilidade ao gosto foi também referida para o salgado (Stolle *et al.*, 2017). A relação entre a composição proteica da saliva e a alimentação foi também evidenciada em trabalhos que mostram

que populações com hábitos alimentares diferentes, nomeadamente populações que diferem no consumo de amido, apresentam cópias de genes para a proteína alfa-amilase em número diferente (Mandel et al., 2010; Santos et al., 2012). Esta relação entre hábitos alimentares e composição proteica da saliva é também suportada com a observação de proteomas salivares diferentes entre espécies animais com tipos de alimentação diferentes (ex. Shimada, 2006; Lamy et al., 2009).

Apesar de ainda existir um número limitado de estudos acerca do efeito que a alimentação tem no proteoma salivar, alguns estudos realizados no nosso laboratório vão no sentido de alterações nalgumas proteínas, após o consumo dos alimentos. Curiosamente, algumas dessas alterações parecem ser específicas do tipo de alimento consumido (Carreira, 2017).

O proteoma salivar parece apresentar também resposta de curto prazo a estímulos gustativos específicos. Neyraud et al., 2006 referiu alterações no proteoma salivar específicas do tipo de gosto básico testado.

## **1.4. Relação entre o olfato e a perceção de alimentos e a salivação**

Os alimentos possuem diversas propriedades organoléticas, entre as quais o cheiro ou odor. O odor é considerado um estímulo alimentar que desencadeia uma resposta em termos de salivação. Empiricamente isso é fácil de compreender, pelo grande aumento de volume de saliva que ocorre, numa situação de apetite, em presença do cheiro de um alimento apreciado. Há estudos que sugerem que o odor dos alimentos desencadeia uma resposta por parte das glândulas submandibular e sublingual (V. Lee & Linden, 1992; V. M. Lee & Linden, 1992; Ilangakoon & Carpenter, 2011). Sabe-se que a perceção que temos de um alimento na cavidade oral é a combinação da perceção do aroma, do paladar e da textura; como o odor interage com os outros sentidos presentes, torna o mecanismo de perceção alimentar mais complexo (Charles *et al.*, 2013). Tal como, quando se está a degustar um alimento não conseguimos isolar o paladar do odor do alimento, e a perceção que temos do alimento é a junção do paladar com o

olfato (Charles *et al.*, 2013), tal como ocorre com o odor e a textura, correlação que se tentou explicar no Roudnitzky *et al.* 2011.

O olfato tem um papel muito importante no nosso comportamento alimentar, não apenas no momento da ingestão, quando o odor atinge os recetores olfativos pela via retronasal, mas também no momento que o precede, pois a verdade é que os alimentos cujos odores nos são agradáveis podem estimular a salivação e até provocar apetite (Ployon *et al.*, 2017b; Proserpio *et al.*, 2017b). Verifica-se que o odor pode direcionar as nossas escolhas alimentares. Num estudo (Proserpio *et al.*, 2017a) observou-se que, como consequência da exposição a um ambiente com um aroma frutado, o individuo tendencialmente escolherá uma peça de fruta para ingerir.

Não só é importante a relação que a saliva tem com o odor, porque este último pode mudar a salivação, mas também porque a própria saliva pode afetar o aroma. Neste caso, a ação da saliva poderá ser no aroma que é percebido por via retronasal. Existem trabalhos que verificaram diferenças na percepção do odor dependentes da via pela qual atingem os recetores olfativos (Ployon *et al.*, 2017a). Há também que ter atenção ao facto dos compostos voláteis, para atingirem os recetores, precisarem de ser solubilizados pela saliva, o que vai originar um problema para os compostos hidrofóbicos, sendo assim necessária uma molécula capaz de solubilizar estes compostos. Uma molécula com estas características, existente na saliva, designa-se por lipocalina e tem a capacidade de transportar os compostos voláteis até aos recetores olfativos (Neyraud, 2014). Assim, a saliva pode complexar-se com voláteis libertados, aquando da mastigação, modulando a forma como os mesmos atingem o bolbo olfativo, para a sua deteção e percepção.

Recentemente, Muñoz-gonzález *et al.*, 2018 demonstraram que a composição da saliva influencia a libertação de compostos voláteis durante o consumo. E a interação das proteínas com estes pode modificar a sua libertação e percepção, dependendo da conformação da proteína e da modificação causada por ela. Por exemplo, a  $\beta$ -lactoglobulina inclui uma zona hidrofóbica o que vai permitir a ligação a ligantes hidrofóbicos (Ployon *et al.*, 2017b).

Assim, existem diversos fatores que podem influenciar a libertação de aromas na cavidade oral, como por exemplo, o volume existente na boca, o fluxo salivar e o fluxo

de ar (Genovese *et al.*, 2014), assim como as, anteriormente referidas, propriedades químicas das próprias moléculas voláteis presentes nos alimentos e as características físico-químicas destes últimos, que também contribuem para influenciar o aroma (Ployon *et al.*, 2017b). Estudos cujo objetivo é diferenciar o olfato ortonasal e o olfato retronasal (Figura 3), mostram que os recetores olfativos envolvidos na deteção destes são os mesmos (Charles *et al.*, 2013).

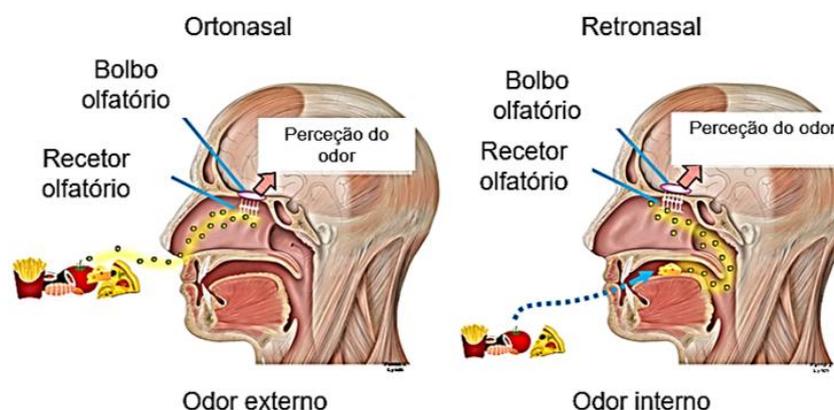


Figura 3: Localização da via retro e ortonasal. (adaptado de <http://blog.monell.org/05/19/the-journey-from-wow/>).

Tal como referido anteriormente, a percepção oral é um mecanismo complexo que é auxiliado pelos compostos voláteis dos alimentos (Poinot *et al.*, 2009). Os odores libertados pelos alimentos são uma mistura complexa de aromas e não um aroma monomolecular e a intensidade do odor está relacionada com a concentração da molécula odorífera (Ployon *et al.*, 2017b). A mistura de odores pode ser percebida como homogénea quando os vários odores se combinam e o que é percebido pelo indivíduo é um novo odor, ou percebida como heterogénea, onde o indivíduo consegue distinguir os vários odores da mistura. Também há a hipótese de perceber um odor como homogéneo e ele na realidade ser um mistura, cuja composição tem um odor muito intenso ou uma proporção tão elevada que “mascara” os odores menos intensos e abundantes (Ployon *et al.*, 2017b).

O odor dos alimentos tem uma grande influência no processo de aceitação e escolha dos mesmos, como já foi referido. Essa influência tem muito a ver com as emoções desencadeadas por esses alimentos.

A autora Sara Spinelli, tem estudado as emoções, mostrando que estas se relacionam com a forma como percebemos algumas características sensoriais e com a aceitação dos alimentos (Spinelli & Jaeger, 2019). A ligação entre as propriedades sensoriais de um alimento e as emoções depende da classe à qual o alimento pertence (Spinelli *et al.*, 2019). Scott e Burgess (2019) estudaram as emoções sentidas pelo painel de provadores aquando a de adição de pimenta a uma sopa, sendo que a emoção nojo foi aumentada e a sensação relaxado diminuída à medida que a concentração de pimenta na sopa aumentava (Scott & Burgess, 2019).

O efeito do cheiro nos níveis de cortisol ainda não se encontra muito descrito, no que diz respeito aos alimentos. No entanto, para odores não alimentares, a capacidade de diferenciar o odor e os níveis de cortisol foram relacionados, estando estes aumentados nas mulheres que têm maior capacidade de identificar o cheiro do seu bebé (Fleming *et al.*, 1997). No estudo de Fukui, verificou-se que o odor cítrico tal como o de rosas reduz os níveis de cortisol, no entanto este efeito difere entre sexos (Fukui & Toyoshima, 2014).

Assim, tendo em conta que os níveis de cortisol foram já associados a alterações na ingestão de alimentos (Epel *et al.*, 2001; Neseliler *et al.*, 2017), compreender de que forma os mesmos variam em resposta ao estímulo olfativo de um alimento poderia ser interessante. Mas, que seja do nosso conhecimento, não há estudos que avaliem esse efeito.

O efeito que o estímulo olfativo pode ter a nível de salivação não está bem compreendido. Pensa-se que o fenómeno de “água na boca” corresponde a uma resposta muito breve das glândulas submandibulares. Este fenómeno pode ter a ver com alguma ação direta do estímulo olfativo, ou com um processo de aprendizagem, em que esse estímulo é ligado a um efeito conhecido. Por exemplo, na experiência de Pavlov a 1910, um estímulo alimentar é precedido por um estímulo neutro repetidamente, consequentemente produzindo uma resposta, como o aumento do fluxo salivar. Ao realizar repetidamente este processo, o ato de aumento do fluxo salivar

aumenta após o estímulo neutro, sem que exista o estímulo alimentar. Pensa-se que este processo de aprendizagem vá permitir preparar organismo para a alimentação, ou seja é uma maneira de aprender como a visão ou o olfato produz sensações na boca (Kershaw & Running, 2018).

Um estudo recente de Paulina Morquecho-Campos, avaliou o efeito de odores alimentares e não alimentares na salivação e verificaram que existem, de facto, algumas diferenças quando recorreram ao estímulo olfativo alimentar, no entanto eles não avaliaram as alterações no proteoma salivar (Morquecho-campos *et al.*, 2019). E que seja do nosso conhecimento, não há mais artigos que refiram modificações salivares, a nível de composição proteica, de modificações salivares induzidas pelo cheiro de alimentos.





---

## Capítulo II - Problemática e Objetivos

---





## 2.1. Problemática

É do conhecimento geral que a salivação varia em resposta aos diversos estímulos a que o indivíduo está exposto. Há estudos que mostram que a composição da saliva responde a estímulos alimentares, como por exemplo a presença de níveis elevados polifenóis (ex. frutas e vinho tinto). Existem também trabalhos que mostram que a composição da saliva é influenciada por outras propriedades organolépticas dos alimentos, como o caso da textura e da estimulação com gostos básicos. No entanto, no caso do odor há muito pouca informação acerca do que pode variar.

O odor dos alimentos é algo intrínseco aos mesmos, impossível de isolar. O ser Humano é estimulado pelo odor, com este sentido a permitir antecipar as características sensoriais dos alimentos que vão ser ingeridos. As glândulas salivares vão responder a este estímulo, aumentando a secreção. Sabe-se também que o odor dos alimentos é um dos estímulos importantes na fase cefálica da ingestão (fase pré-ingestiva), sabendo-se que nessa fase há uma regulação fisiológica que prepara e antecipa a chegada de alimento. Alguns estudos colocam a hipótese do odor dos alimentos nos dirigir nas nossas escolhas alimentares, e até aumentar o apetite por alimentos semelhantes ao odor sentido. Nesse sentido, é possível pensar que cheirar um alimento possa provocar alterações também na composição da saliva, em resultado da antecipação da ingestão desse alimento.

Por outro lado, sabe-se que as pistas olfativas têm uma elevada capacidade de desencadear emoções. No caso dos odores de alimentos, essas emoções podem ser positivas e impelir para o consumo, ou negativas e resultar em aversão. Apesar desta ser uma questão que parece evidente, de forma empírica, há falta de estudos que mostrem se os efeitos (fisiológicos), desencadeados por este tipo de estimulação, variam em função do tipo de emoção desencadeado.

O pão é um alimento frequentemente consumido por toda a população portuguesa. No entanto, não existem trabalhos que mostrem se o estímulo olfativo resulta em alterações no proteoma salivar, nem se essas alterações são semelhantes às que existem quando ocorre a mastigação e ingestão de pão.

## **2.2. Objetivo geral**

O objetivo do estudo é avaliar o efeito que o estímulo olfativo tem em parâmetros associados à tomada de decisão para a ingestão de pão, nomeadamente nas emoções desencadeadas e nas alterações de características do meio oral, como é o caso do proteoma salivar.

## **2.3. Objetivos específicos**

- Avaliar as alterações no proteoma salivar, induzidas pela estimulação olfativa com o odor do pão, e se estas são semelhantes às alterações observadas com a mastigação do mesmo alimento;
- Estudar as principais emoções desencadeadas pelo odor do pão;
- Avaliar como as alterações na componente bioquímica da saliva, induzidas pelo odor do pão, se relacionam com as emoções.



---

## Capítulo III - Metodologia

---





## **3.1. Estratégia**

### **3.1.1. Local de realização**

Laboratório de Fisiologia Animal Aplicada- ICAAM, Pólo da Mitra, Universidade de Évora.

### **3.1.2. Apoio de financiamento**

Este trabalho foi financiado pela verba do Laboratório de Fisiologia Animal Aplicada e pelo Projeto Interreg V (POCTEP)- Sabor Sur.

### **3.1.3. Período de realização**

O período de realização deste trabalho foi de um ano letivo, 2018/2019.

### **3.1.4. Modelo biológico**

O modelo biológico utilizado o ser Humano, nomeadamente a sua saliva.

## **3.2. Ensaio**

### **3.2.1. Parâmetros analisados**

- Questionário emocional;
- Concentração proteica de amostras de saliva mista;
- Perfil eletroforético proteico (eletroforese bidimensional) de amostras de saliva;
- Atividade enzimática da proteína  $\alpha$ -amilase;
- Concentração de cortisol salivar.

### 3.2.2. Técnicas utilizadas

- Quantificação proteica pelo método de Bradford
  - O método que utilizamos para a quantificação de proteína presente nas amostras de saliva, foi o método de Bradford pelas vantagens que este método possui, entre elas, o uso de um único reagente, a rapidez, a sensibilidade, a estabilidade, a reprodutibilidade do método e o baixo número de interferências (Bonjoch & Tamayo, 2001). O método de Bradford é caracterizado pela adição de um reagente constituído pelo corante azul de coomassie G-250 a uma solução com proteínas, havendo a formação do complexo reagente-proteína, que provoca uma mudança de cor na solução, de castanho para azul. O complexo reagente-proteína surge, maioritariamente através do aminoácido arginina das proteínas com os grupos sulfato do corante. O máximo de absorvência do complexo é a 595 nm (Bonjoch & Tamayo, 2001). O método é linear para concentrações que podem atingir concentrações de 1000 µg/mL (Pierce, 2017). Acima deste valor o método possui a limitação de não ser linear devido à sobreposição espectral das duas formas ácida e alcalina do corante. Alguns autores (Marshall & Williams, 1986; Zor & Selinger, 1996; Grintzalis *et al.*, 2015) tentaram prolongar esta linearidade com alterações na composição do reagente ou na proporção amostra/reagente no entanto a solução não correspondia a um aumento significativo na linearidade (Sherovski *et al.*, 2018).
- Eletroforese bidimensional
  - A eletroforese bidimensional é uma técnica que permite a separação e deteção de proteínas, com uma resolução suficientemente elevada para permitir a separação de isoformas com massas e/ou ponto isolétricos diferentes, e, a partir desta separação elaborar mapas de proteínas intactas, que demonstram as alterações na expressão de proteínas, de diferentes isoformas e de modificações muito subtis (Görg *et al.*, 2004). Esta técnica eletroforética foi descrita passo a

passo em 1960, aquando também ocorreu a descrição da focagem isoelétrica, isto é a separação das proteínas por pontos isoelétrico (Bernhardt, 2018). Uma excelente contribuição foi a introdução de tiras comerciais com gradiente de pH imobilizado que permitiu maior resolução e maior reprodutibilidade da localização de *spots* (Bjellqvist *et al.*, 1982). Uma das maiores vantagens da eletroforese bidimensional é permitir-nos estudar proteínas que tenham sido alvo de alguma modificação pós-tradução (fosforilação, glicosilação ou proteólise) pois estas aparecem horizontalmente na mesma zona (caso a modificação afete ponto isoelétrico e não massa), ou verticalmente na mesma zona (caso afete massa e não ponto isoelétrico) (Bernhardt, 2018). Para a preparação da amostra O' Farrell elaborou um protocolo que continha uma mistura de ureia com nonidet p-40, anfólitos e  $\beta$ -mercaptoetanol, como agente redutor. No entanto, existem outros protocolos que utilizam o CHAPS e DTT. A tioureia também é utilizada em junção com a ureia, por ser um composto bastante hidrofóbico, o que resulta num aumento do poder de solubilização da mistura (Bernhardt, 2018). Todavia qualquer protocolo de preparação da amostra necessitam de ser otimizados e adequados de acordo com o tipo de amostra em estudo (Görg *et al.*, 2004). É também necessário garantir a redução das proteínas (quebra das ligações persulfureto), para este efeito é frequentemente usado o ditioneitol, normalmente utilizando em excesso. Para a alquilação é frequentemente utilizada a iodoacetamida, e pela interferência existente entre este composto e a tioureia, todo este processo de equilíbrio deve ser realizado após a focagem isoelétrica e antes da segunda dimensão.

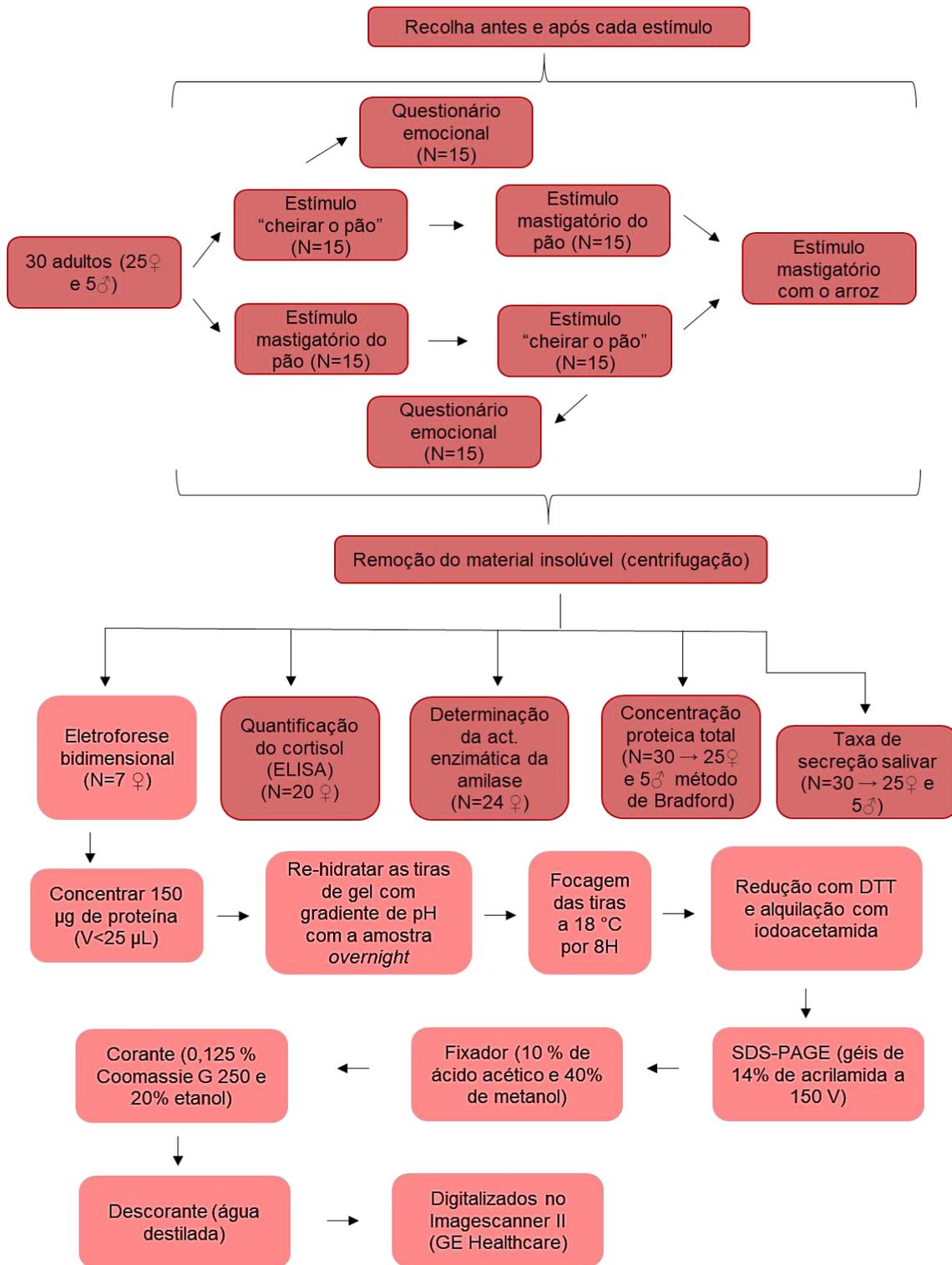
- Determinação da atividade enzimática da  $\alpha$  - amilase
  - A  $\alpha$  – amilase presente nas nossas amostras de saliva foi determinada pelo Kit Amylase Kinetic Enzyme Assay (Salimetrics®).

O método utilizado neste kit baseia-se na clivagem da ligação de um hidrato de carbono, a maltotriose, a um substrato cromogénico, o 2-cloro-*p*-nitrofenol. A  $\alpha$  – amilase, que se encontra na saliva, ao clivar a ligação vai libertar o substrato 2-cloro-*p*-nitrofenol, que tem uma coloração amarela que é medida a 405nm. A coloração produzida é diretamente proporcional à concentração de  $\alpha$  – amilase presente nas amostras.

- Quantificação do cortisol por ELISA
  - A quantificação do glucocorticoide cortisol foi realizada a partir da utilização de um kit Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Salimetrics®). O método presente neste kit é um imunoensaio competitivo, em que o cortisol presente tanto nas amostras de saliva como nos padrões compete com o cortisol que se encontra conjugado com a peroxidase pela ligação ao anticorpo monoclonal anti-cortisol. Quando o cortisol conjugado com a peroxidase se liga ao anticorpo liberta a enzima peroxidase e esta reage com a tetrametilbenzidina formando um composto azul, que passa a amarelo quando paramos a reação com uma solução ácida. Como o que medimos através da leitura da absorvência a 450 nm é a quantidade de cortisol conjugado com a peroxidase que se ligou ao anticorpo, esta medida é inversamente proporcional ao cortisol presente nas nossas amostras.

### 3.3. Procedimento experimental

### 3.3.1. Desenho experimental



### 3.3.2. Recolha de amostras

As amostras foram recolhidas a adultos voluntários (N=30; 25 do sexo feminino e 5 do sexo masculino), da população estudantil da Universidade de Évora, com idades compreendidas entre 19-43 anos. Todos os adultos forneceram o seu consentimento informado (Anexo IV) e foi-lhes pedido que preenchessem um questionário de apoio ao estudo com questões sobre saúde em geral, se eram fumadores, os níveis de saciedade sentidos, e para, numa escala de 0-6 assinalassem com que intensidade o cheiro do pão despoletava algumas emoções ( anexo V). Pediu-se a cada voluntário que não ingerisse qualquer alimento ou bebida, exceto água, pelo menos 1h e 30 min antes das recolhas. As amostras de saliva mista não estimulada foram recolhidas no período da tarde.

Os 30 adultos foram divididos em dois grupos que em simultâneo tinham contactos diferentes com o pão. Um grupo foi vendado, para que tivesse contacto olfativo com o pão, sem ter o estímulo visual; outro grupo mastigou 10g de pão, durante 30 segundos e ingeriu-o. No caso do estímulo olfativo a recolha foi feita durante 4 minutos, durante o qual as pessoas continuavam a cheirar, enquanto que na mastigação, a recolha de saliva foi feita durante o mesmo período de tempo, iniciando-se imediatamente após a mastigação. Um terceiro tratamento que foi aplicado, a mastigação de arroz branco cozido, em quantidade necessária para ter o equivalente ao pão em termos de amido (19,8g arroz cozido). Este último tratamento serviu como controlo, no sentido de ter um outro produto que, tendo necessidades masticatórias semelhantes e quantidades de amido semelhantes, tivesse propriedades sensoriais diferentes do pão. Isso permite controlar se potenciais alterações são efeito da mastigação e composição do produto ingerido, ou efeito de características sensoriais. A questão do amido ser devidamente controlado tem a ver com o facto de uma das proteínas salivares mais abundantes ser a  $\alpha$ -amilase e esta ter funções específicas de digestão deste composto.

Em termos de desenho experimental, todos os indivíduos passaram pelos 3 tratamentos (cheiro do pão, mastigação do pão e mastigação do arroz), sendo que metade (seleccionada de forma aleatória) iniciou com o cheiro do pão e a outra metade

com a mastigação do pão. A mastigação do arroz foi sempre feita após os 2 tratamentos referidos anteriormente. Ainda que este tipo de design experimental possa ter a desvantagem de termos um “efeito do pão” na recolha do arroz, tentou-se evitar que houvesse 2 momentos de estímulo de mastigação antes da recolha do tratamento “cheiro a pão”. De qualquer forma, tentou-se minimizar qualquer potencial efeito de *carry-over* separando os tratamentos entre si em, pelo menos 15 minutos, tempo que, aparentemente, será suficiente para que a composição da saliva não tenha influência do estímulo prévio (dados não publicados).

Para as recolhas de saliva, pediu-se aos indivíduos que enxaguassem a boca antes de qualquer estímulo. Imediatamente após o estímulo mastigatório (nos tratamentos envolvendo mastigação), os indivíduos voltaram a enxaguar a cavidade oral imediatamente antes da recolha. Durante 4 minutos, foi pedido que se mantivessem sem falar, sem estimular a salivacção e sem engolir saliva, cuspidando sempre que sentissem necessidade para um tubo. As amostras foram imediatamente colocadas em gelo, onde se mantiveram até chegada ao laboratório, sendo congeladas a -28 °C.

### **3.3.3. Questionário emocional**

Após o estímulo olfativo foi pedido aos participantes que preenchessem um questionário sobre as emoções despoletadas no momento do contacto com o odor do pão (anexo V). Este questionário continha 18 emoções com uma escala que continha 7 pontos.

### **3.3.4. Remoção do material insolúvel das amostras**

As amostras de saliva foram descongeladas em gelo, pesadas (Balança analítica VWR) e posteriormente foram centrifugadas (Hermle Z323K) a 13 000 g a 4°C por 30 minutos, por fim, foi alíquotado o sobrenadante que foi utilizado para todas as análises laboratoriais.

### 3.3.5. Quantificação de proteína total

A quantificação de proteína total presente nas amostras foi realizada através do método de Bradford, para isso, preparou-se uma curva padrão com albumina de soro de bovino (BSA) com concentrações de 0-200  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 1). As amostras foram descongeladas e diluídas (Tabela 2). Pipetaram-se 10  $\mu\text{L}$  de amostra/padrão e 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford. Leu-se a absorvência a 600 nm num leitor de microplacas (Glomax da promega). O reagente de Bradford foi previamente preparado dissolvendo vigorosamente 100 mg de azul de coomassie G-250 em 50 mL de etanol a 95%, e 100 mL de ácido fosfórico 85%, e perfazendo com água destilada até 1 L de volume final. Este reagente foi sempre armazenado no frigorífico a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , entre utilizações.

Os valores de concentração proteica para as amostras da saliva são interpolados na curva de padrão de BSA (Figura 4).

Tabela 1: Preparação das solução com diferentes concentrações de BSA para a curva padrão.

[BSA] ( $\mu\text{g/mL}$ )	V (solução BSA) ( $\mu\text{L}$ )	V (água ultrapura) ( $\mu\text{L}$ )
0	0	1500
25	250 da solução de 50 $\mu\text{g/mL}$	250
50	500 da solução de 75 $\mu\text{g/mL}$	250
75	750 da solução de 100 $\mu\text{g/mL}$	250
100	833,3 da solução de 150 $\mu\text{g/mL}$	416,7
150	999,9 da solução de 200 $\mu\text{g/mL}$	333,4
200	150 da solução de 2000 $\mu\text{g/mL}$	1350

Tabela 2: Volumes para a preparação das diluições das amostras.

Diluição	V (amostra) ( $\mu\text{L}$ )	V (água ultrapura) ( $\mu\text{L}$ )
4	10	30
8	5	35
12	5	55

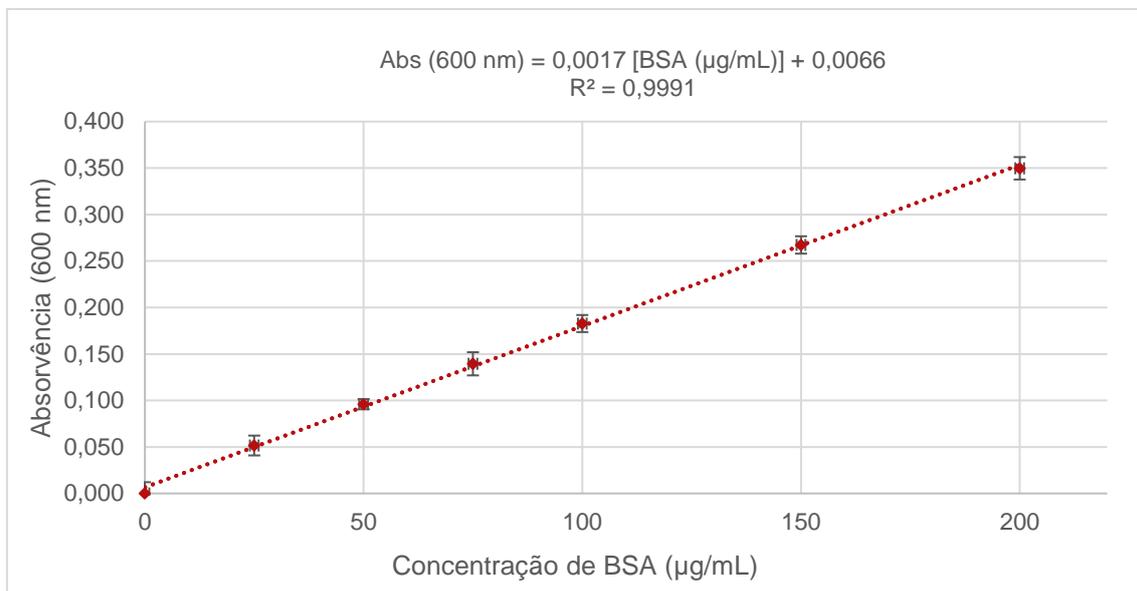


Figura 4: Curva padrão de albumina de soro de bovino.

### 3.3.6. Separação proteica com recurso a eletroforese bidimensional

Considerando o número de amostras que recolhemos para cada indivíduo ( 6 amostras), e dadas as limitações técnicas e de análise respeitantes à eletroforese bidimensional, selecionou-se uma sub-amostras de 7 indivíduos, em que único requisito foi que contemplasse apenas o sexo feminino, sendo que a escolha dessas amostras foi aleatória. A seleção de amostras de participantes, apenas, do sexo feminino deveu-se ao facto de se trabalhar com um N de apenas 7 indivíduos e de se saber que o sexo poderá ser um fator de variação. Decidimos não introduzir esse possível fator de variação aqui. Todas as amostras foram testadas em duplicado, para minimizar a variabilidade técnica, dadas as características da metodologia.

A eletroforese bidimensional tem quatro etapas: a preparação das amostras, a reidratação das tiras de gel de acrilamida com um gradiente de pH imobilizado (3-10)

de 7 centímetros (GE Healthcare) comerciais, focagem das tiras, e por fim, o equilíbrio e a corrida em SDS-PAGE.

### **3.3.6.1. Preparação das amostras**

Para que possamos realizar a eletroforese bidimensional temos de concentrar as amostras de saliva pelo método de centrifugação (a 13 000 g 4°C) (Hermle Z323K) em membranas com um *cut-off* de 3 kDa (PALL). O tempo pelo qual as amostras são submetidas é variável pois só podemos terminar quando tivermos concentrado 150 µg de proteína total num volume inferior a 25 µL.

### **3.3.6.2. Re-hidratação das tiras**

A re-hidratação das tiras foi realizada com as amostras concentradas no ponto anterior. A essas amostras foi adicionado o volume necessário de tampão de re-hidratação (7 M ureia; 2 M tiourea; 4 % (m/v) Chaps; 2 % (v/v) IPG buffer; 40 mM DTT) para, misturado com a amostra, perfazer um volume final de 125 µL. Esta mistura ficou a incubar durante uma hora à temperatura ambiente, sendo posteriormente centrifugada a 10 000 rpm por 10 minutos (Eppendorf centrifuge 5424). Aplicou-se o sobrenadante numa ranhura do sistema de re-hidratação (GE Healthcare), colocando-se as tiras de gel [(com um gradiente de pH imobilizado (3-10) de 7 centímetros (IPG strips, GE Healthcare)] comerciais, sendo que estas ficam em contacto com a amostra e cobertas de óleo mineral. A re-hidratação das tiras foi feita *overnight*, à temperatura ambiente.

### **3.3.6.3. Focagem das tiras**

A focagem das tiras de gel de acrilamida, ocorreu após a re-hidratação das mesmas. Estas foram colocadas no sistema Pharmacia Multiphor II A focagem ocorreu a 18 °C por 8 horas sendo dividida em quatro etapas como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3: Características da focagem isoeletrica.

Voltagem	Tempo
Subida para os 300 V	15 minutos
Constante a 300 V	45 minutos
Subida dos 300 V para os 3500 V	3 horas
Constante a 3500 V	4 horas

### 3.3.6.4. Equilíbrio e separação SDS-PAGE

O equilíbrio e a separação por SDS-PAGE foram divididos em três etapas diferentes, que são: a preparação dos géis, o equilíbrio das tiras e a corrida em si.

Para a preparação dos géis foram alinhados os vidros e montado todo o sistema para a eletroforese unidimensional. Posteriormente, os géis foram preparados (14 % (m/v) de Acrilamida/bis; 27,5 % (v/v) de H<sub>2</sub>O destilada; 0,375 M de Tris 1,5 M pH 8,8; 30 % (m/v) de SDS; 0,07% (m/v) de APS; 0,05 % (v/v) de TEMED). Após colocação da solução correspondente ao gel, é colocada água destilada por cima, para evitar o contacto da solução do gel com o oxigénio atmosférico, que inibe a polimerização.

As tiras foram equilibradas num tampão ( constituído por 6 M ureia; 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 29,3 % (v/v) glicerol; 2 % (m/v) SDS; 0,002 % (m/v) de azul de bromofenol), a que se adicionou DTT (1%) , no primeiro passo e iodoacetamida (2,5%) no segundo passo. Foram adicionados 5 mL de cada uma destas soluções a cada tira, incubando-se, com agitação durante 15 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente descartamos a primeira solução de equilíbrio (com DTT), para redução das proteínas e alquilamos com iodoacetamida, num segundo passo de equilíbrio. Também neste se adicionaram 5 mL da solução, incubando com agitação por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, a solução de equilíbrio foi descartada.

Para a corrida as tiras foram lavadas com tampão de corrida (que é constituído por 0,0025 M Tris; 0,0192 M glicina; 0,1% (m/v) SDS) , removendo o excesso. Depois foram colocadas no topo de cada gel e adicionados cerca de 1mL de uma solução de 50 % agarose (preparada em tampão de corrida). A corrida eletroforética ocorreu a uma

voltagem constante de 150 V. Quando a frente de corrida, constituída por azul de bromofenol, atinge o fim do gel, a fonte de alimentação é desligada e a corrida para.

Após a corrida, os géis foram colocados em solução de fixação (10 % de ácido acético, 40 % de metanol) durante 2 horas, sendo de seguida corados com uma solução de azul brilhante Coomassie G-250 (0,125 % de coomassie G-250, 20% de etanol) durante 2 horas e descorados em várias mudanças de água destilada. No final, os géis foram digitalizados com recurso ao scanner ImageScanner III (GE Healthcare), usando o software Labscan.

### 3.3.7. Determinação da atividade enzimática da amilase

Para a quantificação de  $\alpha$ -amilase presente na saliva utilizamos o kit “salivary  $\alpha$ -amilase kinetic enzyme assay” (Salimetrics®). Seguindo as indicações do fabricante, as amostras foram diluídas 200X com o diluente constituído por tampão fosfato. Na microplaca, em cada poço colocamos 6  $\mu$ L de amostra ou de um dos 2 controlos fornecidos com o kit e 240  $\mu$ L de substrato, constituído por 2-cloro-*p*-nitrofenol ligado a maltotriose, aquecido previamente a 37 °C (Agitador orbital Grant-Bio). As leituras da microplaca foram feitas a 405 nm, num leitor de microplacas (Biorad modelo 680) 1 e 3 minutos após a aplicação do substrato.

O cálculo da atividade de amilase (U/L) foram feitos através da equação:

$$\text{Atividade enzimática (U/L)} = \frac{\frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \times \text{VT} \times \text{FD}}{l \times V \times \epsilon}, \text{ onde:}$$

- $\Delta \text{Abs}/\text{min}$  - variação da absorvência por minuto;
- VT - volume total (0,246 mL);
- FD - fator de diluição (200);
- l – percurso ótico (0,97 cm);
- V – volume de amostra ( 6  $\mu$ L);
- $\epsilon$  – coeficiente de absorvidade molar do reagente (12,9 mM/cm ).

### **3.3.8. Quantificação do cortisol**

Para a determinação da concentração em cortisol das amostras de saliva, utilizamos o Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Salimetrics®). Para uma microplaca revestida com anticorpos monoclonais anti-cortisol pipetamos 25 µL de amostras/ controlos/ padrões e adicionamos 200 µL de uma solução composta por 24 mL do diluente constituído por tampão fosfato e 15 µL do enzima conjugado (cortisol conjugado com peroxidase de rábano). Incubamos a placa durante 1h, a 25 °C, com agitação a 250 rpm (agitador orbital Grant-bio). Seguidamente lavamos a placa com tampão de lavagem (diluído 10 X), aplicando 300 µL em cada poço, por quatro vezes e tendo particular cuidado em retirar esta solução no final da última lavagem, batendo a placa sobre papel na bancada. Adicionamos 200 µL de uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) e incubamos por 30 min, a 25 °C, com agitação a 250 rpm no escuro. Para parar a reação juntamos 50 µL de uma solução ácida (solução STOP) e lemos a microplaca a 450 nm num leitor de microplacas (Glomax da Promega).

Os valores da concentração de cortisol foram calculados através da equação gerada a partir da curva traçada com as concentrações padrão, de concentrações conhecidas (standards). Neste caso, os standards usados acompanham os próprios kits tinham as seguintes concentrações 0; 0,012; 0,037; 0,111; 0,333; 1,0; 3,0 µg/dL.

### **3.3.9. Análise estatística**

A análise estatística foi feita com recurso ao software SPSS, versão 24, considerando um  $\alpha=0,05$ .

Foram avaliadas a distribuição normal e a homocedasticidade para todos os dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente.

#### **3.3.9.1. Avaliação da influência do contacto olfativo nas proteínas do proteoma salivar**

### **3.3.9.1.1. Alterações entre os dois períodos de recolha**

Para avaliarmos as alterações induzidas por cada um dos tratamentos, nalgumas proteínas constituintes do proteoma salivar, verificou-se inicialmente a homocedasticidade e normalidade, como anteriormente referido, e seguidamente, foram feitas comparações dos valores de % de volume dos *spots* entre a recolha “antes” da estimulação e a recolha subsequente à estimulação (no caso do cheiro, durante a estimulação). Para esta avaliação foi realizado um test-T para amostras emparelhadas e o equivalente não paramétricos Wilcoxon signed Rank. Estas comparações foram feitas separadamente para cada um dos tratamentos.

### **3.3.9.1.2. Interação entre os períodos e os tratamentos**

Para avaliar se os tratamentos variam entre si, na alteração que induzem nos níveis de expressão de cada proteína salivar, recorreu-se a um teste two-way ANOVA de medidas repetidas – *within subjects*. Consideraram-se como fatores os tratamentos (cheirar pão, mastigar pão e mastigar arroz) e os períodos (antes e depois), dentro dos tratamentos. Esta abordagem, para além de permitir avaliar a existência de diferenças entre tratamentos e entre períodos, permite avaliar a existência de interação entre eles. Ou seja, permite avaliar se a variação entre os períodos é no mesmo sentido (ausência de interação) ou em sentido oposto (existência de interação).

## **3.3.9.2. Avaliação da relação entre a componente bioquímica da saliva e as emoções**

### **3.3.9.2.1. Análise fatorial – componentes principais**

Para avaliar como as alterações, em parâmetros salivares, induzidas pelo contacto olfativo com o pão se associam com as emoções que selecionamos, primeiro foi feita uma tentativa de redução do número de variáveis (emoções), através de análise fatorial (análise de componentes principais). Os fatores obtidos (componentes) foram utilizados como variáveis explicativas, juntamente com variáveis como o nível de saciedade e o sexo, em modelos de regressão linear, tendo como variáveis dependentes a taxa de secreção, a concentração proteica, a amilase salivar ou o

cortisol. Foi usado o procedimento *stepwise backward*, após o qual se examinaram as alterações no  $R^2$  ajustado de cada variável adicionada (ou removida) manualmente. Os pressupostos de normalidade dos resíduos, colinearidade (VIF e tolerância) e independência do erro (Durbin-Watson) foram avaliados.

Estas análises de regressão foram repetidas, da forma descrita, mas desta vez considerando as variáveis emocionais individualmente (em vez das componentes referidas anteriormente).

#### **3.3.9.2.2. Correlações bivariadas**

Para complementar a análise multivariada, descrita no ponto anterior, foi avaliada a existência de correlação, entre cada variável emocional e cada parâmetro salivar (taxa de secreção, concentração proteica, amilase e cortisol salivar), de forma univariada, ou seja, independentemente de potenciais efeitos que umas variáveis possam ter noutras. Tendo em conta que a avaliação do nível de emoção percebido foi feita através de uma escala, optou-se pelo teste não paramétrico de Kendall's.





---

## Capítulo IV - Resultados

---





## 4.1. Influência do odor no proteoma salivar

Para avaliarmos as alterações induzidas pelo odor de um alimento na composição proteica da saliva fomos avaliar quais as proteínas que se encontravam alteradas nos perfis proteicos, realizados com o auxílio da eletroforese bidimensional. Tendo em conta os requisitos desta técnica, foi constituída uma sub-amostra para comparação dos proteomas por eletroforese bi-dimensional (N=7).

A taxa de secreção salivar não variou de forma diferente entre os tratamentos, mas apresentou um aumento induzido pelo estímulo em todos os tratamentos (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**). Para o estímulo olfativo observou-se um aumento de  $0,548 \pm 0,319$  mL/min para  $0,637 \pm 0,444$  mL/min, no estímulo mastigatório com o pão temos acréscimo de  $0,512 \pm 0,282$  mL/min para  $0,740 \pm 0,393$  mL/min e no estímulo mastigatório com o arroz aumentou de  $0,639 \pm 0,317$  mL/min para  $0,802 \pm 0,422$  mL/min ( $p$ -value <0,001, de acordo com o teste 2-way ANOVA medidas repetidas).

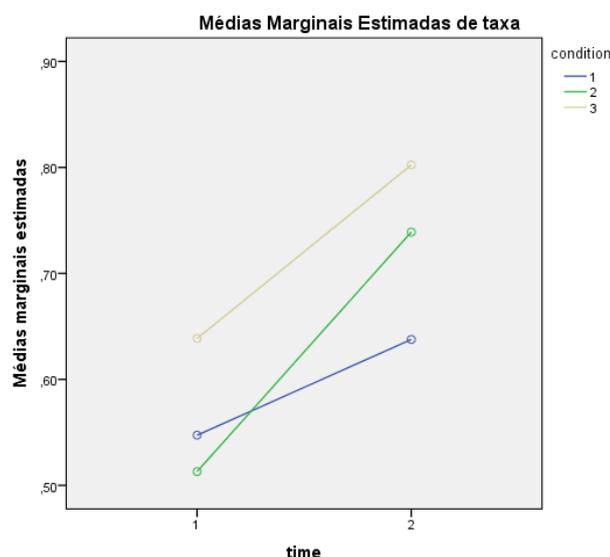


Figura 5: Variação na taxa de secreção salivar (mL/min) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)].

A concentração proteica total, calculada na amostra após remoção do material insolúvel, não variou significativamente nem entre tratamentos nem entre períodos (Figura 6). Para o estímulo olfativo observou-se um decréscimo de  $621,2 \pm 70,6 \mu\text{g/mL}$  para  $478,8 \pm 47,9 \mu\text{g/mL}$ , no estímulo mastigatório com o pão a concentração manteve-se de  $585,5 \pm 55,8 \mu\text{g/mL}$  para  $583,2 \pm 43,1 \mu\text{g/mL}$  e no estímulo mastigatório com o arroz verificou-se também um decréscimo de  $496,3 \pm 42,4 \mu\text{g/mL}$  para  $440,9 \pm 40,6 \mu\text{g/mL}$ .

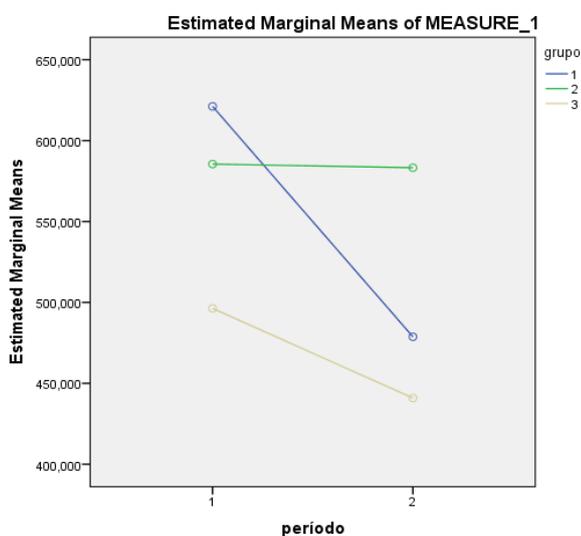


Figura 6: Variação na concentração proteica total ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)].

O cortisol salivar não difere significativamente entre tratamentos nem entre períodos (Figura 7), embora exista um acréscimo sempre no momento após o estímulo. Para o estímulo olfativo observou-se um acréscimo de  $0,213 \pm 0,022 \mu\text{g/dL}$  para  $0,243 \pm 0,270 \mu\text{g/dL}$ , no estímulo mastigatório com o pão os níveis de cortisol aumentam de  $0,241 \pm 0,037 \mu\text{g/dL}$  para  $0,314 \pm 0,065 \mu\text{g/dL}$  e no estímulo mastigatório com o arroz aumentam, também, de  $0,182 \pm 0,222 \mu\text{g/dL}$  para  $0,193 \pm 0,026 \mu\text{g/dL}$ .

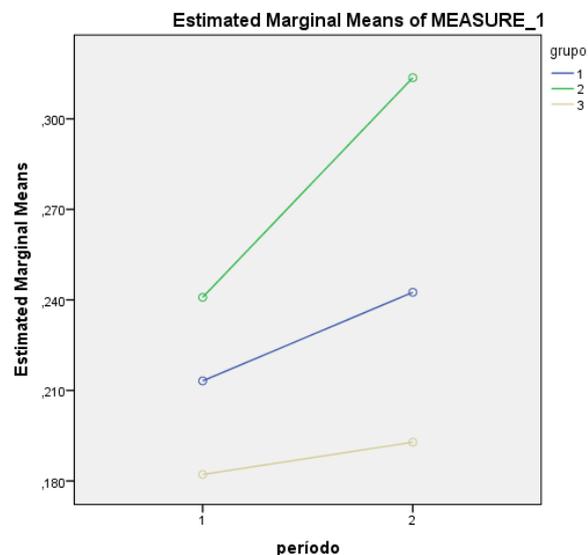


Figura 7: Variação nos níveis de cortisol salivar ( $\mu\text{g/dL}$ ) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)].

Relativamente à atividade enzimática da amilase, observou-se que não sofre alterações significativas com os diferentes estímulos, nem entre momento de recolha (Figura 8). No caso do estímulo olfativo observou-se uma atividade enzimática constante entre os dois momentos de recolha,  $130,1 \pm 20,7$  U/L para  $129,3 \pm 21,0$  U/L, para o estímulo mastigatório com o pão ocorre um ligeiro acréscimo de  $139,6 \pm 21,9$  U/L para  $168,4 \pm 18,4$  U/L e no caso do estímulo mastigatório com o arroz ocorre um ligeiro decréscimo de  $133,9 \pm 21,9$  U/L para  $121,6 \pm 22,6$  U/L.

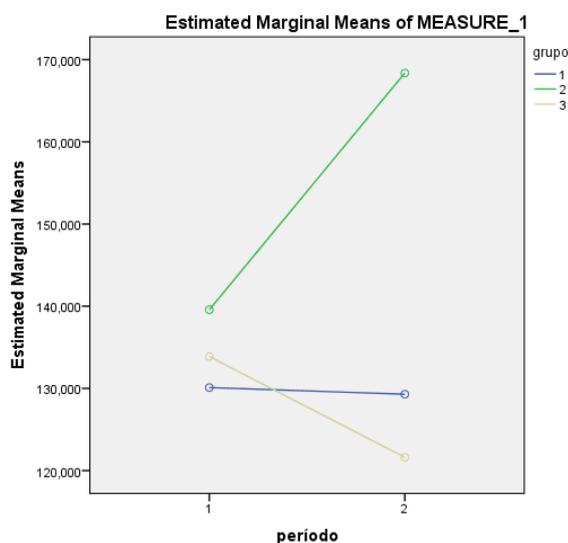


Figura 8: Variação da atividade enzimática da amilase (U/L) nos dois momentos de recolha [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado as oscilações da taxa de secreção salivar com o tratamento de cheirar o pão, a verde a mastigação do pão e a amarelo a mastigação do arroz)].

Ao observar a Tabela 4 verificamos que há sessenta proteínas cujos níveis de expressão (% de volume) sofreram alterações induzidas pelos estímulos. Em alguns casos as alterações foram apenas induzidas por um dos tratamentos, enquanto que noutros foram alterações em sentidos diferentes entre tratamentos diferentes. A localização destes *spots* proteicos está indicada na Figura 9.

Por comparação com outros trabalhos onde se procedeu à identificação de *spots* proteicos por espectrometria de massa (Lamy *et al.*, 2015b; Rodrigues *et al.*, 2017a, 2017b, 2019), conseguimos identificar vinte e quatro proteínas, entre as quais recetores poliméricos de imunoglobulinas, proteínas induzidas pela prolactina, imunoglobulina J, cistatinas, regiões de algumas cadeias de imunoglobulinas,  $\alpha$ -amilase s, anidrase carbónica e a actina citoplasmática (Tabela 4).

Tabela 4: Proteínas onde se observou variação nos níveis de expressão (% volume dos spots), induzida pelos diferentes tratamentos.

Spot	Proteína (Id)	pI aparente	MW aparente (kDa)	Cheirar o pão				Mastigar o pão				Mastigar o arroz				Período* Tratamento (p-value)
				Antes	Depois	P	Rácio	Antes	Depois	P	Rácio	Antes	Depois	P	Rácio	
3				0,082 ± 0,098	0,023 ± 0,019	0,253	0,28	0,029 ± 0,030	0,104 ± 0,137	0,238	3,59	1,003 ± 0,833	0,055 ± 0,055	<b>0,041*</b>	0,05	0,006*
4	Recetores poliméricos de imunoglobulinas	5,5	100	0,404 ± 0,171	0,503 ± 0,177	0,382	1,24	0,508 ± 0,164	0,377 ± 0,986	<b>0,020*</b>	0,74	0,562 ± 0,136	0,357 ± 0,221	<b>0,039*</b>	0,64	
7				0,063 ± 0,054	0,071 ± 0,053	0,768	1,13	0,117 ± 0,057	0,093 ± 0,038	0,482	0,79	0,092 ± 0,050	0,159 ± 0,056	<b>0,049*</b>	1,74	
8	Proteínas induzidas por prolactina	4,6	18	0,525 ± 0,349	0,551 ± 0,267	1	1,05	0,501 ± 0,152	0,680 ± 0,318	0,128	1,36	0,383 ± 0,171	0,633 ± 0,299	<b>0,028*</b>	1,65	
11	Imunoglobulina J	3,9	22	4,089 ± 1,636	2,468 ± 1,362	0,091	0,6	1,648 ± 0,803	5,273 ± 2,200	<b>0,018*</b>	3,2	5,745 ± 2,310	7,565 ± 4,051	0,237	1,32	0,010*
19	Cistatina S	6,7	15	2,692 ± 1,319	4,763 ± 2,249	<b>0,009*</b>	1,77	2,326 ± 0,855	4,568 ± 2,357	<b>0,030*</b>	1,96	3,130 ± 1,417	3,721 ± 1,161	0,306	1,19	
22		4,1		2,862 ± 1,637	5,456 ± 3,245	<b>0,009*</b>	1,91	3,116 ± 1,681	5,319 ± 2,186	<b>0,002*</b>	1,71	0,492 ± 1,782	3,476 ± 1,573	0,493	7,07	
23		4,3		3,991 ± 1,931	0,087 ± 0,100	0,917	0,02	0,243 ± 0,168	0,378 ± 0,363	0,398	1,56	0,096 ± 0,122	0,024 ± 0,058	0,715	0,26	0,009*
29				0,384 ± 0,128	0,372 ± 0,087	0,808	0,97	0,410 ± 0,063	0,721 ± 0,133	<b>0,004*</b>	1,76	0,549 ± 0,184	0,596 ± 0,233	0,634	1,09	0,014*
31	Proteínas induzidas por prolactina	4,6	17	0,476 ± 0,202	0,549 ± 0,290	0,518	1,15	0,655 ± 0,205	0,706 ± 0,220	0,675	1,08	0,452 ± 0,180	0,653 ± 0,172	<b>0,046*</b>	1,44	
39	Região C da cadeia K de imunoglobulinas	7,7	25	0,078 ± 0,048	0,530 ± 0,192	<b>0,003*</b>	6,78	0,648 ± 0,163	0,309 ± 0,130	<b>0,018*</b>	0,48	0,511 ± 0,343	0,364 ± 0,186	0,176	0,71	<0,001*

Laura Regula Eustáquio Carreira  
Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão

40				0,420 ± 0,207	0,124 ± 0,138	<b>0,004*</b>	0,3	0,344 ± 0,286	0,199 ± 0,162	0,144	0,58	0,231 ± 0,164	0,224 ± 0,139	0,946	0,97	
41				0,377 ± 0,240	0,161 ± 0,088	0,128	0,43	0,167 ± 0,092	0,233 ± 0,11	0,237	1,4	0,095 ± 0,052	0,210 ± 0,131	<b>0,018*</b>	2,21	0,035*
42	Região C da cadeia K de imunoglobulinas	7,6	25	0,101 ± 0,079	1,046 ± 0,924	<b>0,032*</b>	10,41	0,970 ± 0,190	0,594 ± 0,194	<b>0,018*</b>	0,61	0,817 ± 0,295	0,498 ± 0,104	0,091	0,61	0,003*
43		6,9		0,625 ± 0,363	1,175 ± 0,530	0,146	1,88	1,405 ± 0,291	0,840 ± 0,309	<b>0,001*</b>	0,6	1,333 ± 0,220	0,656 ± 0,250	<b>0,004*</b>	0,49	0,004*
45		6,1		0,561 ± 0,261	0,681 ± 0,338	0,444	1,21	0,783 ± 0,191	0,378 ± 0,163	<b>0,0005*</b>	0,48	0,544 ± 0,150	0,506 ± 0,252	0,723	0,93	0,011*
46		5,8		0,482 ± 0,311	0,338 ± 0,115	0,176	0,7	0,412 ± 0,220	0,225 ± 0,133	0,128	0,55	0,282 ± 0,066	0,125 ± 0,052	<b>0,018*</b>	0,44	
47				0,265 ± 0,166	0,116 ± 0,102	0,068	0,44	0,282 ± 0,135	0,138 ± 0,054	<b>0,034*</b>	0,49	0,117 ± 0,080	0,066 ± 0,051	0,221	0,56	
48				0,127 ± 0,082	0,245 ± 0,186	0,269	1,94	0,504 ± 0,171	0,253 ± 0,155	<b>0,039*</b>	0,5	0,394 ± 0,218	0,119 ± 0,128	<b>0,015*</b>	0,3	0,012*
49				0,317 ± 0,242	0,229 ± 0,177	0,542	0,72	0,494 ± 0,244	0,195 ± 0,209	<b>0,009*</b>	0,39	0,188 ± 0,131	0,186 ± 0,146	0,981	0,99	
52				0,131 ± 0,110	0,411 ± 0,314	<b>0,043*</b>	3,14	0,308 ± 0,147	0,274 ± 0,113	0,31	0,89	0,385 ± 0,287	0,098 ± 0,067	<b>0,028*</b>	0,25	0,002*
53				0,340 ± 0,189	0,656 ± 0,299	<b>0,018*</b>	1,93	0,683 ± 0,237	0,431 ± 0,165	<b>0,028*</b>	0,63	0,354 ± 0,090	0,400 ± 0,168	0,31	1,13	0,003*
54				0,465 ± 0,167	0,274 ± 0,058	<b>0,014*</b>	0,59	0,348 ± 0,096	0,265 ± 0,071	0,119	0,76	0,297 ± 0,074	0,152 ± 0,060	<b>0,016*</b>	0,51	
55				0,339 ± 0,119	0,548 ± 0,126	<b>0,020*</b>	1,61	0,640 ± 0,124	0,424 ± 0,109	<b>0,001*</b>	0,66	0,436 ± 0,101	0,223 ± 0,144	<b>0,002*</b>	0,51	<0,001*
56				0,546 ± 0,227	0,157 ± 0,151	<b>0,028*</b>	0,29	0,328 ± 0,161	0,168 ± 0,110	0,176	0,51	0,154 ± 0,183	0,074 ± 0,096	0,463	0,48	
57				0,143 ± 0,112	0,124 ± 0,092	0,866	0,86	0,316 ± 0,201	0,071 ± 0,058	<b>0,046*</b>	0,22	0,149 ± 0,117	0,117 ± 0,133	0,499	0,78	
59				0,140 ± 0,108	0,279 ± 0,141	0,116	2	0,282 ± 0,149	0,229 ± 0,091	0,298	0,81	0,250 ± 0,082	0,196 ± 0,069	0,206	0,78	0,037*
67				0,071 ± 0,057	0,255 ± 0,237	0,128	3,58	0,100 ± 0,094	0,209 ± 0,093	<b>0,028*</b>	2,1	0,169 ± 0,132	0,122 ± 0,096	0,249	0,72	0,043*

Laura Regula Eustáquio Carreira  
Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão

70				0,089 ± 0,070	0,193 ± 0,109	0,134	2,17	0,164 ± 0,110	0,162 ± 0,090	0,954	0,99	0,246 ± 0,209	0,081 ± 0,052	0,125	0,33	0,035*
72				0,191 ± 0,099	0,092 ± 0,057	0,063	0,48	0,080 ± 0,060	0,126 ± 0,083	0,318	1,56	0,141 ± 0,075	0,087 ± 0,066	0,128	0,61	0,049*
75				0,069 ± 0,055	0,142 ± 0,059	<b>&lt;0,001*</b>	2,06	0,168 ± 0,094	0,192 ± 0,091	0,602	1,14	0,142 ± 0,043	0,077 ± 0,067	<b>0,017*</b>	0,54	0,030*
76				0,175 ± 0,062	0,113 ± 0,138	0,237	0,64	0,113 ± 0,036	0,080 ± 0,056	0,128	0,71	0,094 ± 0,035	0,058 ± 0,042	<b>0,018*</b>	0,61	
77				0,091 ± 0,051	0,397 ± 0,312	0,075	4,35	0,131 ± 0,086	0,284 ± 0,085	<b>0,018*</b>	2,18	0,129 ± 0,155	0,140 ± 0,147	0,753	1,08	
78				0,150 ± 0,048	0,043 ± 0,024	<b>0,043*</b>	0,28	0,068 ± 0,049	0,084 ± 0,027	0,31	1,23	0,045 ± 0,031	0,210 ± 0,089	<b>0,028*</b>	4,72	<0,001*
80				0,056 ± 0,055	0,404 ± 0,367	<b>0,018*</b>	7,18	0,148 ± 0,108	0,419 ± 0,152	<b>0,002*</b>	2,83	0,345 ± 0,213	0,268 ± 0,136	0,398	0,78	0,015*
84	α - amilase	6,9	37	0,093 ± 0,102	0,299 ± 0,161	<b>0,030*</b>	3,21	0,385 ± 0,182	0,317 ± 0,112	0,177	0,82	0,229 ± 0,159	0,118 ± 0,102	0,178	0,51	0,015*
85				0,260 ± 0,057	0,016 ± 0,025	<b>0,043*</b>	0,06	0,123 ± 0,218	0,033 ± 0,040	0,273	0,27	0,072 ± 0,056	0,032 ± 0,035	<b>0,028*</b>	0,45	
86				0,040 ± 0,046	0,055 ± 0,035	0,917	1,38	0,053 ± 0,050	0,064 ± 0,039	0,463	1,2	0,055 ± 0,036	0,103 ± 0,015	<b>0,046*</b>	1,87	
95				0,490 ± 0,262	0,089 ± 0,037	<b>0,028*</b>	0,18	0,086 ± 0,104	0,221 ± 0,074	<b>0,028*</b>	2,58	0,236 ± 0,160	0,071 ± 0,063	<b>0,043*</b>	0,3	0,019*
99				0,255 ± 0,132	0,069 ± 0,014	<b>0,046*</b>	0,27	0,094 ± 0,060	0,156 ± 0,057	0,398	1,66	0,091 ± 0,020	0,114 ± 0,056	0,735	1,26	<0,001*
100				0,109 ± 0,069	0,105 ± 0,076	0,608	0,96	0,177 ± 0,084	0,257 ± 0,082	0,13	1,45	0,245 ± 0,083	0,143 ± 0,094	<b>0,011*</b>	0,58	
106	Actina citoplasmática II	5	44	0,346 ± 0,135	0,642 ± 0,207	<b>0,018*</b>	1,86	0,717 ± 0,122	0,719 ± 0,041	0,975	1	0,658 ± 0,245	0,544 ± 0,122	0,359	0,83	0,016*
108	α - amilase	6,4	47	0,714 ± 0,306	0,112 ± 0,043	<b>0,028*</b>	0,16	0,094 ± 0,071	0,181 ± 0,40	<b>0,028*</b>	1,92	0,092 ± 0,043	0,084 ± 0,069	0,735	0,92	0,002*
109				0,123 ± 0,087	0,081 ± 0,070	1	0,66	0,107 ± 0,119	0,314 ± 0,163	<b>0,018*</b>	2,93	0,231 ± 0,165	0,199 ± 0,218	0,753	0,86	
111				0,013 ± 0,015	0,105 ± 0,066	<b>0,025*</b>	8,08	0,077 ± 0,018	0,105 ± 0,049	0,247	1,36	0,111 ± 0,044	0,128 ± 0,071	0,517	1,15	

Laura Regula Eustáquio Carreira  
Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão

116				0,105 ± 0,066	0,060 ± 0,029	0,249	0,57	0,028 ± 0,009	0,062 ± 0,017	<b>0,018*</b>	2,2	0,044 ± 0,028	0,074 ± 0,040	0,176	1,68	
118				0,073 ± 0,043	0,024 ± 0,026	0,6	0,34	0,055 ± 0,019	0,092 ± 0,042	0,398	1,68	0,063 ± 0,045	0,050 ± 0,034	0,499	0,79	0,011*
120	α - amilase	6,2	60	0,083 ± 0,066	2,212 ± 1,485	<b>0,008*</b>	26,74	1,723 ± 0,945	2,462 ± 0,811	<b>0,018*</b>	1,43	2,625 ± 1,676	0,001 ± 0,000	<b>0,018*</b>	0	<0,001*
129	Região C da cadeia α1 de imunoglobulinas	5,5	65	0,737 ± 0,707	1,732 ± 1,217	0,091	2,35	1,837 ± 0,373	0,979 ± 0,390	<b>0,028*</b>	0,53	0,698 ± 0,297	0,622 ± 0,209	0,866	0,89	0,008*
130				1,341 ± 0,322	0,131 ± 0,129	<b>0,018*</b>	0,1	0,087 ± 0,155	0,197 ± 0,031	0,116	2,26	0,110 ± 0,082	0,152 ± 0,114	1	1,38	<0,001*
131	Região C da cadeia α1 de imunoglobulinas	5,5	65	0,072 ± 0,058	0,871 ± 0,474	<b>0,010*</b>	12,08	1,335 ± 0,680	0,893 ± 0,235	0,083	0,67	1,207 ± 0,400	0,688 ± 0,322	<b>0,017*</b>	0,57	0,004*
132		5,3		1,281 ± 0,644	0,890 ± 0,737	0,333	0,69	1,367 ± 0,541	0,661 ± 0,166	<b>0,012*</b>	0,48	0,968 ± 0,223	0,797 ± 0,434	0,283	0,82	0,014*
133	α - amilase	5,9	60	0,820 ± 0,210	3,580 ± 0,977	<b>0,028*</b>	4,36	3,157 ± 0,802	4,767 ± 1,911	<b>0,043*</b>	1,51	3,819 ± 0,601	2,930 ± 1,162	0,063	0,77	0,002*
134				3,929 ± 1,610	0,705 ± 0,290	<b>0,005*</b>	0,18	0,947 ± 0,503	0,546 ± 0,165	0,075	0,58	0,725 ± 0,172	0,670 ± 0,451	0,686	0,92	<0,001*
144				0,821 ± 0,430	0,929 ± 0,398	0,369	1,13	0,627 ± 0,059	1,101 ± 0,401	<b>0,038*</b>	1,76	0,712 ± 0,217	0,566 ± 0,299	0,258	0,79	0,038*
153	Recetores poliméricos de imunoglobulinas	5,8	100	0,330 ± 0,099	0,716 ± 0,213	<b>0,005*</b>	2,17	0,667 ± 0,160	0,417 ± 0,077	<b>0,021*</b>	0,63	0,580 ± 0,180	0,439 ± 0,237	0,082	0,76	<0,001*
154		5,7		0,417 ± 0,041	0,589 ± 0,240	0,130	4,01	0,910 ± 0,538	0,455 ± 0,095	0,066	0,5	0,659 ± 0,310	0,428 ± 0,237	<b>0,048*</b>	0,65	0,016
155		5,5		0,450 ± 0,115	0,400 ± 0,297	0,678	0,89	0,690 ± 0,322	0,446 ± 0,876	<b>0,047*</b>	0,65	0,665 ± 0,158	0,430 ± 0,243	<b>0,027*</b>	0,65	
156		5,3		0,436 ± 0,132	0,411 ± 0,257	0,81	0,94	0,491 ± 0,251	0,320 ± 0,047	0,096	0,65	0,475 ± 0,140	0,304 ± 0,146	<b>0,046*</b>	0,64	
157		5,2		0,301 ± 0,093	0,345 ± 0,185	0,548	1,15	0,421 ± 0,196	0,266 ± 0,050	0,058	0,63	0,386 ± 0,119	0,273 ± 0,110	<b>0,047*</b>	0,71	

Células em branco, na coluna referente à proteína significam o desconhecimento da proteína que constitui o *spot* correspondente; N=7; \*indica significância estatística considerando um p-value<0.050).

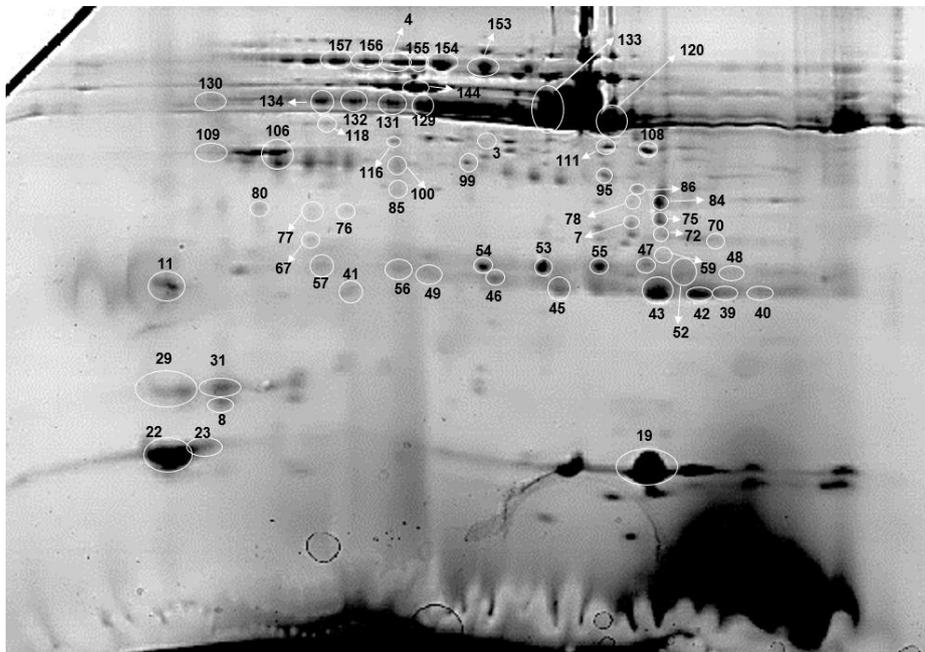


Figura 9: Imagem representativa de um gel de eletroforese bidimensional com a localização de todos os *spots* que tinham alterações significativas (N=7).

Relativamente às proteínas alteradas com os diferentes estímulos, vamos debruçar-nos primeiro sobre aquelas alteradas pelo estímulo olfativo, independentemente da forma como variam em função dos outros estímulos/tratamentos e seguidamente sobre as proteínas onde se observam alterações diferentes consoante o tipo de tratamento (ou seja, onde se observou interação significativa entre o estímulo e o período da recolha).

Vinte e seis proteínas apresentaram variações significativas induzidas pelo cheiro do pão (Tabela 5). Existem *spots* proteicos com níveis de expressão mais elevados após o estímulo, como é o caso dos *spots* 19 e 22 que correspondem a cistatinas do tipo S, 39 e 42 que correspondem à região C da cadeia K de imunoglobulinas, 84, 120 e 133, identificados como  $\alpha$ -amilase, 106 que corresponde à actina citoplasmática II, 131, identificado como região C da cadeia  $\alpha$ 1 de imunoglobulinas e *spots* não identificados como 52, 53, 55, 75, 80, 111 e 153.

Outros *spots* proteicos também variaram significativamente, mas neste caso apresentando uma expressão diminuída após o estímulo olfativo. São os casos dos *spots* 108, identificado como  $\alpha$ -amilase e dos *spots* 40, 54, 56, 78, 85, 95, 99, 130 e

134, cuja identificação não é conhecida. Na Figura 10 temos a localização dos spots proteicos cujos níveis de expressão apresentam diferenças significativas entre o momento imediatamente antes de cheirar o pão e imediatamente após.

Tabela 5: Proteínas que se encontram significativamente alteradas após o estímulo olfativo.

<b>Spot</b>	<b>Proteína (Id)</b>	<b>Sentido da Variação</b>	<b>p</b>
19	Cistatina	↑	<b>0,009*</b>
22		↑	<b>0,009*</b>
39		↑	<b>0,003*</b>
40		↓	<b>0,004*</b>
42	Região C da cadeia K de imunoglobulinas	↑	<b>0,032*</b>
52		↑	<b>0,043*</b>
53		↑	<b>0,018*</b>
54		↓	<b>0,014*</b>
55		↑	<b>0,020*</b>
56		↓	<b>0,028*</b>
75		↑	<b>&lt;0,001*</b>
78		↓	<b>0,043*</b>
80		↑	<b>0,018*</b>
84	α – amilase	↑	<b>0,030*</b>
85		↓	<b>0,043*</b>
95		↓	<b>0,028*</b>
99		↓	<b>0,046*</b>
106	Actina citoplasmática II	↑	<b>0,018*</b>
108	α – amilase	↓	<b>0,028*</b>
111		↑	<b>0,025*</b>
120	α – amilase	↑	<b>0,008*</b>
130		↓	<b>0,018*</b>

<b>131</b>	Região C da cadeia $\alpha 1$ de imunoglobulinas	↑	<b>0,010*</b>
<b>133</b>	$\alpha$ – amilase	↑	<b>0,028*</b>
<b>134</b>		↓	<b>0,005*</b>
<b>153</b>	Recetores poliméricos de imunoglobulinas	↑	<b>0,005*</b>

Células em branco, na coluna referente à proteína significam o desconhecimento da proteína que constitui o *spot* correspondente; [(N=7) \*- significativo para p-value < 0,05 ]

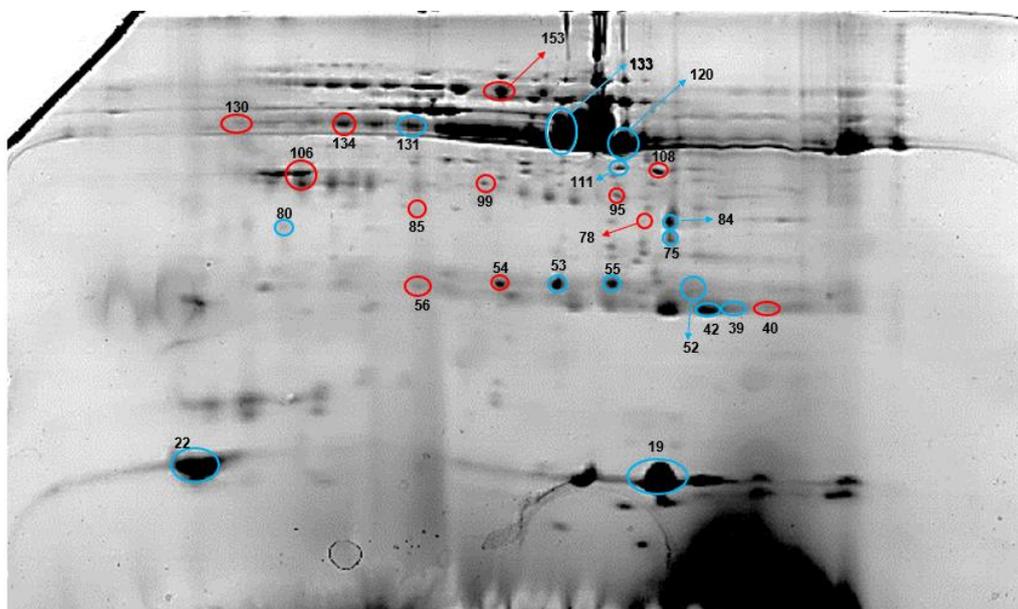


Figura 10: Imagem representativa de um gel bidimensional onde se encontram assinalados os *spots* que se encontram significativamente alterados por influência do cheiro do pão. [a azul os *spots* que se encontram aumentados após o estímulo e a vermelho os que se encontram diminuído após o estímulo (N=7)]

Algumas das alterações induzidas pelo cheiro do pão foram observadas como sendo semelhantes às induzidas pela mastigação desse alimento, não se observando essas mesmas alterações com a mastigação do arroz. Os *spots* para os quais isso se observou estão indicados na Tabela 6. Apenas obtivemos seis *spots* nestas condições: *spots* 19 e 22, identificados como cistatinas S, que aumentaram em ambos os tratamentos, *spots* 120 e 133, correspondentes a  $\alpha$ -amilase s e que também se

encontram aumentados por ambos os estímulos, *spot* 80, também aumentou, mas não identificado e *spot* 134, diminuído em resposta a ambos os estímulos com pão e que está assinalado a amarelo na Figura 11.

Tabela 6: Proteínas que se encontram alteradas após o estímulo olfativo e após o estímulo mastigatório, no mesmo sentido.

<b>Spot</b>	<b>Id</b>	<b>Cheirar o pão</b>	<b>p</b>	<b>Mastigar pão</b>	<b>p</b>
19	Cistatinas	↑	0,009*	↑	0,030*
22		↑	0,009*	↑	0,002*
80		↑	0,018*	↑	0,002*
120	α – amilase	↑	0,008*	↑	0,018*
133		↑	0,028*	↑	0,043*
134		↓	0,005*	↓	0,075

Células em branco, na coluna referente à proteína significam o desconhecimento da proteína que constitui o *spot* correspondente; [(N=7) \*- significativo para p-value < 0,05)].

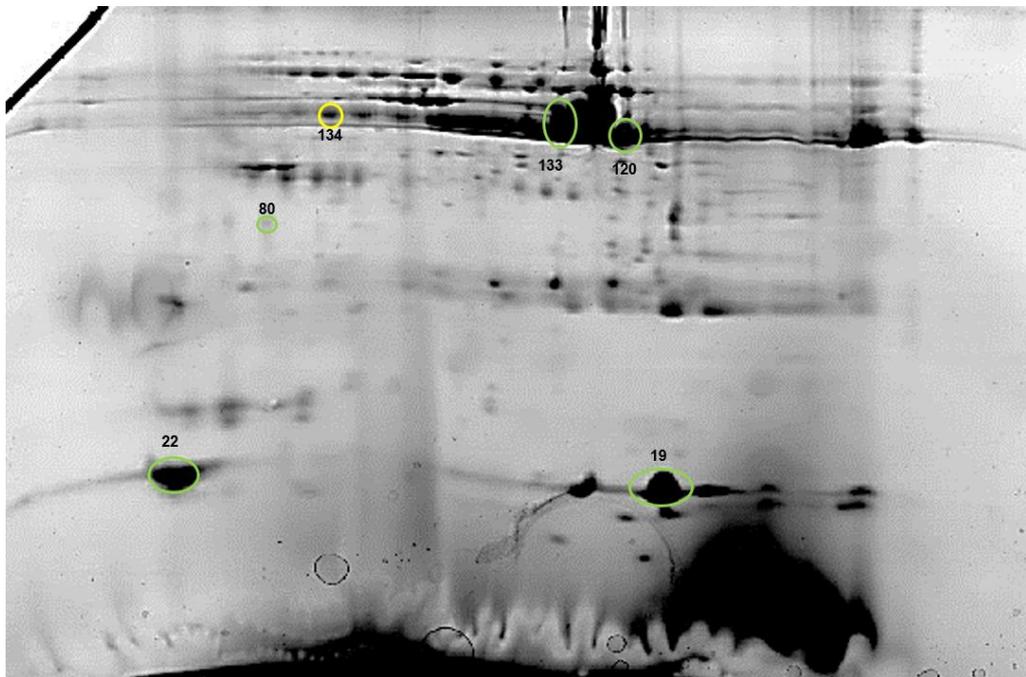
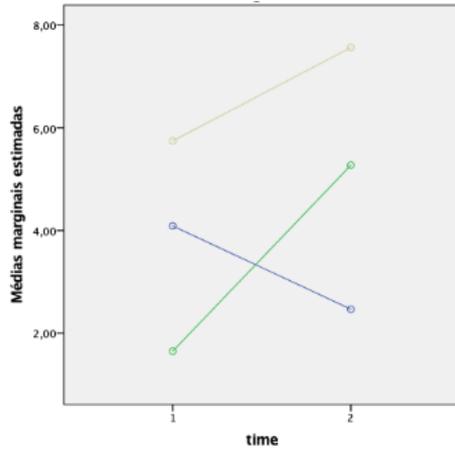


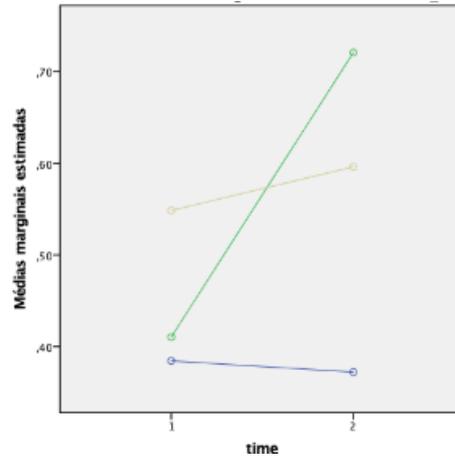
Figura 11: Imagem representativa de um gel bidimensional onde se estão assinalados os *spots* que se encontram alterados pelo estímulo mastigatório do mesmo modo que se encontram alterados pelo estímulo olfativo. [a verde o *spot* que está, tendencialmente diminuído após o estímulo olfativo e mastigatório e a amarelo os que aumentam significativamente a sua expressão após o estímulo olfativo e mastigatório (N=7)].

Dezanove *spots* proteicos variaram de forma diferente entre os diferentes tratamentos (Figura 12). Um dos resultados mais evidentes foi a interação significativa em muitos *spots* identificados como cadeias de imunoglobulinas (42, 43, 45, 131, 153 e 154) e em *spots* que, mesmo não tendo sido identificados, têm uma localização que faz crer na possibilidade de também o serem (Figura 9), como são os casos dos *spots* 48 e 55. Para todos estes *spots* a interação significativa deve-se a uma variação no sentido de aumento de expressão, com o cheiro do pão e de uma diminuição de expressão com a mastigação, quer de pão, quer de arroz. Ainda dentro dos *spots* para os quais são conhecidas as proteínas que os constituem, há um aumento de um *spot* de amilase (*spot* 84) e um aumento de um *spot* de actina citoplasmática II (*spot* 106) com o cheiro, que não ocorre com os tratamentos onde houve mastigação de pão ou arroz.

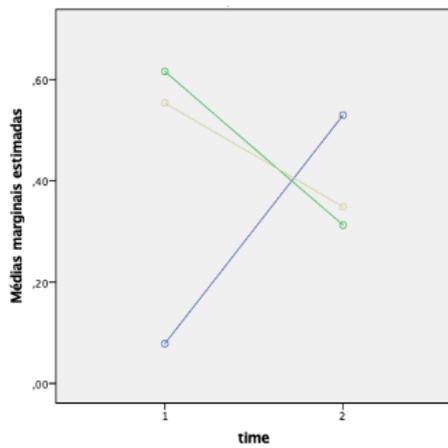
Spot 11



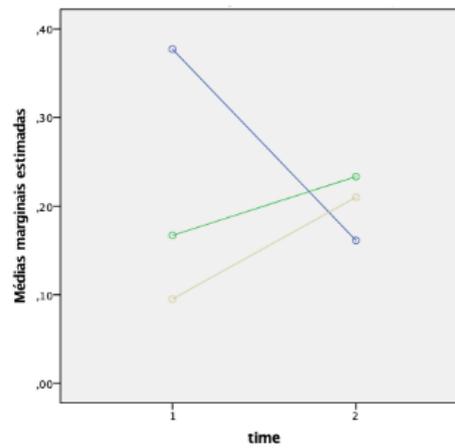
Spot 29



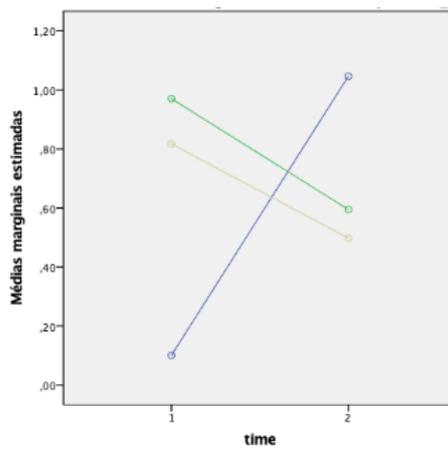
Spot 39



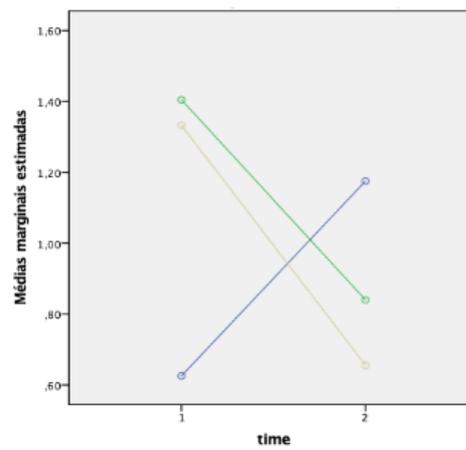
Spot 41



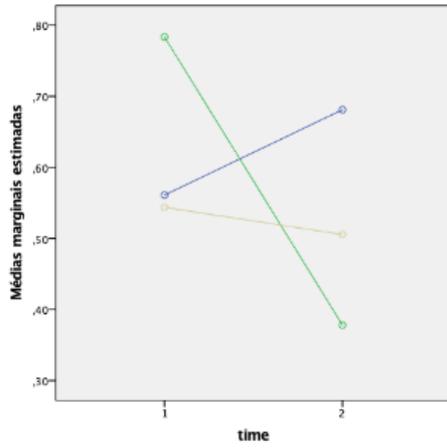
Spot 42



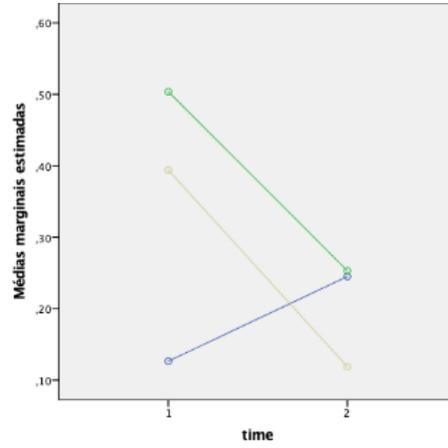
Spot 43



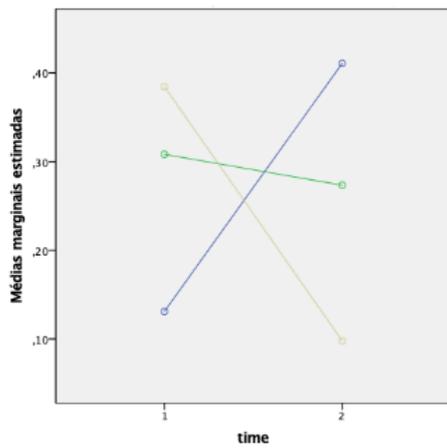
Spot 45



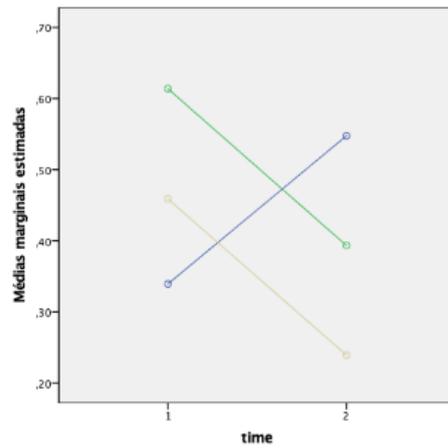
Spot 48



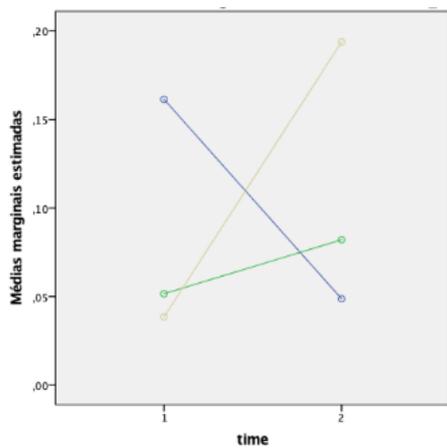
Spot 52



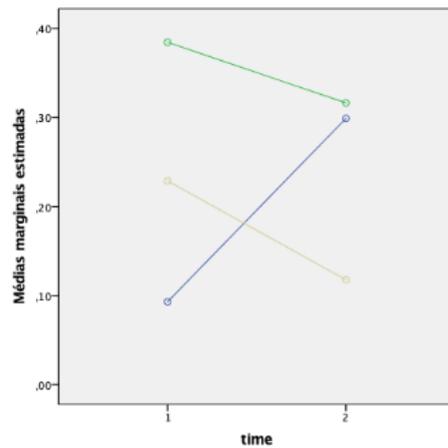
Spot 55



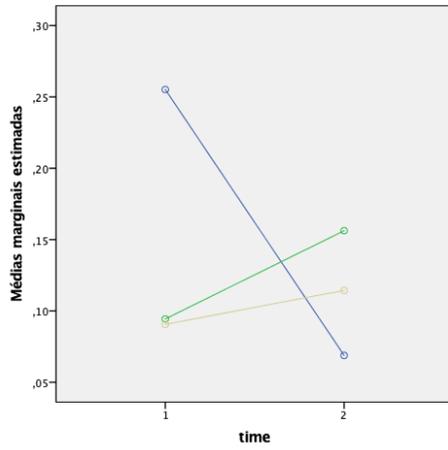
Spot 78



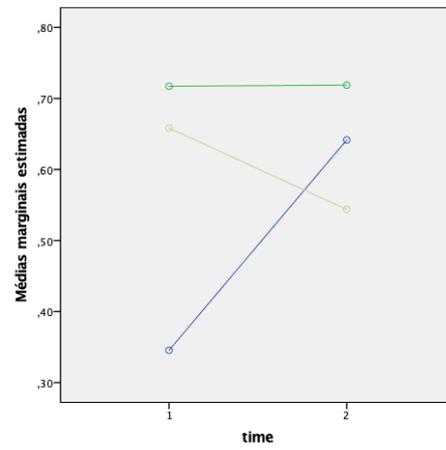
Spot 84



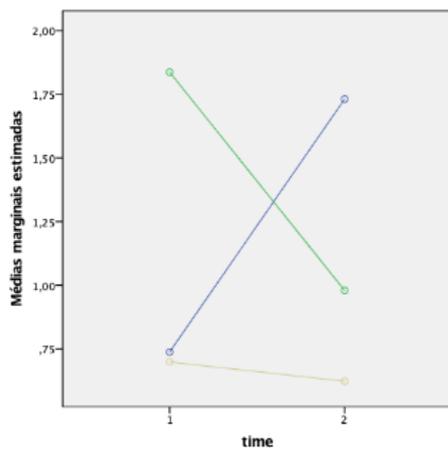
Spot 99



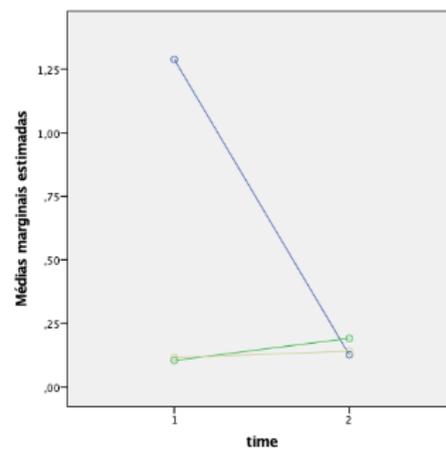
Spot 106



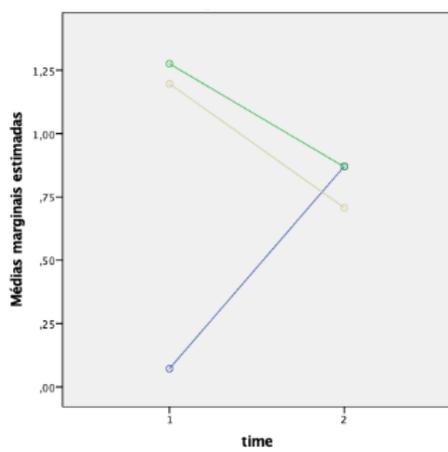
Spot 129



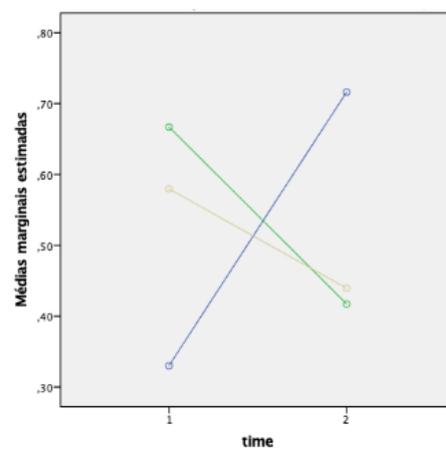
Spot 130



Spot 131



Spot 153



### Spot 154

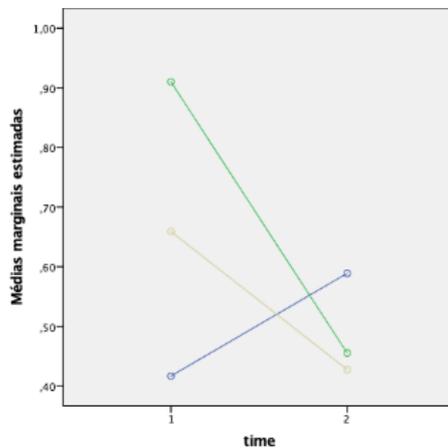


Figura 12: Variação na percentagem de volume dos *spots* para os quais houve interação significativa ( $p$  value < 0,05). [ (1- imediatamente antes do estímulo e 2- imediatamente após o estímulo) (a azul está representado o estímulo olfativo, a verde o estímulo mastigatório com o pão e a amarelo o estímulo mastigatório com o arroz)].

## 4.2. Relação entre as emoções e as alterações na componente bioquímica da saliva

### 4.2.1. Principais emoções sentidas

Para relacionarmos as emoções com as alterações na componente bioquímica da saliva recorreremos às respostas que nos foram facultadas pelos nossos voluntários, no momento após o contacto olfativo com o pão. Através da Figura 13 é possível observar que emoções como irritação, enjoo, surpresa desagradável, diversão e tristeza são escassamente sentidas. Já emoções como bem-estar, conforto, desejo, sensação de água na boca e interesse são as mais reportadas.

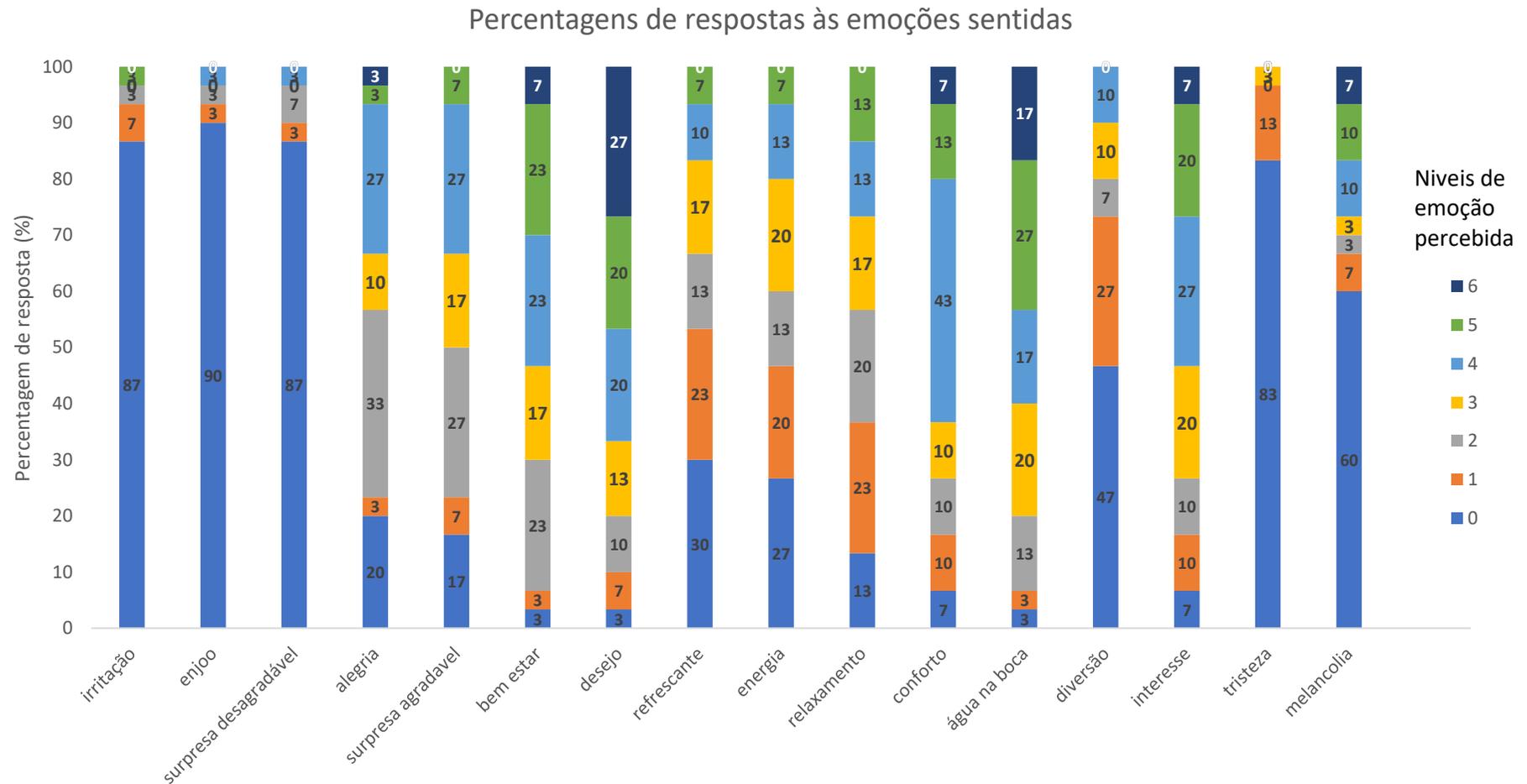


Figura 13: Gráfico representativo das respostas dos voluntários relativamente às emoções sentidas no momento de contacto olfativo com o pão. As diferentes cores correspondem aos diferentes níveis de emoção percebida e os números em cada uma das barras indicam a percentagem de indivíduos para cada nível de resposta.

## 4.2.2. De que forma a saliva se associa às emoções?

Através de análise de componentes principais (PCA) tentou-se reduzir o número de variáveis, agrupando-se as emoções em componentes. As 3 primeiras componentes permitiram explicar cerca de 66 % de variação (Tabela 7).

Tabela 7: Emoções que contribuem para a explicação de cada componente principal.

	Componentes		
	1	2	3
<b>Irritação</b>			0,871
<b>Enjoo</b>	- 0,310		0,855
<b>Surpresa Desagradável</b>			0,343
<b>Alegria</b>	0,719	0,439	
<b>Surpresa Agradável</b>	0,735	0,377	
<b>Bem-estar</b>	0,807	0,382	
<b>Desejo</b>	0,896		
<b>Refrescante</b>	0,317	0,744	
<b>Energia</b>		0,822	
<b>Relaxamento</b>	0,325	0,739	-0,348
<b>Conforto</b>	0,610	0,362	-0,390
<b>Água na boca</b>	0,825		
<b>Diversão</b>		0,914	
<b>Interesse</b>	0,776		
<b>Melancolia</b>			- 0,393

No entanto, considerando estas como variáveis explicativas, num modelo de regressão linear, não foi possível encontrar nenhum modelo bom (ou seja, com elevada

percentagem de explicação das variações na variável dependente). Assim, foram testados modelos de regressão linear considerando as diferentes emoções sem estarem agrupadas.

Através desta regressão conseguimos obter modelos explicativos para três dos nossos parâmetros.

No que diz respeito à variação da taxa de secreção salivar ( $\Delta$  taxa de secreção), esta está associada positivamente com o desejo sentido ( $\Delta$  taxa de secreção =  $0,225 + 0,152$  Desejo;  $R^2$  ajustado de 38,8 % e  $p$ -value < 0,001).

Relativamente aos níveis de cortisol salivar, as variações no mesmo ( $\Delta$  cortisol) associam-se negativamente com a sensação de bem-estar e positivamente com a sensação de desejo ( $\Delta$  cortisol =  $0,045 - 0,063$  (bem – estar) +  $0,049$  desejo;  $R^2$  ajustados de 60,9 % e  $p$ -value < 0,001).

Os níveis de variação da atividade enzimática da amilase também parecem responder às emoções sentidas. A variação da atividade enzimática de amilase salivar ( $\Delta$  amilase ) associa-se positivamente ao desejo, ou seja, maiores níveis de desejo estão associados a maiores aumentos de atividade enzimática deste proteína salivar ( $\Delta$  amilase =  $-96,784 + 22,513$  (desejo),  $R^2$  ajustado de 16 % e  $p$ -value = 0,029).



---

## Capítulo V - Discussão

---





O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações, na composição da saliva, induzidas pelo contacto olfativo com um alimento e se essas são semelhantes às alterações induzidas pela mastigação/ingestão do mesmo alimento. Para além disso, e tendo em conta que os estímulos olfativos são fortes desencadeadores de emoções, avaliou-se também o efeito que estas últimas podem ter nas alterações salivares.

O que motivou este trabalho foi a existência de associação entre estímulos pré-ingestivos e salivação, como demonstrado no trabalho de Cavazzana *et al.*, 2017, onde se observaram diferenças na perceção de um refrigerante mediante o recipiente onde este é servido, ou mesmo na conhecida experiência de Pavlov, onde um estímulo auditivo foi suficiente para desencadear a salivação nos cães (Mcleod, 2013).

Que seja do nosso conhecimento, é a primeira vez que alterações no proteoma salivar são descritas em resposta ao estímulo olfativo de um alimento. As recolhas foram feitas antes e depois de cada estímulo (com exceção do estímulo olfativo, em que devido à natureza do estímulo, a recolha teve que ser feita durante a estimulação). Os tratamentos foram separados entre si por um período de tempo de, pelo menos 15 minutos, para minimizar algum efeito cumulativo (Bonneau *et al.*, 2018).

Um dos parâmetros salivares que variou com a estimulação olfativa foi a taxa de secreção salivar, que aumentou, sendo também observado após os outros tratamentos. Assim, a resposta em termos de taxa de secreção não é unicamente causada pelo estímulo olfativo. Estes resultados seguem a mesma linha dos obtidos noutros trabalhos, como por exemplo o de Drago *et al.*, 2011; Esteban-fernández *et al.*, 2016; Perez-jiménez *et al.*, 2019; Chambaron *et al.*, 2015 e o de Morquecho-Campos *et al.*, 2019. Neste último trabalho, os autores testaram a influência de odores alimentares e não alimentares em parâmetros salivares e observaram também um aumento na taxa de secreção. Para além disso, obtiveram uma correlação significativa entre o aumento da taxa de secreção salivar e o fenómeno “água na boca” descrito pelos voluntários, o que no nosso caso não se observou. Ou seja, não foram os indivíduos que referiram perceber mais “água na boca” que tiveram maiores aumentos na taxa de secreção. Ainda assim, o parâmetro emocional “sentir água na boca” foi um dos mais referidos aquando do cheiro do pão. É possível que o incremento na taxa de fluxo salivar tenha

sido motivado pela expectativa do consumo desse alimento. Empiricamente é conhecido que o desejo de ingerir um alimento desencadeia o processo de salivação, como se a cavidade oral se estivesse a preparar para receber este alimento. De facto, isto é corroborado pelos resultados obtidos, ao associar a taxa de secreção salivar com as emoções percebidas durante o estímulo, onde a emoção que se associa significativamente à taxa de secreção é o desejo. E esta emoção correlaciona-se positivamente, isto é quanto maior o desejo sentido pelos voluntários para comerem o pão maior a sua taxa de secreção salivar. A resposta, por parte das glândulas, ao estímulo olfativo poderá estar relacionada com o sistema nervoso parassimpático, sendo o referido responsável pelo aumento da quantidade de água produzida e consequente sensação “água na boca” (Pedersen *et al.*, 2018) Todavia, o tipo de estimulação responsável pela resposta secretória ao estímulo olfativo não é consensual, com autores como Ilangakoon & Carpenter (2011) a referirem que o odor induz a produção de saliva por parte das glândulas submandibular e sublingual e não da glândula parótida. O facto de não terem sido observadas variações significativas na concentração em proteína total, induzidas pelo odor do pão pode dever-se a esta ativação inicial do sistema nervoso parassimpático, antecipando a ingestão e sem que haja a mesma ativação por parte dos nervos do sistema simpático, o qual é o principal responsável pelo aumento da concentração proteica (Carpenter, 2013). A sensação de “água na boca” foi também sugerida como devendo-se à ação dos músculos faciais, os quais exercerão pressão sobre os ductos salivares, involuntariamente, causando uma maior libertação de saliva pela parte destes para a cavidade oral (Carpenter, 2013). Também Pedersen *et al.*, (2018) referem que a salivação após visualização de um prato apetitoso está relacionada com o aumento da atividade da língua e dos lábios, o que irá desencadear a libertação de saliva que se encontrava armazenada.

No que diz respeito ao proteoma salivar, observaram-se alterações induzidas pelos diferentes tratamentos. Algumas das proteínas que se encontram aumentadas, quer após o cheiro do pão, quer após mastigar esse alimento, mas que não variam no mesmo sentido após mastigar arroz são proteínas como as cistatinas e a  $\alpha$ -amilase salivar, que aumentam com o estímulo olfativo e mastigatório, as regiões C quer da cadeia K quer da  $\alpha$ 1 de imunoglobulinas que se encontram aumentadas após o estímulo

olfativo mas diminuídas após o estímulo mastigatório, a actina citoplasmática II que se encontra aumentada apenas aquando o estímulo é olfativo, e , ainda duas proteínas não identificadas, *spots* 55 e 153 que se encontram aumentadas após o estímulo olfativo, com resultados análogos para o estímulo mastigatório.

As cistatinas são fosfoproteínas que têm propriedades inibidoras de protéases, antifúngicas e antimicrobianas. Estas proteínas possuem diferentes isoformas (Cistatina A, Cistatina B, Cistatina S, Cistatina SN, Cistatina SA e Cistatina D) na saliva humana (Marie *et al.*, 2019). Estão relacionadas com a sensibilidade gustativa, nomeadamente à capacidade de resposta ao gosto amargo (Rodrigues, 2017). As cistatinas do tipo S são maioritariamente produzidas pela glândula submandibular. Assim, uma hipótese é que este aumento, com o estímulo olfativo, signifique uma maior estimulação/secreção por parte das glândulas submandibulares. Estes aumentos vão de encontro ao que foi sugerido por Ilangakoon & Carpenter (2011), tal como referido anteriormente, de que o estímulo olfativo vai estimular principalmente as glândulas submandibulares. Há, no entanto, que ter em conta que este aumento também se observou aquando da mastigação de pão e não aquando da mastigação de arroz, sugerindo que esse aumento tenha a ver com a perceção do cheiro do pão, mesmo durante o período em que ele é mastigado.

Já no que diz respeito à  $\alpha$ -amilase, cujo aumento induzido pelo estímulo está positivamente correlacionado com o desejo, já há mais dúvidas acerca do seu aumento, em resposta ao cheiro do pão, se dever a um aumento na estimulação das glândulas submandibulares. Esta proteína salivar é produzida maioritariamente na parótida e em menor quantidade na glândula submandibular (Marie *et al.*, 2019). Num trabalho com saliva artificial, Pagès-hélary *et al.*, (2014), verificaram que a amilase , em conjunto com as mucinas, tinha a capacidade de reter compostos aromáticos, no entanto sem presença das mucinas obtinham-se resultados contraditórios. Apesar desta maior produção, por parte das glândulas parótidas e da hipótese de estimulação destas por parte do odor, também não podemos descartar completamente um aumento desta proteína em resposta a estimulação das glândulas submandibulares. A verdade é que só dois dos *spots* de amilase foram observados aumentados pelo pão (cheiro e

mastigação). Estudos futuros, que possam esclarecer se estas formas são provenientes das glândulas parótidas ou das glândulas submandibulares são necessários.

Independentemente da proveniência, o facto de *spots* de cistatinas e amilase se encontrarem aumentados em resposta aos tratamentos “cheiro do pão” e “mastigação do pão” e não o estarem em resposta à mastigação de arroz, permitir colocar a hipótese da cavidade oral apenas com o estímulo olfativo sofrer alterações “em antecipação”, e inicia processos semelhantes aqueles que ocorrem aquando da ingestão do alimento

O aumento dos níveis de expressão de *spots* de amilase, em ambos os tratamentos envolvendo pão, sugere que isto se deva mais aos aspetos sensoriais deste alimento, como referido anteriormente, do que ao teor em amido. Apesar de se saber que esta proteína está envolvida na degradação do amido, num trabalho recente, Lamy et al., que se encontra em processo de publicação, observou-se que o aumento da amilase dependia da perceção sensorial do pão. Para além disso, tivemos o cuidado de fornecer aos nossos voluntários exatamente a mesma quantidade de amido sob a forma de arroz branco cozido, eliminando a hipótese desta alteração se dever ao amido do alimento.

Ainda de realçar a pertinência da hipótese levantada anteriormente, de que os *spots* de amilase alterados possam corresponder a formas provenientes das glândulas submandibulares, pelo facto de também não se observarem variações na atividade enzimática total de amilase. Neste último caso, o que parece ter motivado mais o aumento da atividade enzimática da amilase foi o desejo pelo pão. É possível que o desejo sentido pelos nossos voluntários seja um mecanismo com características de “stress” (ainda que não seja um stress negativo), no sentido de desencadear “a procura de alimento”. Esse desejo pode resultar nalguma ativação do sistema nervoso simpático, e conseqüentemente numa maior produção de amilase.

As imunoglobulinas que se encontram na saliva são maioritariamente a IgA e a IgG, sendo que a primeira é dimérica e produzida por células plasmáticas no estroma das glândulas salivares. Esta é transportada pelos recetores de Imunoglobulinas poliméricos, sendo excitada após a clivagem do recetor. Assim, a forma que aparece na saliva é uma IgAs, a qual contém uma pequena porção do recetor. Já a maioria das

IgG atinge a saliva pelo fluido crevicular após o transporte passivo da mesma a partir do sangue, todavia, há uma percentagem residual que é produzida pelas glândulas salivares (Marie *et al.*, 2019). As imunoglobulinas M, D e E encontram-se na saliva mas em concentrações muito reduzidas (Marie *et al.*, 2019). As imunoglobulinas também foram relacionadas com a percepção do gosto amargo (Rodrigues, 2017). No entanto, o motivo pelo qual elas sofrem alterações diferentes consoante o tipo de estímulo, não parece dever-se muito à componente sensorial específica do alimento. Para vários *spots*, identificados como cadeias de imunoglobulinas, a mastigação, quer do pão, quer do arroz, causou diminuições dos níveis de expressão. Essas diminuições não só não se observaram com o cheiro do pão, como nalguns casos, houve mesmo aumentos significativos. Noutros trabalhos, feitos recentemente no laboratório (ex: Beatriz Sabino, 2019; Colaço, 2019; Ferreira, 2019; Fontes, 2019; Piteira, 2019) observou-se constantemente uma diminuição dos níveis de expressão de bandas proteicas contendo Ig, induzida pelo consumo de alimento, mesmo tratando-se de alimentos diferentes. O motivo que está na base desta diminuição, causada pela mastigação/ingestão de alimentos não é conhecido, sendo necessários mais estudos que ajudem a elucidar este aspeto.

Uma vez que estivemos a avaliar emoções desencadeadas pelo cheiro do alimento, um dos parâmetros salivares que foi avaliado foi o cortisol salivar. Este analito é normalmente usado para avaliar os níveis de stress e sabe-se que níveis de stress mais elevados podem influenciar o comportamento alimentar e as sensações de apetite/saciedade (Cano-López *et al.*, 2019). No presente trabalho, os níveis de cortisol salivar encontraram-se relacionados com o bem-estar e com o desejo. Tal como foi referido anteriormente, este desejo, provocado pelo cheiro do alimento, pode desencadear um mecanismo de “stress”, no sentido da procura por esse alimento. Isto é reforçado pela relação positiva, com esta emoção, que foi observada neste trabalho. De forma concordante, os níveis de cortisol associaram-se negativamente com a sensação de “bem-estar”.





---

## Capítulo VI - Conclusão

---





Os resultados obtidos no presente trabalho permitem-nos concluir que o estímulo olfativo conduz a alterações na saliva, mais concretamente no proteoma salivar e em parâmetros como a taxa de secreção. Algumas das alterações, como o incremento nos níveis de expressão de proteínas como as cistatinas e a  $\alpha$ -amilase, que ocorrem no mesmo sentido em resposta ao odor e à mastigação do pão, levam-nos a sugerir que o estímulo olfativo desencadeia respostas salivares semelhantes às desencadeadas pela mastigação/ingestão. Assim, parece que este estímulo pré-ingestivo, é suficiente para desencadear respostas no sentido de preparar a cavidade oral para a ingestão daquele alimento em particular.

Este estudo permite-nos também concluir que as respostas salivares induzidas pelo estímulo olfativo dependem também das emoções desencadeadas por esse estímulo.

Existem proteínas que carecem de ser identificadas e que, provavelmente, auxiliaram a elucidar o comportamento das glândulas salivares aquando o contacto olfativo com um aroma alimentar. Ainda assim, os nossos resultados parecem ajudar a suportar que o cheiro dos alimentos vai desencadear uma resposta por parte das glândulas submandibulares, uma vez que proteínas provenientes destas glândulas, como as cistatinas, foram umas das que aumentaram em resposta a este estímulo. No entanto, são necessários estudos que ajudem a elucidar a composição proteica (em termos de isoformas) de cada uma das diferentes glândulas salivares.

Embora o presente trabalho tenha sido muito importante para que percebamos as diferenças na composição proteómica salivar induzidas pelo odor alimentar, deverão ser feitos estudos futuros de modo a identificar algumas proteínas, não identificadas no presente trabalho, e a elucidar o papel das proteínas que se encontram alteradas e a sua relação com o consumo alimentar. Um dos trabalhos futuros a realizar será a análise do perfil proteico de todos os indivíduos envolvidos neste estudo, por técnicas de separação unidimensional, uma vez que a eletroforese bidimensional não permite a análise a um grande número de indivíduos, de modo a avaliar o efeito das emoções na resposta ao cheiro, por parte de proteínas particulares.





---

## Capítulo VII - Referências Bibliográficas

---





- Amado, F.M.L., Ferreira, R.P., Vitorino, R., 2013. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clin. Biochem.* 46, 506–517. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.10.024
- Beatriz Sabino, 2019. Influência do consumo de diferentes alimentos na composição proteica da saliva.
- Bernhardt, J., 2018. Electrophoresis : Two Dimensional Gels ☆, 3rd ed, Encyclopedia of Analytical Science, 3rd Edition. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14539-1
- Beverly, A.B., Zhu, L., Fish, T.L., Thannhauser, T., Rutzke, M.A., Miller, D.D., 2012. Green Tea Ingestion by Rats Does Not Affect Iron Absorption but Does Alter the Composition of the Saliva Proteome 77, 96–104. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02658.x
- Bjellqvist, B., Ek, K., Giorgio Righetti, P., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W., 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6, 317–339. doi:10.1016/0165-022X(82)90013-6
- Bonjoch, N., Tamayo, P., 2001. Protein content quantification by Bradford method 283–295. doi:10.1007/0-306-48057-3
- Bonneau, A., Boulanger, R., Lebrun, M., Maraval, I., Valette, J., Guichard, É., Gunata, Z., 2018. Impact of fruit texture on the release and perception of aroma compounds during in vivo consumption using fresh and processed mango fruits. *Food Chem.* 239, 806–815. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.017
- Brandão, E., Soares, S., Mateus, N., Freitas, V. De, 2014. Human saliva protein profile : Influence of food ingestion 64, 508–513. doi:10.1016/j.foodres.2014.07.022
- Cano-López, I., Cano-López, B., Hidalgo, V., Salvador, A., González-Bono, E., 2019. Stress Response and Appetite Regulation in Overweight and Normal-Weight Young Men: Preliminary Data. *Psychol. Stud. (Mysore)*. 64, 21–29. doi:10.1007/s12646-019-00479-1
- Carpenter, G.H., 2013. The Secretion , Components , and Properties of Saliva. doi:10.1146/annurev-food-030212-182700

- Carreira, L., 2017. Pesquisa de biomarcadores na saliva por técnicas de proteômica  
Pesquisa de biomarcadores na saliva por técnicas de proteômica.
- Cavazzana, A., Larsson, M., Hoffmann, E., Hummel, T., Haehner, A., 2017. The vessel's shape influences the smell and taste of cola. *Food Qual. Prefer.* 59, 8–13. doi:10.1016/j.foodqual.2017.01.014
- Chambaron, S., Chisin, Q., Chabanet, C., Issanchou, S., Brand, G., 2015. Impact of olfactory and auditory priming on the attraction to foods with high energy density. *Appetite* 95, 74–80. doi:10.1016/j.appet.2015.06.012
- Charles, M., Poinot, P., Texier, F., Arvisenet, G., Vigneau, E., Mehinagic, E., Prost, C., 2013. The ' Mouth to Nose Merging System ': A novel approach to study the impact of odour on other sensory perceptions. *Food Qual. Prefer.* 28, 264–270. doi:10.1016/j.foodqual.2012.10.003
- Colaço, A., 2019. Influência do consumo de iogurte na composição proteica da saliva.
- Davies, G.A., Wantling, E., Stokes, J.R., 2009. Food Hydrocolloids The influence of beverages on the stimulation and viscoelasticity of saliva : Relationship to mouthfeel ? *Food Hydrocoll.* 23, 2261–2269. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.06.002
- Déléris, I., Saint-Eve, A., Saglio, A., Souchon, I., Trelea, I.C., 2016. Insights in aroma compound retention by mucosa during consumption through mathematical modelling. *J. Food Eng.* 190, 123–138. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.06.018
- Dinnella, C., Recchia, A., Vincenzi, S., Tuorila, H., Agrarie, B., Donizetti, V., Interdipartimentale, C., 2010. Temporary Modification of Salivary Protein Profile and Individual Responses to Repeated Phenolic Astringent Stimuli 75–85. doi:10.1093/chemse/bjp084
- Drago, S.R., Panouillé, M., Saint-Eve, A., Neyraud, E., Feron, G., Souchon, I., 2011. Relationships between saliva and food bolus properties from model dairy products. *Food Hydrocoll.* 25, 659–667. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.07.024
- El, K., Wei, F., Rao, S.L., Kim, J., Shin, H., Cheng, J., Tu, M., Wong, D.T.W., Kim, Y., 2019. BBA - Reviews on Cancer Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection 1872, 49–59. doi:10.1016/j.bbcan.2019.05.007
- Ellis, G., 1991. *Surgical Pathology of the Salivary Glands.* W B Saunders Co. 657.
- Emmelin N, 1987. Nerve interactions in salivary glands. *J Dent Res* 66, 509–517.
- Engelen, L., Wijk, R.A. De, Prinz, J.F., Bilt, A. Van Der, Bosman, F., 2003. The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and

- texture attributes in custard desserts 78, 165–169.
- Epel, E., Lapidus, R., McEwen, B., 2001. Stress may add bite to appetite in women : a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior 26, 37–49.
- Esteban-fernández, A., Rocha-alcubilla, N., Muñoz-gonzález, C., Moreno-arribas, M.V., Pozo-bayón, M.Á., 2016. Intra-oral adsorption and release of aroma compounds following in-mouth wine exposure 205, 280–288.  
doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.030
- Esteves, C.V., Campos, W.G. de, Souza, M.M. de, Lourenço, S.V., Siqueira, W.L., Lemos-Júnior, C.A., 2019. Diagnostic potential of saliva proteome analysis: a review and guide to clinical practice. *Braz. Oral Res.* 33, 1–13. doi:10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0043
- Ferreira, R., 2019. Comparação do perfil proteico salivar antes e após a degustação de vinhos.
- Fleming, A.S., Steiner, M., Corter, C., 1997. Cortisol, hedonics, and maternal responsiveness in human mothers. *Horm. Behav.* 32, 85–98.  
doi:10.1006/hbeh.1997.1407
- Fontes, M., 2019. Influência do consumo de pão na composição proteica da saliva.
- Fukui, H., Toyoshima, K., 2014. The effects of odor on cortisol and testosterone in healthy adults.
- García-blanco, A., Vento, M., Diago, V., Cháfer-pericás, C., 2016. Reference ranges for cortisol and  $\alpha$ -amylase in mother and newborn saliva samples at different perinatal and postnatal periods. *J. Chromatogr. B* 1022, 249–255.  
doi:10.1016/j.jchromb.2016.04.035
- Genovese, A., Caporaso, N., Civitella, A., Sacchi, R., 2014. Effect of human saliva and sip volume of coffee brews on the release of key volatile compounds by a retronasal aroma simulator. *FRIN* 61, 100–111. doi:10.1016/j.foodres.2014.02.034
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics 3665–3685. doi:10.1002/pmic.200401031
- Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Schneider, Y., 2015. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination 480, 28–30. doi:10.1016/j.ab.2015.03.024
- Harris M, Edgar M, M.S., 1998. Saliva: its secretion, composition and functions. *Clin. Oral Sci.* 179–189.

- Henkin, R.I., Martin, B.M., Agarwal, R.P., 1999. Efficacy of Exogenous Oral Zinc in Treatment of Patients with Carbonic Anhydrase VI Deficiency. *Am. J. Med. Sci.* 318, 392–405. doi:10.1016/S0002-9629(15)40664-0
- Hu, S., Loo, J.A., Wong, D.T., 2006. Human body fluid proteome analysis 6, 6326–6353. doi:10.1002/pmic.200600284.Human
- Huang, C., 2004. Comparative proteomic analysis of human whole saliva 951–962. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.06.003
- Humphrey, S.P., Williamson, R.T., 2001. A review of saliva: Normal composition, flow, and function 85.
- Ilankoon, Y., Carpenter, G.H., 2011. IS THE MOUTHWATERING SENSATION A TRUE SALIVARY REFLEX ? 42, 212–216. doi:10.1111/j.1745-4603.2011.00290.x
- Kershaw, J.C., Running, C.A., 2018. Conditioning of human salivary flow using a visual cue for sour candy. *Arch. Oral Biol.* 92, 90–95. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.05.010
- Lamy, E., 2013. Avaliação das alterações do perfil proteico salivar em indivíduos com obesidade mórbida nas fases pré- e pós cirurgia bariátrica.
- Lamy, E., Morzel, M., Rodrigues, L., Pinheiro, C., Costa, A.R., Antunes, C.M., Lopes, O., 2015a. The use of electrophoresis for the study of saliva involvement in ingestive behavior.
- Lamy, E., Simões, C., Rodrigues, L., Costa, A.R., Vitorino, R., Amado, F., Antunes, C., do Carmo, I., 2015b. Changes in the salivary protein profile of morbidly obese women either previously subjected to bariatric surgery or not. *J. Physiol. Biochem.* 71, 691–702. doi:10.1007/s13105-015-0434-8
- Lee, V., Linden, R., 1992. An olfactory-submandibular salivary reflex in humans. *Exp. Physiol.* 77, 221–224. doi:10.1113/expphysiol.1992.sp003578
- Lee, V.M., Linden, R.W.A., 1992. The effect of odours on stimulated parotid salivary flow in humans. *Physiol. Behav.* 52, 1121–1125. doi:10.1016/0031-9384(92)90470-M
- Leite, M.F., 2006. Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas.
- Marie, A., Pedersen, L., Belstrøm, D., 2019. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J. Dent.* 80, S3–S12. doi:10.1016/j.jdent.2018.08.010

- Marshall, T., Williams, K.M., 1986. Phenol addition to the Bradford dye binding assay improves sensitivity and gives a characteristic response with different proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* 13, 145–150. doi:[https://doi.org/10.1016/0165-022X\(86\)90087-4](https://doi.org/10.1016/0165-022X(86)90087-4).
- McLeod, S., 2013. Pavlov ' s Dogs 1–5.
- Morquecho-Campos, P., Bikker, F.J., Nazmi, K., de Graaf, K., Laine, M.L., Boesveldt, S., 2019. Impact of food odors signaling specific taste qualities and macronutrient content on saliva secretion and composition. *Appetite* 143, 104399. doi:[10.1016/j.appet.2019.104399](https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104399)
- Morquecho-campos, P., Bikker, F.J., Nazmi, K., Graaf, K. De, Laine, M.L., 2019. Impact of food odors signaling specific taste qualities and macronutrient content on saliva secretion and composition. *Appetite* 143, 104399. doi:[10.1016/j.appet.2019.104399](https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104399)
- Morzell, M., Truntzer, C., Neyraud, E., Brignot, H., Ducoroy, P., Lucchi, G., Canlet, C., Gaillard, S., Nicod, F., Nicklaus, S., Peretti, N., Feron, G., 2017. Associations between food consumption patterns and saliva composition: Specificities of eating difficulties children. *Physiol. Behav.* 173, 116–123. doi:[10.1016/j.physbeh.2017.02.005](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.005)
- Mosca, A.C., Chen, J., 2017a. Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends Food Sci. Technol.* 66, 125–134. doi:[10.1016/j.tifs.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.005)
- Mosca, A.C., Chen, J., 2017b. Trends in Food Science & Technology Food-saliva interactions : Mechanisms and implications. *Trends Food Sci. Technol.* 66, 125–134. doi:[10.1016/j.tifs.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.005)
- Mouta, R., 2011. Estudo de alterações na função salivar de um modelo de ratos pré-diabéticos.
- Muñoz-gonzález, C., Feron, G., Brulé, M., Canon, F., 2018. Understanding the release and metabolism of aroma compounds using micro-volume saliva samples by ex vivo approaches 240, 275–285. doi:[10.1016/j.foodchem.2017.07.060](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.060)
- Muñoz-González, C., Feron, G., Brulé, M., Canon, F., 2018. Understanding the release and metabolism of aroma compounds using micro-volume saliva samples by ex vivo approaches. *Food Chem.* 240, 275–285. doi:[10.1016/j.foodchem.2017.07.060](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.060)
- Nater, U.M., Rohleder, N., 2009. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker

- for the sympathetic nervous system : Current state of research 486–496.  
doi:10.1016/j.psyneuen.2009.01.014
- Neseliler, S., Tannenbaum, B., Zacchia, M., Larcher, K., Coulter, K., Lamarche, M., Marliss, E.B., Pruessner, J., Dagher, A., 2017. Academic stress and personality interact to increase the neural response to high-calorie food cues. *Appetite* 116, 306–314. doi:10.1016/j.appet.2017.05.016
- Neyraud, E., 2014. Role of Saliva in Oral Food Perception 24, 61–70.  
doi:10.1159/000358789
- Neyraud, E., Palicki, O., Schwartz, C., Nicklaus, S., Feron, G., 2011. Variability of human saliva composition : Possible relationships with fat perception and liking. *Arch. Oral Biol.* 57, 556–566. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.09.016
- Pagès-hélary, S., Andriot, I., Guichard, E., Canon, F., 2014a. Retention effect of human saliva on aroma release and respective contribution of salivary mucin and  $\alpha$  - amylase. *FRIN* 64, 424–431. doi:10.1016/j.foodres.2014.07.013
- Pagès-hélary, S., Andriot, I., Guichard, E., Canon, F., 2014b. Retention effect of human saliva on aroma release and respective contribution of salivary mucin and  $\alpha$  - amylase 64, 424–431.
- Patrikainen, M., Pan, P., Kuleskaya, N., Voikar, V., Parkkila, S., 2014. The role of carbonic anhydrase VI in bitter taste perception: evidence from the *Car6<sup>-/-</sup>* mouse model. *J. Biomed. Sci.* 21, 82. doi:10.1186/s12929-014-0082-2
- Pedersen, A.M.L., Sørensen, C.E., Proctor, G.B., Carpenter, G.H., 2018. Salivary functions in mastication , taste and textural perception , swallowing and initial digestion 1399–1416. doi:10.1111/odi.12867
- Perez-jiménez, M., Chaya, C., Pozo-bayón, M.Á., 2019. Individual differences and effect of phenolic compounds in the immediate and prolonged in-mouth aroma release and retronasal aroma intensity during wine tasting. *Food Chem.* 285, 147–155. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.152
- Petrakova, L., Doering, B.K., Vits, S., Engler, H., Rief, W., Schedlowski, M., Grigoleit, J.S., 2015. Psychosocial stress increases salivary alpha-Amylase activity independently from plasma noradrenaline levels. *PLoS One* 10, 1–9.  
doi:10.1371/journal.pone.0134561
- Pierce, 2017. *Protein Assay- Technical Handbook*.
- Piteira, C., 2019. Influência do consumo de nozes na composição proteica da saliva.

- Ployon, S., Morzel, M., Canon, F., 2017a. The role of saliva in aroma release and perception. *Food Chem.* 226, 212–220. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.055
- Ployon, S., Morzel, M., Canon, F., 2017b. The role of saliva in aroma release and perception. *Food Chem.* 226, 212–220. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.055
- Poinot, P., Arvisenet, G., Grua-priol, J., Fillonneau, C., Prost, C., 2009. Use of an artificial mouth to study bread aroma 42, 717–726.  
doi:10.1016/j.foodres.2009.02.020
- Proserpio, C., de Graaf, C., Laureati, M., Pagliarini, E., Boesveldt, S., 2017a. Impact of ambient odors on food intake, saliva production and appetite ratings. *Physiol. Behav.* 174, 35–41. doi:10.1016/j.physbeh.2017.02.042
- Proserpio, C., Graaf, C. De, Laureati, M., Pagliarini, E., Boesveldt, S., 2017b. *Physiology & Behavior* Impact of ambient odors on food intake , saliva production and appetite ratings. *Physiol. Behav.* 174, 35–41.  
doi:10.1016/j.physbeh.2017.02.042
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C., 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics : Past , present and future. *J. Proteomics* 73, 2064–2077. doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016
- Rabilloud, T., Lelong, C., 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics : A tutorial ☆. *J. Proteomics* 74, 1829–1841. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.040
- Roblegg, E., Coughran, A., Sirjani, D., 2019. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* Saliva : An all-rounder of our body 142, 133–141.  
doi:10.1016/j.ejpb.2019.06.016
- Rodrigues, L., 2017. O Envolvimento de Proteínas Salivares na Sensibilidade Gustativa.
- Rodrigues, L., Cordeiro, C., Pinheiro, C.C., Amado, F., Foundation, T., 2017a. Relationship between saliva protein composition and 6-n-Propylthiouracil bitter taste responsiveness in young adults 32.
- Rodrigues, L., Costa, G., Cordeiro, C., Pinheiro, C., Amado, F., Lamy, E., Costa, G., Cordeiro, C., Pinheiro, C., Amado, F., Lamy, E., 2017b. Salivary proteome and glucose levels are related with sweet taste sensitivity in young adults. *Food Nutr. Res.* 61. doi:10.1080/16546628.2017.1389208
- Rodrigues, L., Espanca, R., Costa, A.R., Antunes, C.M., Pomar, C., Capela-Silva, F., Pinheiro, C.C., Domingues, P., Amado, F., Lamy, E., 2019. Comparison of

salivary proteome of children with different sensitivities for bitter and sweet tastes: association with body mass index. *Int. J. Obes.* 43, 701–712. doi:10.1038/s41366-018-0289-5

- Rotilio, D., Corte, A. Della, Imperio, M.D., Coletta, W., Marcone, S., Silvestri, C., Giordano, L., Michele, M. Di, Donati, M.B., 2012. Proteomics : Bases for protein complexity understanding. *Thromb. Res.* 129, 257–262. doi:10.1016/j.thromres.2011.12.035
- Sarkar, A., Xu, F., Lee, S., 2019. Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases – similarities and differences. *Adv. Colloid Interface Sci.* 273, 102034. doi:10.1016/j.cis.2019.102034
- Scherp, P., Ku, G., Coleman, L., Kheterpal, I., 2011. Gel- based and gel- free proteomic technologies 702. doi:10.1007/978-1-61737-960-4
- Schipper, R.G., Silletti, E., Vingerhoeds, M.H., 2007. Saliva as research material : Biochemical , physicochemical and practical aspects 52, 1114–1135. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.06.009
- Scott, N.O., Burgess, B.&, 2019. Perception and liking of soups flavored with chipotle chili and ginger extracts: Effects of PROP taster status, personality traits and emotions. *Food Qual. Prefer.* 73, 192–201. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.11.009
- Sherovski, P., Stojkovi, G., Ristovska, N., 2018. Development , validation and application of first derivative spectroscopy ratio method for estimation of Bradford assay 558, 35–40. doi:10.1016/j.ab.2018.07.027
- Sienicka, P., Chojnowska, S., Baran, T., Wili, I., 2018. Advances in Medical Sciences Human saliva as a diagnostic material s 63, 185–191. doi:10.1016/j.advms.2017.11.002
- Spinelli, S., Jaeger, S.R., 2019. ScienceDirect What do we know about the sensory drivers of emotions in foods and beverages ? *Curr. Opin. Food Sci.* 27, 82–89. doi:10.1016/j.cofs.2019.06.007
- Spinelli, S., Monteleone, E., Ares, G., Jaeger, S.R., 2019. Sensory drivers of product- elicited emotions are moderated by liking : Insights from consumer segmentation. *Food Qual. Prefer.* 78, 103725. doi:10.1016/j.foodqual.2019.103725
- Stolle, T., Grondinger, F., Dunkel, A., Meng, C., Me, G., Kuster, B., Hofmann, T., 2017. Salivary Proteome Patterns Affecting Human Salt Taste Sensitivity 9275–9286.

doi:10.1021/acs.jafc.7b03862

- Sturque, J., Berquet, A., Loison-robert, L.S., Ahossi, V., Zwetyenga, N., 2019. ScienceDirect Interest of studying the saliva metabolome , transcriptome and microbiome in screening for pancreatic cancer. *J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.* 3–7. doi:10.1016/j.jormas.2019.04.013
- Vacca Smith, A.M., Bowen, W.H., 2000. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch. Oral Biol.* 45, 277–291. doi:10.1016/S0003-9969(99)00141-7
- Wang, P. li, Purushotham, K.R., Humphreys-Beher, M.G., 1994. Effect of Chronic Insulin Administration on Mouse Parotid and Submandibular Gland Function. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205, 353–361. doi:10.3181/00379727-205-43718
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Wang, X., 2013. Clinica Chimica Acta Salivary proteomics in biomedical research. *Clin. Chim. Acta* 415, 261–265. doi:10.1016/j.cca.2012.11.001
- Zor, T., Selinger, Z., 1996. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity : Theoretical and Experimental Studies 308, 302–308.





---

## Capítulo VIII - Anexos

---





## **Anexo I- Lista de reagentes**

- 2-cloro-*p*-nitrofenol ligado à maltotriose (Salimetrics);
- Ácido acético (Fluka);
- Ácido clorídrico (Merck);
- Ácido fosfórico 85% ( VWR);
- Acrilamida ( VWR);
- Agarose (Lonza);
- Albumina de soro de bovino (VWR);
- Anticorpos monoclonais anti-cortisol (Salimetrics);
- Azul de bromofenol (Sigma-aldrich)
- Azul de coomassie G-250 (VWR);
- Bisacrilamida (VWR);
- Chaps ( Ge Healthcare);
- Cortisol conjugado com peroxidase de rábano (Salimetrics);
- Ditiotretitol ( VWR);
- Dodecil sulfato de sódio (VWR);
- Etanol absoluto ( Merck)
- Glicerol a 99.5 % (VWR)
- Glicina (VWR);
- Iodoacetamida (Ge Healthcare)
- IPG buffer ( Ge Healthcare);
- Marcador de massas moleculares (BIORAD);
- Metanol (VWR);
- Óleo mineral (Ge Healthcare);
- Persulfato de amónio (VWR);
- Tampão fosfato (Salimetrics);
- Tetrametilbenzidina (Salimetrics);
- Tetrametiletlenodiamina (Merck);
- Tioureia (Acros organic);
- Tris -hidroximetilaminometano ( VWR);
- Ureia (VWR).

## **Anexo II-** Lista de material

- Luvas;
- Material corrente de laboratório;
- Membranas com 3 kDa de *cut-off* ( PALL);
- Micropipetas P3, P10, P20, P100, P200, P1000, P5000 e respectivas pontas;
- Microplacas de 96 poços;
- Papel de filtro;
- Pipeta multicanal;
- Sistema para a eletroforese unidimensional (vidros, suportes e as tinas);
- Sistema de re-hidratação de amostras (Amersham Bioscience);
- Sistema de focagem de amostras Pharmacia Multiphor II;

### **Anexo III-** Lista de equipamentos

- Agitador magnético (Snijders);
- Agitador orbital (Grant-bio);
- Balança analítica (VWR);
- Banho refrigerado (Julabo);
- Banho termostatizado (Stuart Scientific);
- Centrifuga de eppendorfs (Eppendorf centrifuge 5424);
- Centrifuga refrigerada (Hermle Z323K);
- Espectrofotômetro ( Glomax da Promega);
- Espectrofotômetro (BIORAD modelo 680);
- Fonte de alimentação ( Pharmacia Multiphor II);
- Fonte de alimentação ( powerpac basic BIORAD);
- Scanner ( Image scanner III).

## Anexo IV- Consentimento informado para participação em estudo de investigação



### CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO

#### Influência do Aroma dos Alimentos na Composição da Saliva de Adultos

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 “Influência do Odor dos Alimentos na Composição da Saliva de Adultos”. A sua participação consiste na resposta a um questionário sobre estado geral de saúde, as emoções desencadeadas após o contacto com o estímulo e se este contacto com o estímulo desencadeia vontade de ingerir o alimento, tal como na recolha de saliva para posterior avaliação 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.

A responsável do projeto

Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

✂ \_\_\_\_\_

#### 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 V- Questionário fornecido aos voluntários



### Questionário para participação no estudo “Influência do Aroma dos Alimentos na Composição da Saliva de Adultos”

#### Parte I

Idade:\_\_\_\_ Sexo:\_\_\_\_ Data de nascimento:\_\_\_\_\_ Fumador?\_\_\_\_\_

Apresenta alguma doença crónica? Em caso afirmativo, por favor, refira qual.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Apresenta Alergias/intolerâncias alimentares? Em caso afirmativo, por favor, refira a que compostos/alimentos.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### Parte II

Responda às perguntas da parte II com uma das opções disponíveis.

##### Indique há quanto tempo fez a sua última refeição

<30 minutos [30m-1 h] [1h-2h] [2h-3h] >3h

##### Indique em que medida se sente saciado

Nada saciado Pouco saciado Moderadamente saciado Bastante Extremamente

##### Após o contacto olfativo com o aroma do pão qual é a sua vontade de ingerir este alimento?

Nenhuma vontade Pouca vontade Vontade moderada Bastante vontade Vontade extrema

**Após mastigar o pão qual é a sua vontade de ingerir este alimento?**

<input type="radio"/>				
Nenhuma vontade	Pouca vontade	Vontade moderada	Bastante vontade	Vontade extrema

**Parte III**

Após o contacto com o aroma do pão quais foram as emoções despoletadas (assinale na seguinte lista a intensidade com que percebe cada uma delas):

DESCRITORES EMOCIONAIS							
	0 Sem intensidade	1	2	3	4	5	6 Com muita intensidade
Irritado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Enjoado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Desagradavelmente surpreso	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Feliz	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Agradavelmente surpreso	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bem-estar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Desejo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Refrescante/ revitalizante	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Energético	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Relaxante	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Conforto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Com água na boca	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Divertido	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Laura Regula Eustáquio Carreira  
Influência do odor de alimentos no proteoma salivar: o caso particular do odor do pão

---

Conforto	<input type="radio"/>						
Interesse	<input type="radio"/>						
Impressionado	<input type="radio"/>						
Triste	<input type="radio"/>						
Melancólico/ nostálgico	<input type="radio"/>						

**Anexo VI-** Níveis de saciedade percebida e tempo decorrido após a última refeição dos indivíduos do estudo.

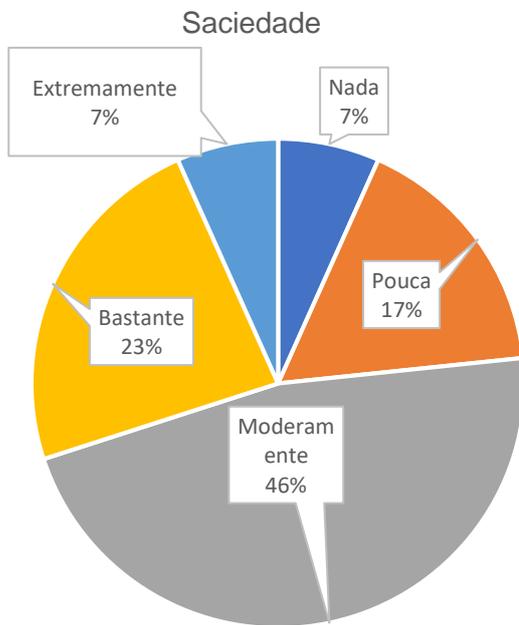


Figura 14: Níveis de saciedade percebida pelos indivíduos no momento de recolha de saliva.

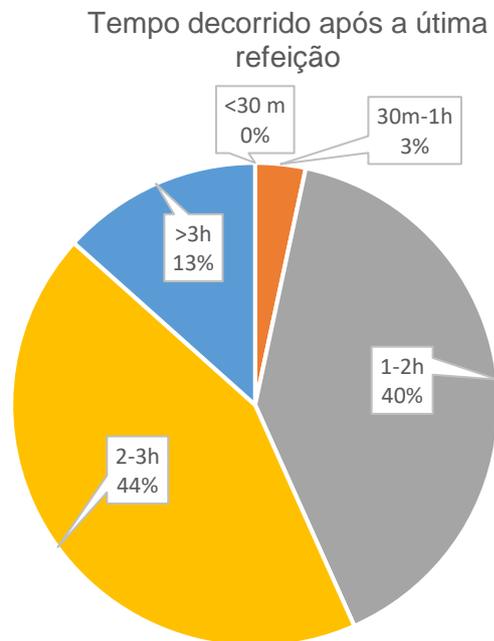


Figura 15: Tempo decorrido após a refeição que antecedeu as recolhas de saliva aos indivíduos.