



Modulação do sabor de produtos de origem vegetal: estudo de compostos com capacidade para diminuir a adstringência

Joana Paz Vieira

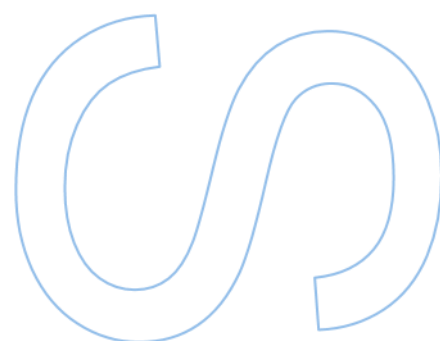
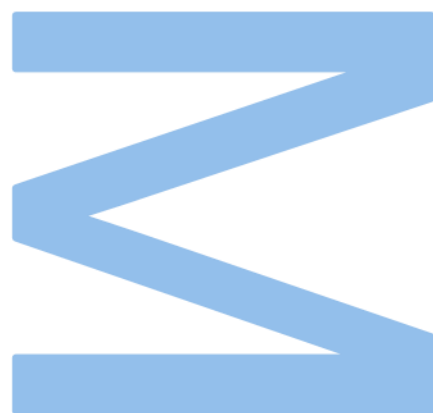
Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento de Química e Bioquímica
2022-2023

Orientador

Elsa Judite Ferreira de Azevedo Brandão, Investigadora, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

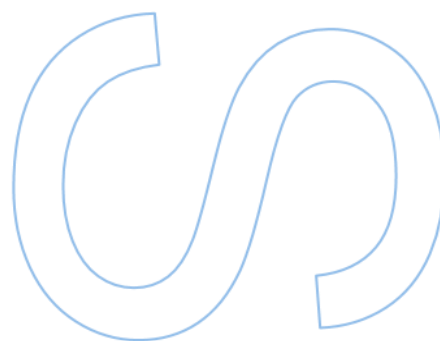
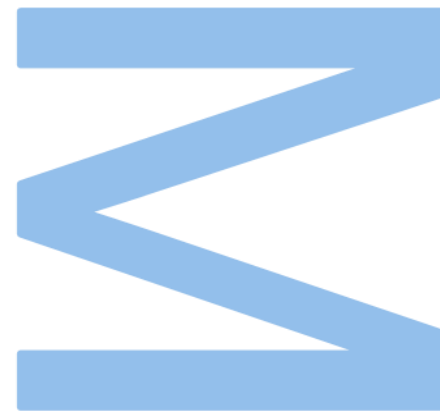
Coorientador

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





Universidade do Minho
Escola de Engenharia



Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições, que contribuíram de uma forma direta ou indireta, no desenvolvimento deste trabalho, proporcionando igualmente uma excelente formação em contexto laboratorial.

Um agradecimento à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, em especial ao Departamento de Química e Bioquímica pela agradável receção e apoio logístico ao longo deste trabalho.

Um especial agradecimento à minha orientadora, Elsa Brandão, por todo o acompanhamento, disponibilidade e simpatia que sempre teve comigo. Nos momentos mais difíceis e imprevisíveis que foram acontecendo ao longo do tempo, estive sempre presente, tranquilizando-me e solucionando todos os problemas. A sua capacidade de integração, motivação e orientação científica foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço imenso por ter sido sempre compreensiva, uma excelente conselheira e amiga. Um obrigado por todo o conhecimento transmitido e por me ter proporcionado sempre excelentes condições de trabalho.

À Susana Soares, obrigada pela simpatia, disponibilidade e partilha da sua experiência profissional, que de certo modo me inspirou e me envolveu no projeto. A sua capacidade de motivação, coordenação e integração foi fundamental para o sucesso do trabalho desenvolvido.

Ao Professor Doutor Victor de Freitas, obrigada por todo o conhecimento transmitido, pela sua simpatia, capacidade inspiradora e motivacional.

Ao Professor Doutor Nuno Mateus, obrigada pela simpatia e apoio que sempre demonstrou.

Agradeço à Dra. Zélia pela ajuda técnica nas análises das amostras e ao Doutor Pedro Fernandes pela ajuda nas análises dos polissacáridos.

Queria agradecer à Mónica Jesus, Leonor Gonçalves e Carlos Guerreiro por toda a ajuda, disponibilidade e conhecimento na realização deste trabalho.

Obrigada a todos que conviveram comigo diariamente em laboratório, por me acolherem da melhor forma, integrarem e ajudarem em todas as tarefas, de forma a concretizar os meus objetivos. Obrigada Rita, Sofia, Catarina, Bernardo, Patrícia, Alexandra, Ana Luísa, Natércia, Ricardo, Hélder, Luís, Paulinha, Joana Azevedo e Joana Oliveira.

A todos os voluntários/dadores de saliva, muito obrigada por todo o “sacrifício” que fizeram de não poder tomar café a seguir ao almoço.

Às minhas amigas, Inês Emanuel, Inês Fernandes e Margarida Teixeira, por estarem sempre presentes diariamente, pela motivação e pelos bons momentos que passamos durante este ano.

À minha família e amigos por toda a paciência, disponibilidade, ajuda e motivação.

A todos que me apoiaram, que não estando aqui mencionados, não são esquecidos e sem eles nada disto seria possível, obrigada.

Resumo

Os polifenóis são compostos bioativos que se encontram essencialmente em produtos de origem vegetal, como em legumes e frutos e, em bebidas, como o chá, café, cerveja e vinho tinto. Nestes produtos, os polifenóis são responsáveis por importantes propriedades organoléticas, como a cor e o sabor. Neste caso, o sabor acaba por ser uma das principais barreiras para a aceitação de um produto por parte do consumidor, pois os polifenóis são responsáveis pela sensação de adstringência, que muitas vezes se pode tornar desagradável levando à rejeição dos produtos.

A adstringência é descrita como uma sensação tátil percecionada na cavidade oral, sendo definida como um conjunto de sensações envolvendo secura, rugosidade, aperto e enrugamento, tipicamente sentidas durante a ingestão de alimentos e bebidas ricas em polifenóis.

Nos últimos anos, vários estudos fundamentaram que a adstringência pode ser explicada através de três mecanismos: interação dos polifenóis com proteínas salivares, interação dos polifenóis com constituintes orais (células do epitélio oral e película da mucosa) e ativação de mecanorreceptores.

A adstringência é uma das propriedades sensoriais mais importantes para a aceitação dos consumidores. Quando os seus níveis se encontram elevados podem ser considerados indesejáveis para o consumidor, sendo que para alguns produtos ricos em polifenóis, como o vinho tinto ou a cerveja, é desejável um nível equilibrado de adstringência para a sua qualidade final. Desta forma, para equilibrar os níveis de adstringência, estes produtos podem ser manipulados industrialmente. Contudo, a indústria utiliza métodos que acarretam a perda de polifenóis e dos seus potenciais benefícios associados.

Atualmente, os polissacáridos têm sido descritos como uma alternativa útil e viável para ser usada na indústria para modular a adstringência, uma vez que podem inibir as interações entre polifenóis e proteínas salivares através de dois mecanismos: mecanismo ternário e mecanismo de competição. Através do uso destes compostos para modular a adstringência pretende-se evitar a perda dos compostos bioativos como os polifenóis e até acrescentar outros benefícios ao produto final (e.g. atividade prebiótica). A indústria de processamento de vegetais e frutos tem vindo a gerar uma grande quantidade de resíduos alimentares (e.g cascas e sementes), que são uma fonte valiosa de compostos bioativos, entre os quais os polissacáridos. Por este motivo, as

cascas de laranja foram utilizadas como fonte polissacáridos para estudar o seu efeito inibitório nas interações entre polifenóis, proteínas salivares e constituintes orais. Além disso, usando subprodutos para extrair compostos de interesse, é também uma forma de tornar este subproduto num produto final com valor económico.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de polissacáridos pécticos, extraídos da casca de laranja em inibir as interações entre diferentes extratos de polifenóis (extrato de grainha de uva comercial, GSE; extrato de chá preto, BTE e extrato de vinho tinto, RWE) e proteínas salivares (proteínas ricas em prolina básicas, bPRPs; proteínas ricas em prolina glicosiladas, gPRPs; proteínas ricas em prolina acídicas, aPRPs; estaterina; péptido P-B e cistatinas) através de um modelo celular quaternário. Este modelo *in vitro* pretende simular a cavidade oral, composto por diferentes constituintes orais (células do epitélio oral e película da mucosa), proteínas salivares, polifenóis e polissacáridos, utilizando assim dois dos três mecanismos moleculares sugeridos para a sensação de adstringência.

Este trabalho foi dividido em cinco etapas: 1) extração e caracterização de diferentes extratos ricos em polifenóis que correspondem a bebidas consumidas e conhecidas mundialmente, como o chá preto e vinho tinto; 2) extração e caracterização de diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja por extração sequencial com diferentes solventes (água, solução de imidazole e carbonato de sódio); 3) desenvolvimento de um modelo celular quaternário para avaliar o efeito dos polissacáridos nas interações entre os diferentes polifenóis, proteínas salivares e constituintes orais; 4) estudo do efeito dos polissacáridos na interação entre os componentes presentes no modelo anterior por deteção colorimétrica UV-Vis - quantificação do polifenol adsorvido por DMACA e por HPLC - análise e quantificação das proteínas salivares após interações.

Os resultados obtidos mostraram que as diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja (pectinas altamente metil-esterificadas, HMEP; pectinas médio metil-esterificadas, MMEP; pectatos de baixo peso molecular, LMWP; pectatos de elevado peso molecular, HMWP) apresentaram um maior efeito em reduzir as interações entre os diferentes polifenóis e constituintes orais no modelo oral completo, composto por células, mucina e proteínas salivares, especialmente nas concentrações mais elevadas de polifenol. A sinergia de todos os constituintes orais pode ser um aspeto relevante, uma vez que pode favorecer o efeito redutor dos polissacáridos no modelo oral completo.

Através da quantificação do polifenol adsorvido por DMACA, foi possível observar que os LMWP foram dos polissacáridos pécticos mais eficientes, reduzindo a quantidade de polifenol adsorvido após interações entre os diferentes extratos de polifenóis e os constituintes orais, principalmente no modelo oral completo. O peso molecular, o grau de metil-esterificação e o teor de ácidos urónicos são fatores que influenciam o efeito dos polissacáridos nas interações.

Através da análise do perfil salivar por HPLC, foi possível observar que as gPRPs, aPRPs, estaterina/péptido P-B e cistatinas foram as famílias de proteínas salivares que menos interagiram com os diferentes extratos de polifenóis na presença das HMEP. A estaterina, o péptido P-B e as cistatinas foram as proteínas salivares sobre as quais os diferentes polissacáridos pécticos apresentaram um maior efeito em reduzir as interações.

Assim, é possível verificar que o efeito dos polissacáridos pécticos é dependente das características estruturais das moléculas envolvidas.

No geral, os resultados mostraram que, a nível molecular, as diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja mostraram ser promissoras no que respeita à modulação da adstringência dos produtos através de um modelo celular quaternário.

Palavras-Chave: Adstringência, Polifenóis, Proteínas Salivares, Polissacáridos pécticos, Células orais, Mucina, Interação polifenol-proteína, Modulação do sabor

Abstract

Polyphenols are bioactive compounds essentially found in plant-based products, such as vegetables and fruits and in beverages such as tea, coffee, beer and red wine. In these products, polyphenols are responsible for important organoleptic properties, such as color and taste. In this case, taste can be one of the main barriers to consumers acceptance of a product because polyphenols are responsible for the sensation of astringency, which can often become unpleasant, leading to product rejection.

Astringency is a tactile sensation is defined as dryness, roughness, tightening and puckering sensations perceived in the oral cavity during the intake polyphenol-rich products.

In recent years, several studies have shown that astringency can be explained by three mechanisms: the interaction of polyphenols with salivary proteins, the interaction of polyphenols with oral constituents (oral epithelium cells and salivary mucosal pellicle) and the activation of mechanoreceptors.

Astringency is one of the most important sensory properties for consumers acceptance. High levels of astringency can be considered undesirable to the consumer while for some polyphenol-rich products, such as red wine or beer, a balanced level of astringency is desirable for their quality. Therefore, in order to balance levels of astringency in products, they can be industrially manipulated. However, the industry uses methods that result in the loss of polyphenols and their associated potential benefits.

Currently, polysaccharides have been described as a useful and viable alternative to be used in the industry to modulate astringency, as they can inhibit polyphenol-salivary protein interactions by two mechanisms: ternary or competition mechanism. By using polysaccharides to modulate astringency can also prevent the loss of bioactive compounds, such as polyphenols and add other benefits to the final product (e.g. prebiotic activity). The processing of vegetables and fruits generates a large amount of wastes (e.g. peels and seeds), which are rich in bioactive compounds such as polysaccharides. For this reason, orange peels were used in this work as a source of polysaccharides to study their inhibitory effect on the interactions between polyphenols, salivary proteins and oral constituents. Furthermore, using by-products to extract compounds of interest is also a way of turning this by-product into a final product with an added-value.

The main aim of this work was to evaluate the ability of pectic polysaccharides extracted from orange peels to inhibit the interactions between different polyphenol extracts (commercial grape seed extract, GSE; black tea extract, BTE and red wine extract, RWE), salivary proteins (basic proline-rich proteins, bPRPs; glycosylated proline-rich proteins, gPRPs; acidic proline-rich proteins, aPRPs; statherin; P-B peptide and cystatins) using an oral cell-based quaternary model. This model simulates the oral cavity composed of oral constituents (oral epithelial cells and salivary mucosal pellicle), salivary proteins, polyphenols and polysaccharides, using two of the three suggested molecular mechanisms for astringency sensation.

So, the work was divided into five steps: 1) extraction and characterization different extracts rich in polyphenols that correspond to beverages consumed and known worldwide, such as black tea and red wine; 2) extraction and characterization different fractions of pectic polysaccharides from orange peels by sequential extraction with different solvents (water, imidazole and sodium carbonate solutions); 3) development of a quaternary cell model to evaluate the effect of polysaccharides on the interactions between the different polyphenols, salivary proteins and oral constituents; 4) study of the effect of polysaccharides on the interaction between the components present in the previous model by UV-Vis colorimetric detection – quantification of polyphenol adsorbed by DMACA and by HPLC – analysis and quantification of salivary proteins after interactions.

The results obtained showed that the different fractions of pectic polysaccharides from orange peels (highly methyl esterified pectins, HMEP; medium methyl esterified pectins, MMEP; low molecular weight pectates, LMWP; high molecular weight pectates, HMWP) had a greater effect in reducing the interactions between the different polyphenols and oral constituents in the complete oral model, composed of cells, mucin and salivary proteins, especially at the higher polyphenol concentrations. The synergy of all the oral constituents may be a relevant aspect, as it may favor the reducing effect of polysaccharides in the complete oral model.

By quantifying the polyphenol adsorbed by DMACA, it was possible to observe that LMWP was the most efficient pectic polysaccharides, reducing the amount of polyphenol adsorbed after interactions between the different polyphenol extracts and the oral constituents, especially in the complete oral model. Molecular weight, degree of methyl esterification and uronic acids content are key aspects to explain the observed results.

Analyzing the salivary profile by HPLC, it was possible to observe that the gPRPs, aPRPs, statherin/P-B peptide and cystatins were the families of salivary proteins that interacted least with the different polyphenol extracts in the presence of HMEP. Statherin, P-B peptide and cystatins were the salivary proteins on which the different pectic polysaccharides had the greatest effect in reducing interactions.

Therefore, it was possible to observe that the effect of pectic polysaccharides depends on the structural characteristics of the molecules involved.

In general, the results showed that, at a molecular level, the different fractions of pectic polysaccharides from orange peels were able to modulate the astringency of products through an oral cell-based quaternary model.

Keywords: Astringency, Polyphenols, Salivary proteins, Pectic polysaccharides, Oral cells, Mucin, Polyphenol-protein interaction, Taste modulation

Índice

Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Abreviaturas	xx
I. Introdução.....	1
1. Polifenóis	2
1.1 Compostos não flavonóides.....	5
1.2 Compostos flavonóides	6
1.2.1 Antocianinas e Antocianidinas	6
1.2.2 Flavonóis	8
1.2.3 Flavan-3-óis.....	9
1.3 Taninos.....	10
1.3.1 Taninos hidrolisáveis	11
1.3.2 Taninos condensados.....	12
1.4 Produtos ricos em polifenóis – chá e vinho tinto	13
2. Saliva Humana	16
2.1 Proteínas Salivares (PS).....	17
2.1.1 Proteínas ricas em prolina (PRPs).....	18
2.1.2 Estaterina	19
2.1.3 Péptido P-B	19
2.1.4 Cistatinas.....	20
3. Adstringência.....	21
3.1 Mecanismo de adstringência: Interação entre polifenóis e proteínas salivares.....	22
3.1.1 Tipos de ligação envolvidos na interação tanino-proteína.....	23
3.1.2 Modelos de interação tanino-proteína.....	24
3.1.3 Fatores que influenciam a interação tanino-proteína	26

3.2	Mecanismo de adstringência: Interação de polifenóis com constituintes orais.....	29
4.	Modulação das propriedades do sabor	31
4.1	Polissacáridos	32
4.2	Efeito dos polissacáridos na adstringência	35
4.2.1	Mecanismos de inibição/redução dos polissacáridos na interação entre polifenóis e proteínas salivares.....	36
4.2.2	Fontes de polissacáridos: o exemplo das cascas de frutos.....	38
II.	Material e Métodos	39
1.	Reagentes	40
2.	Recolha, tratamento e análise da saliva	40
2.1	Recolha e tratamento de saliva.....	40
2.2	Caracterização e análise da saliva	41
3.	Extração, purificação e caracterização de polifenóis.....	42
3.1	Obtenção de extratos ricos em polifenóis	42
3.1.1	Chá preto.....	42
3.1.2	Vinho tinto	44
3.2	Caracterização dos extratos de polifenóis	46
3.2.1	Análise por espectrometria de massa.....	46
3.2.2	Doseamento de polifenóis totais.....	47
3.2.3	Doseamento de açúcares.....	47
4.	Extração, purificação e caracterização dos polissacáridos	48
4.1	Extração e purificação dos polissacáridos pécnicos da casca de laranja.....	48
4.2	Caracterização dos polissacáridos pécnicos da casca de laranja	50
5.	Condições de cultura celular.....	52
5.1	Tripsinização	52
6.	Desenvolvimento do modelo celular para estudar o efeito dos polissacáridos	53
6.1	Formação da película da mucosa: adesão da mucina às células e ligação de proteínas salivares	53

6.2	Desenvolvimento do modelo celular quaternário: Efeito dos polissacáridos na interação entre extratos de polifenóis e constituintes orais.....	55
6.2.1	Quantificação dos polifenóis adsorvidos à microplaca após interação – Ensaio de DMACA.....	56
6.2.2	Análise das proteínas salivares por HPLC.....	57
7.	Ensaio de Viabilidade Celular	58
8.	Análise Estatística	59
	III. Resultados e Discussão.....	60
1.	Caracterização proteica da saliva	62
2.	Caracterização dos polifenóis	63
2.1	Análise por espectrometria de massa.....	63
2.2	Doseamento de polifenóis e açúcares	66
3.	Caracterização dos polissacáridos.....	68
4.	Interação dos polifenóis com os constituintes orais	71
4.1	Interação do extrato de grainha de uva com os constituintes orais	71
4.2	Interação do extrato de chá preto com os constituintes orais.....	72
4.3	Interação do extrato de vinho tinto com os constituintes orais	74
5.	Influência dos polissacáridos nas interações entre polifenóis e constituintes orais.....	75
5.1	Influência dos polissacáridos na interação entre o extrato de grainha de uva e constituintes orais	75
5.1.1	Modelo Oral.....	75
5.1.2	Efeito da estrutura e da concentração de polifenol e polissacárido.....	79
5.1.3	Efeito das proteínas salivares nas interações	80
5.2	Influência dos polissacáridos na interação entre o extrato de chá preto e constituintes orais	82
5.2.1	Modelo oral.....	82
5.2.2	Efeito da estrutura e da concentração de polifenol e polissacárido.....	86
5.2.3	Efeito das proteínas salivares nas interações	87

5.3	Influência dos polissacáridos na interação entre o extrato de vinho tinto e constituintes orais	89
5.3.1	Modelo Oral.....	89
5.3.2	Efeito da estrutura e da concentração de polifenol e polissacárido.....	93
5.3.3	Efeito das proteínas salivares nas interações	94
5.4	Ensaio de viabilidade celular	96
IV.	Conclusão e Perspetivas Futuras	98
V.	Referências Bibliográficas	101
VI.	Anexos	115

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos da saliva recolhida.....	63
Tabela 2 - Composição dos diferentes extratos de polifenóis. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três repetições.	67
Tabela 3 - Caracterização das diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três repetições.	69
Tabela 4 - Composição em açúcares neutros e ácidos urónicos (mol %), grau de metil-esterificação (DME, %) e grau de acetilação (DA, %) das diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.	70

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química dos maiores grupos de polifenóis e alguns exemplos de alimentos ricos de cada classe.	4
Figura 2 - Exemplos das estruturas químicas das principais classes de compostos não flavonóides: estilbenos, ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos.	5
Figura 3 - Estrutura química do núcleo flavânico: A e B anéis fenólicos e C anel heterociclo oxigenado.	6
Figura 4 - Estrutura química geral de algumas antocianidinas e respetivos substituintes e cores.	8
Figura 5 - Estrutura química dos principais flavonóis.	9
Figura 6 - Estrutura química de alguns flavan-3-óis presentes em alimentos e respetivos substituintes.	10
Figura 7 - Estrutura das moléculas base dos taninos hidrolisáveis e respetivos taninos.	12
Figura 8 - Reação de decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido – Reação de Bate-Smith (Bate-Smith, 1954).	13
Figura 9 - Representação da localização das glândulas salivares na cavidade oral. ..	17
Figura 10 - Mecanismos propostos para o início da adstringência: (a) interação e precipitação de proteínas salivares por polifenóis; (b) interação dos polifenóis com as células orais e/ou película da mucosa; (c) ativação de mecanorreceptores orais. Adaptado de Susana Soares, Brandão, et al., (2020).	22
Figura 11 - Mecanismo molecular de interação/precipitação de proteínas salivares por polifenóis.	23
Figura 12 - Representação esquemática de (A) titulação de extrato vegetal contendo uma concentração fixa de tanino e concentrações crescentes de proteína (BSA): região A, excesso de tanino; região B, ponto de equivalência; região C, excesso de proteína (Adaptado de Hagerman e Robbins (1987)) e de (B) modelo de interação tanino-proteína: os taninos são descritos como tendo duas extremidades que se podem ligar às proteínas; as proteínas são representadas como tendo um número fixo (três) de locais de ligação ao tanino.	25
Figura 13 - Mecanismo molecular proposto para a interação das PRPs com os taninos. Adaptado de Jöbstl et al. (2004).	26
Figura 14 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos de adstringência envolvendo células orais, película da mucosa, proteínas salivares, polifenóis e	

mecanorreceptores. As proteínas salivares entram em contacto com os polifenóis na cavidade oral e formam complexos. Estes complexos 1) interagem com o filme salivar produzindo alterações na lubrificação salivar através da formação de precipitados que reduzem a viscosidade ou aumentam o atrito no tecido oral; 2) interagem com células epiteliais orais e película da mucosa; 3) polifenóis interagem com as mucinas salivares; 4) polifenóis interagem diretamente com as células do epitélio oral ou mecanorreceptores. Adaptado de González-Muñoz et al., (2021).	30
Figura 15 - Esquema simplificado da estrutura primária das pectinas. Adaptado de Minzanova et al., 2018.	34
Figura 16 - Representação esquemática da (A) estrutura da parede celular primária evidenciando os polissacáridos mais importantes e a lamela média, e da (B) degradação da pectina e da hemicelulose durante o amadurecimento dos frutos. Adaptado de Wakabayashi et al., (2000).	36
Figura 17 - Possíveis mecanismos (A): mecanismo ternário e (B): mecanismo de competição envolvidos PS: proteínas salivares, T: taninos, P: polissacáridos. Adaptado de Mateus et al., (2004).	37
Figura 18 - Extração hidroalcoólica do chá preto.	43
Figura 19 - Extrações líquido-líquido: A) para remover metilxantinas e clorofilas, B) para extrair flavonóides.	43
Figura 20 - Purificação por gel C18 do extrato obtido.	44
Figura 21 – Purificação por gel C18 para remover açúcares do vinho tinto.	45
Figura 22 - Extração líquido-líquido com clorofórmio para remover os lípidos do vinho tinto.	45
Figura 23 - Resíduo insolúvel em álcool (AIR).	49
Figura 24 - Desenho de uma microplaca de 96 poços com distribuição dos poços em monocamada de células HSC-3, com pré-incubação de mucina 1 mg/mL, pH 7.	54
Figura 25 - Desenho de uma microplaca de 96 poços com distribuição dos poços em monocamada de células HSC-3, com pré-incubação de saliva tratada com TFA diluída em Hanks' de 800 µg/mL a pH 7 e solução tampão Hanks'.	54
Figura 26 - Desenho de uma microplaca de 96 poços com as diferentes amostras distribuídas por poço.	56
Figura 27 - Cromatograma típico da análise de saliva acídica, obtido por HPLC a 214 nm. As diferentes zonas correspondem a diferentes famílias de proteínas salivares.	62
Figura 28 - Cromatograma do extrato de grainha de uva obtido por espectrometria de massa, no modo de ião negativo, a um comprimento de onda de 280 nm e identificação	

dos compostos assim como, tempo de retenção, massa do ião molecular principal desprotonado e padrões de fragmentação.....	64
Figura 29 - Cromatograma do extrato de chá preto obtido por espectrometria de massa, no modo de ião negativo, a um comprimento de onda de 280 nm e identificação dos compostos assim como, tempo de retenção, massa do ião molecular principal desprotonado e padrões de fragmentação.....	65
Figura 30 - Cromatograma do extrato de vinho tinto obtido por espectrometria de massa, no modo de ião negativo, a um comprimento de onda de 280 nm e identificação dos compostos assim como, tempo de retenção, massa do ião molecular principal desprotonado e padrões de fragmentação.....	66
Figura 31 – Concentração de polifenol adsorvido em cada modelo oral estudado. As concentrações são expressas em equivalentes de catequina para o extrato de grainha de uva. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).....	72
Figura 32 - Concentração de polifenol adsorvido em cada modelo oral estudado. As concentrações são expressas em equivalentes de EGCG para o extrato de chá preto. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).....	73
Figura 33 - Concentração de polifenol adsorvido em cada modelo oral estudado. As concentrações são expressas em equivalentes de epicatequina para o extrato de vinho tinto. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).....	74
Figura 34 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS): a) após interação com GSE (0.1 g/L) e b) após interação com GSE (0.3 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	76
Figura 35 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) apenas PS e b) HSC-3-PS, após interação com GSE (0.1 g/L e 0.3 g/L) com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras	

distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).

..... 77

Figura 36 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) HSC-3-Mu, b) HSC-3, após interação com GSE (0.1 g/L e 0.3 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05). 78

Figura 37 - Percentagem de interação para as diferentes famílias de PS, na presença das diferentes frações de polissacáridos (HMEP, MMEP e LMWP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05). 82

Figura 38 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS): a) após interação com BTE (0.2 g/L) e b) após interação com BTE (0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05). 83

Figura 39 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo HSC-3-PS: a) após interação com BTE (0.2 g/L) e b) após interação com BTE (0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05). 84

Figura 40 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo apenas PS: a) após interação com BTE (0.2 g/L) e b) após interação com BTE (0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05). 85

Figura 41 - Percentagem de interação para as diferentes famílias de PS, na presença das diferentes frações de polissacáridos (MMEP, LMWP e HMWP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS) e na presença da fração (HMEP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo contendo apenas saliva. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para

pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	89
Figura 42 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS): a) após interação com RWE (0.8 g/L) e b) após interação com RWE (1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios ± EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	90
Figura 43 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo apenas PS: a) após interação com RWE (0.8 g/L) e b) após interação com RWE (1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios ± EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	91
Figura 44 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo HSC-3-PS: a) após interação do RWE (0.8 g/L) e b) após interação do RWE (1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios ± EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	92
Figura 45 - Percentagem de interação para as diferentes famílias de PS, na presença das diferentes frações de polissacáridos (HMEP, MMEP, LMWP e HMWP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS). Os dados são expressos como valores médios ± EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	96
Figura 46 - Percentagem de viabilidade celular. Os dados são expressos como valores médios ± EPM para pelo menos 4 repetições independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	97
Figura 47 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo Mu-PS: a) após interação com GSE (0.1 g/L), b) após interação com GSE (0.3 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios ± EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p <0.05).	116

Figura 48 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) HSC-3-Mu, b) HSC-3, após interação com BTE (0.2 g/L e 0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p < 0.05). 117

Figura 49 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) HSC-3-Mu, b) HSC-3, após interação com RWE (0.8 g/L e 1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p < 0.05). 118

Lista de Abreviaturas

ACN - Acetonitrilo

AIR - *Alcohol insoluble residue* (Resíduo insolúvel em álcool)

aPRPs - *Acidic proline rich proteins* (Proteínas ricas em prolina acídicas)

bPRPs - *Basic proline rich proteins* (Proteínas ricas em prolina básicas)

BSA - *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

BTE - *Black tea extract* (Extrato de chá preto)

CSP - *Sodium carbonate-soluble pectic polysaccharides* (polissacáridos pécticos solúveis em carbonato de sódio)

DA - *Degree of acetylation* (Grau de acetilação)

DMACA - 4-Dimetilaminocinamaldeído

DME - *Degree methyl esterified* (Grau de metil-esterificação)

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio de Eagle modificado de Dulbecco)

DMSO - Dimetilsulfóxido

EGCG - Epigalocatequina-3-O-galhato

EPM - Erro padrão média

gPRPs - *Glycosylated proline rich proteins* (Proteínas ricas em prolina glicosiladas)

GSE - *Grape seed extract* (Extrato de grainha de uva)

HGs - Homogalacturonanas

HMEP - *High methyl esterified pectins* (Pectinas altamente metil-esterificadas)

HMWP - *High molecular weight pectates* (Pectatos de elevado peso molecular)

HPLC - *High-performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

HSC-3 - *Human tongue squamous carcinoma cell line 3* (Linha celular de carcinoma espinocelular da língua humana)

ISP - *Imidazole-soluble pectic polysaccharides* (Polissacáridos pécticos solúveis em imidazole)

LMWP - *Low molecular weight pectates* (Pectatos de baixo peso molecular)

MMEP - *Medium methyl esterified pectins* (Pectinas médio metil-esterificadas)

Mu - Mucina

PRPs - *Proline rich proteins* (Proteínas ricas em prolina)

PS - Proteínas salivares

RGs - Ramnogalacturonanas

RWE - *Red wine extract* (Extrato de vinho tinto)

TFA - Ácido trifluoroacético

WSP - *Water-soluble pectic polysaccharides* (Polissacáridos pécticos solúveis em água)

I. Introdução

I. Introdução

1. Polifenóis

Os polifenóis são um grande grupo de fitoquímicos que resultam do metabolismo secundário das plantas (Susana Soares et al., 2017). Estes compostos encontram-se essencialmente em alimentos de origem vegetal como frutas, vegetais e leguminosas, e em bebidas tais como sumos, chás (e.g. chá verde e chá preto), café e vinho tinto. Nestes produtos, são responsáveis por importantes propriedades organoléticas, tais como a cor, odor e principalmente, o sabor, nomeadamente a sensação de adstringência e o amargor, contribuindo também para a estabilidade oxidativa dos alimentos (Marian Naczki & Shahidi, 2006).

A composição de polifenóis presente nos alimentos varia muito, quer a nível qualitativo como quantitativo, alguns são omnipresentes enquanto outros são específicos de determinadas famílias de plantas (e.g. isoflavonas presentes em leguminosas). Estas variações podem ocorrer principalmente devido a condições climáticas, agrotécnicas de cultivo e colheita, fases de desenvolvimento ou maturação, fatores genéticos, condições de armazenamento, entre outros. Por exemplo, nas uvas, as antocianinas (classe de polifenóis) encontram-se apenas nas variedades vermelhas e acumulam-se na fase final do amadurecimento (Cheynier, 2005; Klepacka et al., 2011).

Nos últimos anos, os polifenóis têm sido muito estudados pelos seus potenciais benefícios para a saúde humana, devido às suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias associadas à prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, alguns tipos de cancro e doenças neurodegenerativas, como por exemplo, Parkinson e Alzheimer (Ramassamy, 2006; Ren et al., 2003; Yang et al., 2020).

Estes compostos apresentam uma enorme diversidade estrutural, desde moléculas simples (monómeros e oligómeros) a moléculas complexas (polímeros) e caracterizam-se por apresentarem pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilos, e, em geral, outros substituintes (e.g. grupos hidroxilo, metoxilo ou glicosilo), que podem ser substituídos (e.g. hidroxilados, metoxilados, glicosilados ou acilados), originando diversas estruturas químicas (Cheynier, 2005).

Estes podem ser divididos em duas grandes famílias, os flavonóides e os não flavonóides, que vão ser abordados na secção seguinte e que, por sua vez, se dividem em diferentes classes (Figura 1) (Tsao, 2010).

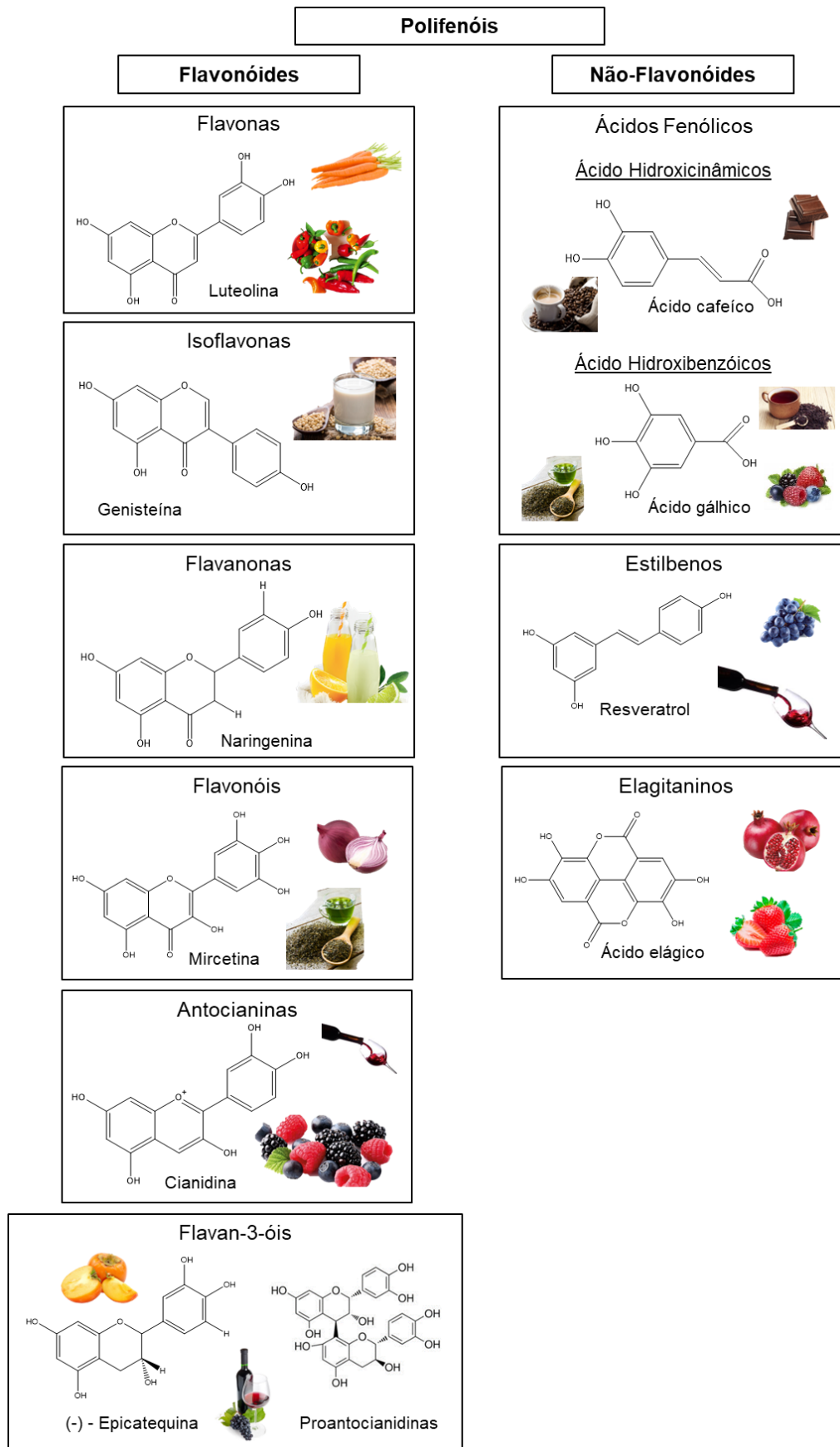


Figura 1 - Estrutura química dos maiores grupos de polifenóis e alguns exemplos de alimentos ricos de cada classe.

1.1 Compostos não flavonóides

Os compostos não flavonóides são essencialmente moléculas simples que se dividem em estilbenos, ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos (Figura 2). No entanto, estes compostos incluem também moléculas complexas derivadas de moléculas simples, como é o caso dos elagitaninos (Figura 1), galhotaninos e lenhinas.

Os ácidos benzóicos e cinâmicos são vulgarmente conhecidos como ácidos fenólicos, apresentam um anel fenólico e um grupo carboxilo e são encontrados em muitas espécies de plantas.

Os ácidos benzóicos são os ácidos mais simples encontrados na natureza, pois são carboxilatos aromáticos C6-C1 que se encontram maioritariamente em frutas (e.g. morangos, framboesas, groselha e amoras) e em algumas ervas e especiarias, no chá verde e no chá preto (Tomás-Barberán & Clifford, 2000). Estes ácidos, como é o caso do ácido gálico, ao ligar-se a núcleos de açúcar por ligações éster, dão origem a complexas estruturas denominadas por taninos hidrolisáveis (De Oliveira & Bastos, 2011).

Os ácidos cinâmicos são ácidos normalmente trans-fenil-3-propenóico diferindo apenas nas substituições do anel fenólico. Raramente são encontrados na sua forma livre, exceto em alimentos processados que passaram por congelamento, esterilização ou fermentação. Estes ácidos estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, sendo os mais comuns, o ácido cafeico, que se encontra no café, mirtilos e chocolate, o ácido sinápico, presente no brócolo e couve, o ácido p-cumárico, em ameixas e o ácido ferúlico, em cereais, que na sua maioria, se encontram esterificados ao ácido quínico, ácido tartárico ou polissacáridos e derivados (Clifford, 2000; Manach et al., 2004; De Oliveira & Bastos, 2011).

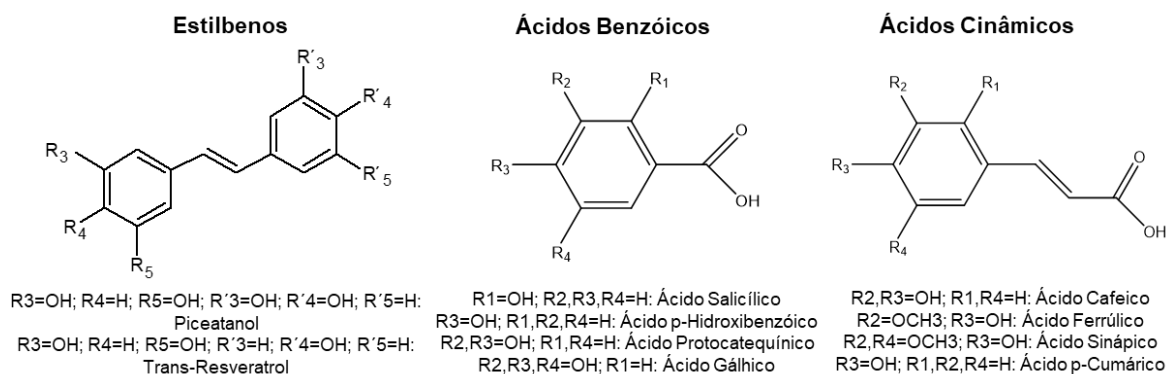


Figura 2 - Exemplos das estruturas químicas das principais classes de compostos não flavonóides: estilbenos, ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos.

1.2 Compostos flavonóides

Os compostos flavonóides são uma extensa família de polifenóis de baixo peso molecular que apresentam diversas estruturas químicas, sendo que todos possuem uma estrutura em comum: um núcleo flavânico composto por dois anéis fenólicos (anéis A e B) unidos por um heterociclo oxigenado (anel C) (Figura 3) (Cheynier, 2005; Tsao, 2010; S. Soares et al., 2017). No anel C podem ocorrer diferentes padrões de substituição, em que os substituintes primários (e.g. grupos hidroxilo, metoxilo ou glicosilo) podem ser substituídos (e.g. hidroxilados, metoxilados, glicosilados ou acilados), originando diversas estruturas químicas.

Hoje em dia, já foram identificados em plantas mais de 4000 flavonóides, devido à sua diversidade estrutural. Estes podem ser divididos em diferentes classes, tais como antocianinas, flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas e flavan-3-óis, sendo estes últimos os mais abundantes por possuírem a unidade estrutural, (+) - catequina e (-) - epicatequina, como base da formação das proantocianidinas ou taninos condensados (Bennick, 2002; Cheynier, 2005).

Nas secções seguintes serão abordados alguns dos grupos com maior relevância alimentar, tais como antocianinas e antocianidinas, flavonóis, flavan-3-óis, taninos condensados e hidrolisáveis.

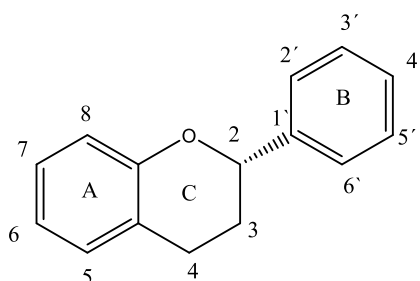


Figura 3 - Estrutura química do núcleo flavânico: A e B anéis fenólicos e C anel heterociclo oxigenado.

1.2.1 Antocianinas e Antocianidinas

A cor é um atributo sensorial muito importante nos alimentos, pois influencia a estética do produto e, consequentemente, a escolha do consumidor. Esta deve-se principalmente à presença de uma classe em particular de compostos flavonóides - as antocianinas - que são derivadas das antocianidinas (Março et al., 2008).

As antocianinas, são pigmentos importantes que se encontram nas plantas, frutas e vegetais, tais como frutas vermelhas e produtos derivados, como por exemplo, o vinho

tinto. São responsáveis pela cor inicial do vinho tinto, mas também pelas alterações que ocorrem durante o seu envelhecimento através da condensação com flavonóides e/ou com compostos mais pequenos, como ácido pirúvico, vinilfenol ou ácido glioilico. As antocianinas destacam-se por apresentarem ação antioxidante e em solução aquosa, apresentarem diferentes estruturas, em função do pH do meio envolvente (Susana Soares et al., 2017).

Na natureza, as antocianinas desempenham um papel importante na atração de insetos polinizadores, assim como também estão muito envolvidas na proteção das plantas contra fatores ambientais, como por exemplo a radiação excessiva (Dixon et al., 2013).

Estruturalmente, derivam de glicósidos do catião flavílio (2-fenilbenzopirilium), com diferentes graus de substituições (hidroxilados e/ou metoxilados) e devido à sua capacidade de absorver fortemente na região do visível, estas apresentam uma vasta gama de cores (Vermerris & Nicholson, 2006). Os açúcares ligam-se na posição O-3, mas também podem ligar-se nas posições O-5 e O-7, sendo os mais comuns, glucose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacáridos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos (Março et al., 2008; S. Soares et al., 2017).

As antocianinas também podem apresentar-se na forma não glicosilada, ou seja, na ausência de açúcares ligados à molécula, neste caso designam-se por antocianidinas (agliconas), sendo que a maioria possui grupos hidroxilo nas posições 3, 5 e 7.

As antocianidinas são os principais componentes dos pigmentos vermelho, azul e roxo da maioria das pétalas de flores, frutas e vegetais, sendo as mais comuns, seis: malvidina, cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina e petunidina. Dependendo da sua estrutura e do pH do meio envolvente, as antocianidinas apresentam cores desde vermelho a violeta, como representado na figura 4. A estrutura química vai determinar também a estabilidade e a atividade biológica de cada uma, sendo que a forma glicosilada confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas (Tsao, 2010; Khoo et al., 2017).

Existe um grande interesse no estudo das antocianinas, pois estas apresentam um grande potencial na indústria alimentar, devido à sua diversidade em aplicações tecnológicas, como por exemplo na produção de vinhos e corantes naturais. No entanto, existem algumas dificuldades e limitações na sua aplicação tais como, dificuldades nos processos de obtenção (extração, purificação e isolamento), disponibilidade de matéria-prima produtora de pigmentos na quantidade e qualidade requerida, poder corante reduzido quando comparado aos corantes sintéticos, e, principalmente, a baixa

estabilidade apresentada pelas antocianinas, a variações de temperatura e pH (Belwal et al., 2020).

Antocianidina	R1	R2	Cor
Pelargonidina	H	H	Laranja-avermelhado
Cianidina	OH	H	Vermelho
Delfinidina	OH	OH	Cor de rosa
Peonidina	OCH ₃	H	Violenta-azulado
Petunidina	OCH ₃	OH	Violenta
Malvinidina	OCH ₃	OCH ₃	Violenta-avermelhado

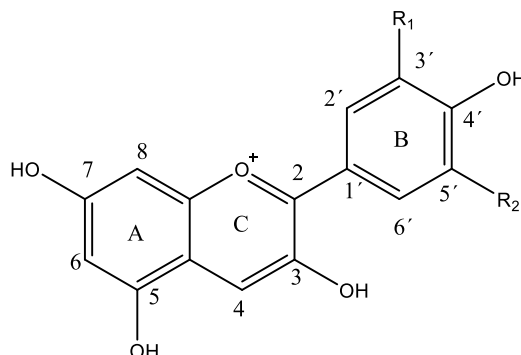


Figura 4 - Estrutura química geral de algumas antocianidinas e respetivos substituintes e cores.

1.2.2 Flavonóis

Os flavonóis encontram-se geralmente nas folhas e partes exteriores das plantas sob forma de O-glicósidos, sendo as porções de açúcares mais comuns, a glucose e a ramnose e, de ocorrência relativamente rara, a galactose, arabinose ou xilose. Estes compostos também podem existir sob a forma de agliconas (ausência de açúcares ligados à molécula), sendo os principais a quercetina, canferol e mircetina (Figura 5), que se encontram maioritariamente nos vegetais e frutos (Robards & Antolovich, 1997).

A nível estrutural, a conjugação ocorre frequentemente nas posições 2,3 do anel C, contém um grupo cetona na posição 4 e um grupo hidroxilo na posição 3. No anel A, encontram-se dois grupos hidroxilo nas posições 5,7 e dependendo das substituições que podem ocorrer nas posições 4', 3' e 5' do anel B, os flavonóis vão adquirindo nomes e propriedades diferentes.

As fontes mais ricas em flavonóis são a cebola, brócolo, mirtilo, vinho tinto e chá. Estes compostos encontram-se na forma glicosilada, sendo a glucose o principal açúcar (Manach et al., 2004).

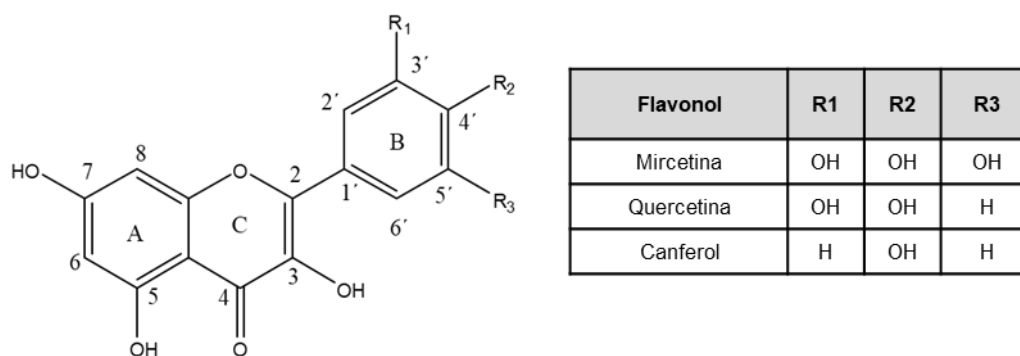


Figura 5 - Estrutura química dos principais flavonóis.

1.2.3 Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis são das classes de polifenóis mais abundantes na natureza, apresentando propriedades antioxidantes devido a algumas características importantes, tais como: a estabilização das formas oxidadas, através da deslocalização de eletrões, a capacidade de quelatação de metais, extinção e inibição de uma vasta gama de espécies de radicais livres e espécies reativas de oxigénio. Estas características previnem a oxidação lipídica e proteica, diminuindo o risco de aparecimento de doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro (De La Iglesia et al., 2010; Susana Soares et al., 2017).

Estes compostos apresentam uma grande diversidade estrutural (Figura 6), devido à estereoquímica no carbono 3 do anel C e número de hidroxilações no anel B (1,2 ou 3 grupos hidroxilo) e, ao contrário das antocianidinas e flavonóis, são moléculas não planares. Os flavan-3-óis podem existir como monómeros, contendo como unidade estrutural a (+) – catequina ou (-) - epicatequina ou então apresentarem-se como oligómeros/polímeros, denominados taninos condensados ou proantocianidinas, uma vez que libertam antocianidinas quando aquecidos sob condições ácidas.

No geral, estes compostos apresentam-se sob a forma de agliconas, livres ou esterificadas com ácido gálico, formando por exemplo, (-) - epigallocatequina e (-) - epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) (Robards & Antolovich, 1997; Cheynier, 2005; De La Iglesia et al., 2010).

Na dieta alimentar, a (+) - catequina e a (-) - epicatequina são dos flavonóides mais presentes nas frutas, enquanto a (+) - galocatequina, (-) - epigallocatequina e a EGCG podem ser encontrados em certas sementes de leguminosas, uvas e chá. De uma forma

geral, os alimentos que possuem alto teor em flavan-3-óis são o chá verde, vinho tinto, cacau e maçã (Manach et al., 2004; Tsao, 2010).

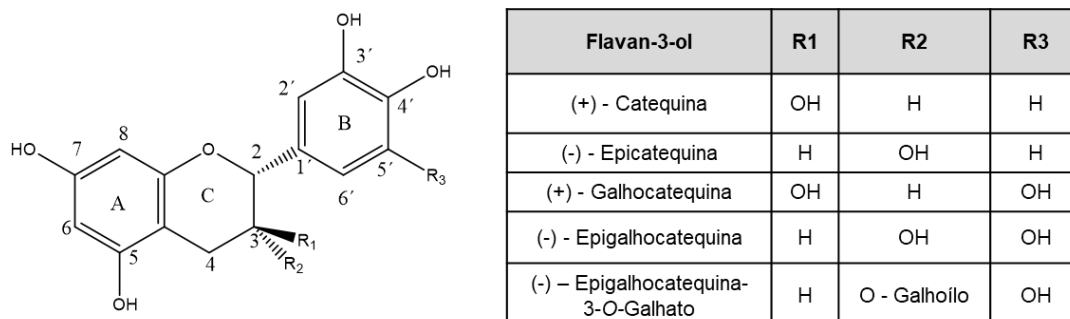


Figura 6 - Estrutura química de alguns flavan-3-óis presentes em alimentos e respetivos substituintes.

1.3 Taninos

Os taninos são um grupo de polifenóis que apresentam uma grande diversidade estrutural e, geralmente um elevado peso molecular (superior a 500 Da), sendo difícil uma definição química rigorosa. Eles estão presentes nas plantas, nomeadamente nas folhas, cascas e frutos e são muito importantes nos mecanismos de defesa, ao tornar o sabor da planta desagradável (sensações de adstringência) (Bennick, 2002^a; Vermerris & Nicholson, 2006).

Estes compostos estão muito presentes na dieta humana devido ao consumo predominante de alimentos e bebidas vegetais, como por exemplo, uvas vermelhas, vinho tinto, chocolate, chá e cerveja. Além disso, estes compostos apresentam vários benefícios para a saúde, nomeadamente, ajudam na prevenção contra o cancro, doenças cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson e alergias (Susana Soares, Brandão, et al., 2020).

Devido à enorme diversidade estrutural, os taninos apresentam propriedades distintas que permitem estabelecer diferentes interações com outras moléculas, como por exemplo, polissacáridos e proteínas, nomeadamente proteínas salivares (PS).

De facto, a interação com PS é considerada uma característica particular dos taninos, na qual assenta a classificação de um polifenol em tanino. Estes compostos apresentam a capacidade de interagir e precipitar alcaloides, gelatinas e proteínas, nomeadamente proteínas ricas em prolina (PRPs), formando agregados solúveis e/ou insolúveis que podem precipitar na cavidade oral e que estão na origem da sensação de adstringência (conjunto de sensações de secura, aspereza e contração da mucosa da cavidade oral).

Esta interação é maioritariamente governada por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Susana Soares et al., 2020).

De acordo com a sua estrutura, distinguem-se duas grandes famílias de taninos, os taninos hidrolisáveis (ésteres de monossacáridos com ácido gálgico ou oligómeros de ácido gálgico/elágico) e os taninos condensados (polímeros de catequina ou proantocianidinas), que vão ser abordados de seguida (Romani et al., 2006).

1.3.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis apresentam como moléculas base o ácido gálgico (galhotaninos) e o ácido elágico (elagitaninos), com núcleos de açúcar (principalmente D-glucose), ligados por ligação éster (Figura 7). Como o próprio nome indica, degradam-se por hidrólise química ou hidrólise enzimática nas várias unidades estruturais que o constituem, devido à facilidade em hidrolisar as ligações éster (Bennick, 2002b).

Os taninos hidrolisáveis encontram-se presentes numa grande variedade de plantas e árvores, especialmente nas partes não comestíveis, como folhas, troncos e ramos. Os taninos gálgicos não se encontram muito presentes na dieta alimentar e os taninos elágicos encontram-se em grupos de alimentos restritos, como na castanha, avelã, caju, framboesa e morango (Mueller-Harvey, 2001). No entanto, estes compostos podem ser introduzidos na dieta através de operações tecnológicas, como por exemplo, no caso do vinho tinto, em que os taninos podem passar da madeira de carvalho para o vinho, durante o envelhecimento em barrica (Sarneckis et al., 2006).

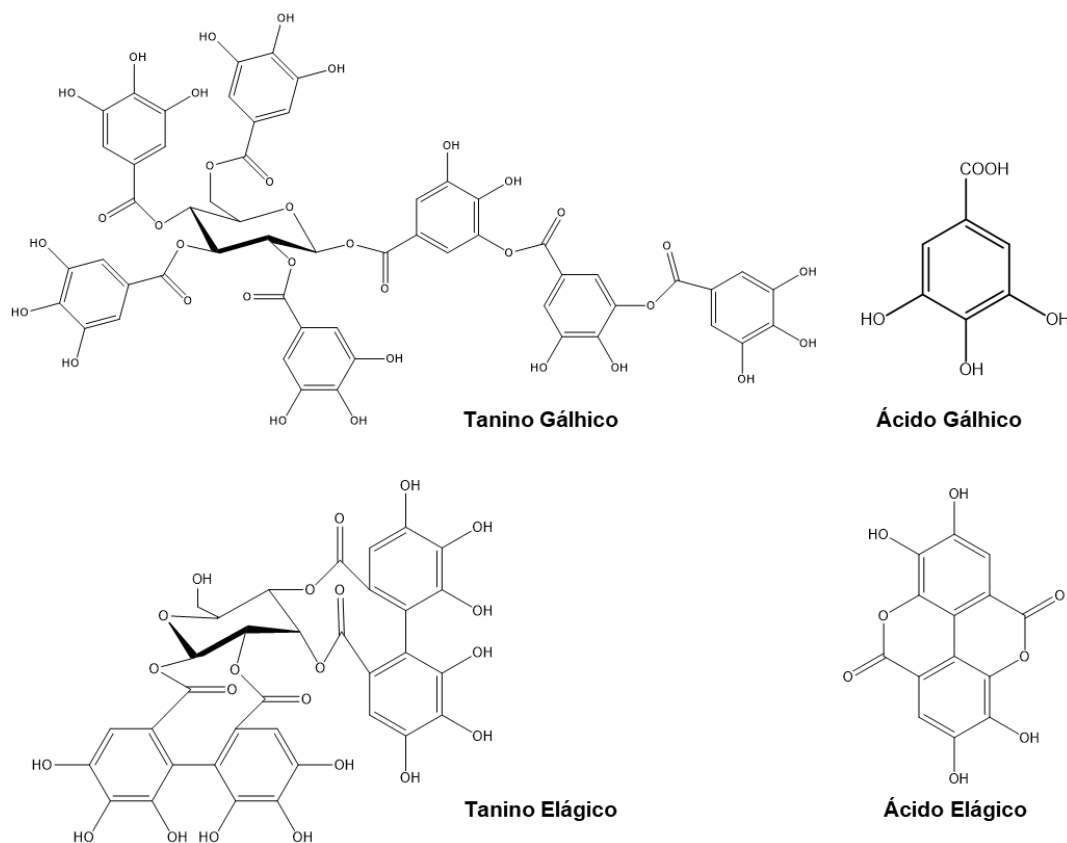


Figura 7 - Estrutura das moléculas base dos taninos hidrolisáveis e respetivos taninos.

1.3.2 Taninos condensados

Os taninos condensados são oligómeros ou polímeros constituídos por unidades de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol, sem núcleo de açúcar e podem ser divididos em dois grandes grupos: as procianidinas, que são polímeros de catequinas ((+) - catequina ou (-) - epicatequina), contendo grupos hidroxilo nas posições 3' e 4' do anel e as prodelfinidinas, que são polímeros de galhocatequinas ((+) - galhocatequinas e (-) - epigalhocatequinas) hidroxilados nas posições 3', 4' e 5' do anel B (Vermerris & Nicholson, 2006; Susana Soares et al., 2020).

Os taninos condensados também se podem denominar de proantocianidinas, isto é, quando aquecidos sob condições ácidas originam antocianidinas - Reação de Bate-Smith (Figura 8). Esta transformação resulta numa grande diversidade estrutural devido à possibilidade de várias substituições entre unidades flavânicas, posições entre as suas ligações e estereoquímica dos seus compostos (Cheynier, 2005).

Devido ao elevado número de grupos hidroxilo e zonas hidrofóbicas, estes têm a capacidade de precipitar PS, que é uma característica importante destes compostos, pois está na origem da sensação de adstringência (Susana Soares et al., 2017).

Na dieta humana, os taninos condensados são muito mais abundantes do que os hidrolisáveis e estão presentes em frutas (e.g. uvas, amoras), cacau, sementes de leguminosas e bebidas de origem vegetal, tal como o vinho tinto, sidra, chá verde e cerveja (Manach et al., 2004; De La Iglesia et al., 2010).

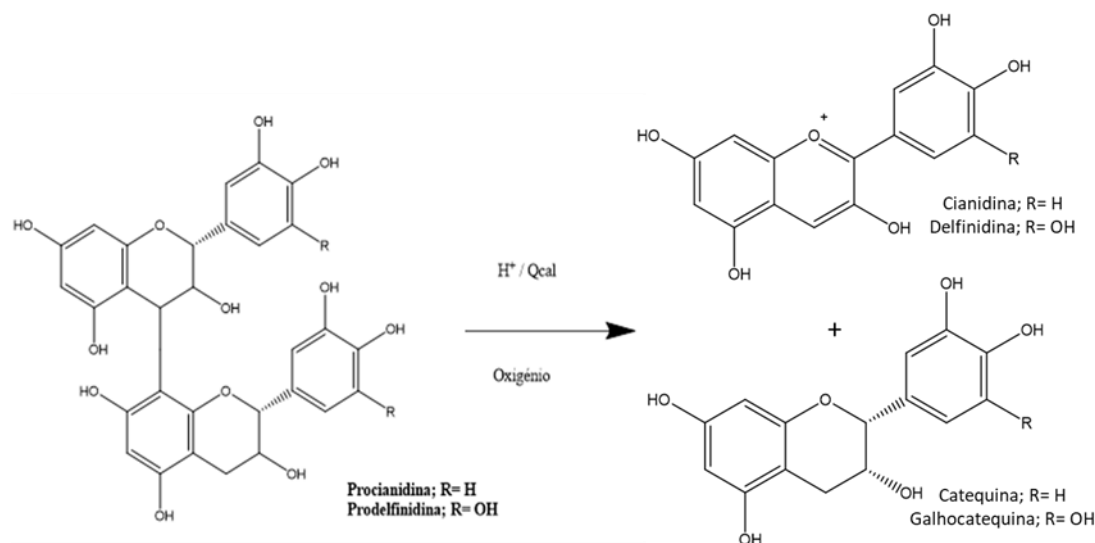


Figura 8 - Reação de decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido – Reação de Bate-Smith (Bate-Smith, 1954).

1.4 Produtos ricos em polifenóis – chá e vinho tinto

Os polifenóis estão presentes na dieta humana em diversos alimentos e bebidas de origem vegetal, tais como no chá e no vinho tinto.

O chá é uma bebida produzida a partir da infusão de folhas da *Camellia sinensis*, apresenta propriedades antioxidantes e é considerada uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo e uma das maiores fontes de flavonóides. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* (Khan & Mukhtar, 2019), demonstram que os polifenóis do chá promovem efeitos benéficos na saúde humana, uma vez que ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, cancro e diabetes.

De acordo com o grau de fermentação, o chá pode adquirir diferentes formas, sendo que as três principais são o chá verde (não fermentado), chá preto (fermentado) e chá

oolong (semi-fermentado). A composição de cada chá varia de acordo com a espécie, estação do ano, folhas, clima e práticas de horticultura, sendo que os polifenóis são os principais compostos ativos presentes.

O chá verde é produzido a partir da infusão de folhas secas da *Camellia sinensis*, enquanto o chá preto é produzido a partir da infusão de folhas processadas da *Camellia sinensis*, trata-se de um processo fermentativo em que as folhas são secas, trituradas e expostas ao ar, sofrendo oxidação enzimática por ação de polifenoloxidasas presentes nos vacúolos das células. Esta oxidação promove a conversão da maior parte dos flavonóides (e.g. catequinas) em vários tipos de produtos, tais como teaflavinas e tearubiginas, que são os principais polifenóis responsáveis pela cor do chá preto. As primeiras produzem um sabor adstringente e uma cor alaranjada, enquanto que as segundas, produzem uma cor avermelhada (Cheynier, 2005; Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006; Khan & Mukhtar, 2019).

Os principais polifenóis presentes nas folhas de chá são monômeros de flavan-3-ol, entre os quais (-) - epicatequina, (-) - epigallocatequina e os seus ésteres gálicos (Cheynier, 2005). As catequinas são os principais polifenóis do chá, que incluem EGCG, (-) - epigallocatequina, (-) - epicatequina-3-O-galato e (-) - epicatequina, (+) - gallocatequinas e (+) - gallocatequina galato, sendo que a EGCG é a catequina predominante, representa cerca de 50% do total de catequinas. A EGCG, também conhecida como ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico, é das catequinas mais estudadas e que mais contribui para a adstringência do chá. Para além disso, possui também elevada atividade antioxidante, prevenindo a formação de radicais livres que poderiam causar danos nas células (Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006; Khan & Mukhtar, 2019; Susana Soares, Soares, et al., 2020).

O vinho tinto é uma bebida alcoólica popular consumida há centenas de anos, produzida a partir de várias variedades de uvas tintas, na qual a etapa de maceração é obrigatória. Nesta etapa, as películas das uvas entram em contacto com o mosto durante algum tempo, de forma a atribuir cor e sabor à bebida. Para além disso, a operação de maceração facilita a difusão dos polifenóis no mosto, o que explica o elevado teor de polifenóis nos vinhos tintos, relativamente aos vinhos brancos (Manach et al., 2004).

Antes de estar pronto para consumo, o vinho tinto passa por várias fases de processamento, das quais a fermentação é a etapa crucial, onde ocorre a transformação do sumo de uva (mosto) em vinho.

Os benefícios do consumo moderado de álcool têm sido amplamente estudados e apoiados pela literatura científica (Castaldo et al., 2019), sendo que a ingestão de vinho

tinto tem sido associada a um menor risco de incidência de doença cardíaca coronária, principalmente devido ao elevado teor de polifenóis presentes no vinho, tais como, flavonóides (catequinas, epicatequinas, quercetina e antocianinas), não flavonóides (resveratrol) e taninos condensados (procianidinas) (Muñoz-Bernal et al., 2021).

A composição do vinho e o seu conteúdo em polifenóis depende de vários fatores, tais como, região de cultivo, clima, solo, fatores genéticos, estágios de crescimento e maturação e processo de vinificação. Por exemplo, as antocianinas encontram-se apenas nas variedades tintas e acumulam-se no final do amadurecimento e as proantocianidinas localizam-se principalmente nas películas e sementes (Cheynier, 2005).

Os não flavonóides estão presentes nas películas das uvas e são extraídos para o vinho no início do processo de vinificação e incluem três grupos principais: estilbenos, ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos. Entre os estilbenos, o resveratrol é o principal, sendo considerado o composto do vinho mais eficaz no que diz respeito à prevenção de doenças cardiovasculares, devido às suas propriedades antioxidantes. Os ácidos benzóicos estão presentes tanto na uva como na madeira de carvalho e, durante o armazenamento, podem migrar para o vinho, sendo o ácido gálico o principal. O ácido cafeico, cumárico e ferúlico são dos ácido cinâmicos mais presentes nas uvas e vinho (Castaldo et al., 2019; Muñoz-Bernal et al., 2021).

Os principais flavonóides presentes nas uvas e no vinho são flavonóis, que incluem a mircetina e quercetina, maioritariamente presentes no vinho; antocianinas, sendo os principais glicósidos ou formas aciladas de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina; flavan-3-óis, sendo a (+) - catequina e a (-) - epicatequina, os mais importantes nas uvas e vinho (Muñoz-Bernal et al., 2021).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são os principais taninos do vinho tinto, responsáveis também pela sua estrutura e adstringência. Estes são extraídos das uvas e posteriormente modificados estruturalmente durante a vinificação e envelhecimento, enquanto que uma pequena percentagem de taninos hidrolisáveis podem ser extraídos de barricas ou lascas de carvalho, durante o envelhecimento (Sarneckis et al., 2006).

2. Saliva Humana

A saliva humana é um fluido oral, com valores de pH entre 6 e 7, fundamental para a preservação e manutenção da saúde bucal (Humphrey & Williamson, 2001). A saliva apresenta diversas funções: age como lubrificante durante processos como mastigação, formação do bolo alimentar, deglutição e fala; ajuda na manutenção da integridade dos dentes; atua como um tampão para proteger a mucosa oral, faríngea e esofágica do ácido ingerido oralmente ou do ácido regurgitado do estômago; ajuda na homeostasia microbiana e na cicatrização de feridas e facilita o reconhecimento dos sabores através dos recetores sensoriais (Dawes et al., 2015).

A saliva é uma mistura de secreções produzidas por três pares de glândulas salivares maiores (submandibulares, sublinguais e parótidas) e menores, fluido crevicular gengival, bactérias e detritos celulares (Brandão, Soares, Mateus, & de Freitas, 2014). A localização na cavidade oral das principais glândulas salivares encontram-se representadas na figura 9.

As secreções podem ser estimuladas, em resposta a um grande estímulo, maioritariamente por ingestão de alimentos ou não-estimuladas, secretadas em repouso (ausência de estímulos). As contribuições percentuais das diferentes glândulas salivares durante o fluxo não estimulado são as seguintes: 20% da parótida, 65% da submandibular, 7% a 8% da sublingual e menos de 10% das glândulas menores. O fluxo médio salivar diário varia entre 500 mL a 1.5 L, no entanto é uma medida muito variável, pois depende de muitos fatores como ritmos circadianos (ritmos endógenos que expressam um período de aproximadamente 24h e que regulam diversos processos fisiológicos e metabólicos do corpo humano), dieta, idade, sexo e saúde do indivíduo (Humphrey & Williamson, 2001; Brandão et al., 2014).

A saliva apresenta uma composição muito diluída, sendo predominantemente constituída por água (mais de 99%) e também composta por uma fração inorgânica e uma fração orgânica. A fração inorgânica inclui eletrólitos, tais como sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos. A fração orgânica inclui imunoglobinas, proteínas, péptidos, enzimas, mucinas, produtos nitrogenados como ureia, amónia, ácido úrico, entre outros (Humphrey & Williamson, 2001; Dodds et al., 2005). A saliva contém uma grande variedade de proteínas que são exclusivas deste fluido e que apresentam funções biológicas muito importantes na saúde bucal. Estas proteínas vão ser abordadas de seguida.

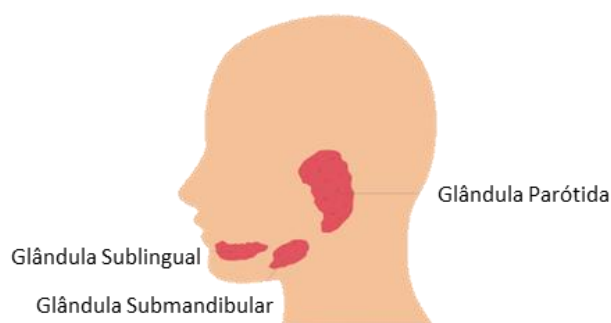


Figura 9 - Representação da localização das glândulas salivares na cavidade oral.

2.1 Proteínas Salivares (PS)

As PS representam cerca de 0,3% da constituição total da saliva (Roblegg et al., 2019). Através de estudos e de análises proteômicas foi possível caracterizar a composição proteica da saliva, tendo sido identificado mais de 3000 proteínas com diferentes funções, sendo que a mesma função pode ser compartilhada por diferentes classes de proteínas (Sivadasan et al., 2015).

A composição proteica da saliva não é constante, sendo que esta é influenciada pelos ritmos circadianos (variam ao longo do dia), pela ingestão de alimentos, assim como pela ausência de ingestão em períodos de jejum (Brandão, Soares, Mateus, & de Freitas, 2014).

A maioria das PS são sintetizadas no retículo endoplasmático e armazenadas em vesículas e grânulos de secreção no complexo de Golgi. As proteínas secretadas incluem α -amilase, mucogliproteínas (mucinas) e outras proteínas, como proteínas ricas em prolina (PRPs), cistatinas, histatinas, lisozimas e glicoproteínas (Roblegg et al., 2019).

Muitas das proteínas presentes na saliva contêm altos níveis de prolina, sendo por isso designadas proteínas ricas em prolina (PRPs). Estas compreendem quase 70% do conteúdo total de proteínas da saliva parótida humana e podem ser divididos em três grupos consoante a carga e grau de glicosilação: PRPs básicas (bPRPs), glicosiladas (gPRPs) e acídicas (aPRPs). A α -amilase é a proteína mais abundante na saliva, converte polissacáridos em unidades solúveis e é secretada por todas as glândulas, enquanto as outras proteínas antimicrobianas, como a lisozima, lactoferrina, peroxidase e imunoglobulina secretora A (IgA) estão presentes em quantidades menores. As mucinas são o principal componente orgânico da saliva submandibular/sublingual, são

glicoproteínas de elevada massa molecular, que atuam na defesa da saúde bucal, ou seja, impedem a desidratação do revestimento interno (Humphrey & Williamson, 2001; Dodds et al., 2005).

As PS apresentam a capacidade de interagir com taninos, dando origem à sensação de adstringência na cavidade oral, sendo que as principais famílias relacionadas com a sensação de adstringência são as PRPs, a estaterina, o péptido P-B e as cistatinas (Brandão, Soares, Mateus, & de Freitas, 2014). Estas famílias serão abordadas detalhadamente de seguida.

2.1.1 Proteínas ricas em prolina (PRPs)

As PRPs são uma das principais classes de PS, apresentam na sua constituição o aminoácido prolina em elevada percentagem (25% a 42% dos aminoácidos das PRPs) e para além deste, também apresentam a glicina (21%) e a glutamina (17%). Estas proteínas são secretadas maioritariamente pelas glândulas parótida e, em pequenas percentagens pelas glândulas submandibulares e sublinguais (Susana Soares, Brandão, et al., 2020). São consideradas proteínas intrinsecamente não estruturadas, ou seja, não possuem uma estrutura terciária estável, apesar de continuarem a ser funcionais (Boze et al., 2010).

De acordo com as características ácidas/básicas ou presença/ausência de glicosilação, as PRPs podem ser divididas em três famílias: PRPs básicas (bPRPs), glicosiladas (gPRPs) e acídicas (aPRPs). As bPRPs possuem principalmente resíduos básicos, apresentam alto teor em prolina e glicina, representando 70% da sua sequência, as gPRPs apresentam núcleos de açúcar ligados a resíduos de aminoácidos e as aPRPs são ricas em resíduos de aminoácidos acídicos, tal como o ácido aspártico e glutâmico (Bennick, 2002^a; Susana Soares, Soares, et al., 2020).

As PRPs interagem com taninos, formando complexos solúveis e/ou insolúveis que estão na origem da sensação de adstringência na cavidade oral (Lu & Bennick, 1998). As bPRPs apresentam a capacidade de se ligar a taninos, evitando assim, efeitos tóxicos no trato gastrointestinal (Susana Soares et al., 2017). A interação ocorre devido à presença de sequências de aminoácidos de prolina e glicina que conferem uma estrutura aberta, capaz de criar uma boa área de superfície de ligação e facilitar a ocorrência de interações hidrofóbicas e ligações por pontes de hidrogénio (Boze et al., 2010).

Atualmente, sabe-se que as aPRPs interagem fortemente com taninos, devido ao seu carácter acídico nos 30 primeiros aminoácidos da cadeia, nomeadamente pela

presença de ácido aspártico e glutâmico. Estes resíduos acídicos podem favorecer as interações por pontes de hidrogênio, o que provavelmente explica a alta afinidade das aPRPs pelos taninos (Brandão, Soares, Mateus, & Freitas, 2014). Estas proteínas possuem um papel importante no processo de mineralização dos dentes, proporcionando um ambiente protetor e reparador do esmalte dentário e também apresentam como função, modular a colonização bacteriana dos dentes (Castagnola et al., 2011). As gPRPs estão associadas à lubrificação da cavidade oral e apresentam a capacidade de interagir com taninos, desenvolvendo assim, a sensação de adstringência na cavidade oral.

2.1.2 Estaterina

A estaterina é um pequeno péptido com baixo peso molecular (5380 Da), que contém 43 resíduos de aminoácidos muito específicos e multifuncionais. Este péptido é produzido pelas glândulas parótida e submandibular, sendo abundante em resíduos de tirosina, prolina e ácido glutâmico e fosforilada em dois resíduos (Ser-2 e Ser-3). O N-terminal da molécula contém mais resíduos carregados negativamente do que positivamente, tornando a proteína muito ácida, o que facilita a precipitação por taninos, nomeadamente taninos condensados (Helmerhorst et al., 2010; Silva et al., 2017; Susana Soares et al., 2017).

A estaterina tem como função a manutenção da concentração de cálcio iónico, necessário para a remineralização dos dentes, uma vez que é capaz de inibir a precipitação e o crescimento de cristais de hidroxiapatia de soluções supersaturadas de fosfato de cálcio. A sua ligação ao cálcio é estabelecida devido ao facto da região N-terminal da estaterina ser muito negativa, sendo o nível de fosforilação da proteína também importante para esta função. Para além disso, a estaterina também serve como lubrificante para proteger os dentes do desgaste (Humphrey & Williamson, 2001; Helmerhorst et al., 2010; Susana Soares et al., 2017).

2.1.3 Péptido P-B

O péptido P-B tem dimensões muito pequenas (5792 Da) e normalmente encontra-se incluído na família das bPRPs, pois é bastante rico em resíduos de prolina (50% da sua sequência), embora apresente características estruturais (sequências de aminoácidos) semelhantes à da estaterina (Susana Soares, Soares, et al., 2020)

A maior distinção relativa ao péptido P-B verifica-se a nível estrutural, por apresentar zonas hidrofóbicas, visto que contém resíduos de aminoácidos apolares, tais como a leucina, fenilalanina e isoleucina, e três resíduos de tirosina (Irene Messana et al., 2004). Em vários estudos já foi comprovado que assim como as estaterinas, o péptido P-B é também precipitado por taninos, nomeadamente elagitaninos (Silva et al., 2017).

2.1.4 Cistatinas

As cistatinas são uma família de proteínas estruturadas que contêm duas pontes dissulfeto, formadas por resíduos de cisteína, cujas massas moleculares variam entre 13-14 kDa (Humphrey & Williamson, 2001; Silva et al., 2017).

Estas proteínas possuem um papel menor relativamente à regulação de cálcio presente na saliva, no entanto, têm como função proteger a cavidade oral de agentes patogénicos, pois são inibidores competitivos das proteases, nomeadamente a cisteína protease (envolvida na doença periodontal) e protegem os tecidos orais contra a degradação pela atividade proteolítica (Humphrey & Williamson, 2001; Josiah Ochieng & Gautam Chaudhuri, 2010; Brandão, Soares, Mateus, & Freitas, 2014).

Estudos reuniram evidências de que as cistatinas são levemente precipitadas por taninos, enquanto que a estaterina e péptido P-B são altamente reativos e precipitados por taninos (Silva et al., 2017).

3. Adstringência

O termo adstringência deriva da palavra latina *ad stringere* que significa “ligar” e, é descrita como uma sensação tátil percecionada na cavidade oral, sendo definida como um conjunto de sensações envolvendo secura (falta de lubrificação salivar), aspereza e rugosidade (sensação de aperto e contração dos tecidos orais), tipicamente durante a ingestão de alimentos e bebidas ricas em taninos (Bajec et al., 2008; Silva et al., 2017; Susana Soares et al., 2017). Um exemplo sensorial comum usado para descrever esta sensação para um público não científico é a sensação percecionada durante a ingestão de uma banana ou dióspiro verde (Susana Soares, Brandão, et al., 2020).

A perceção da adstringência varia de pessoa para pessoa, uma vez que depende de alguns fatores como por exemplo, o fluxo salivar. A forma como esta é percecionada vai também condicionar as preferências e aceitação de um produto por parte do consumidor. De facto, os consumidores que já incluam regularmente produtos com elevada adstringência na sua dieta, tendem a aceitar mais facilmente produtos mais adstringentes (Dinnella et al., 2011).

O mecanismo de adstringência mais estudado e estabelecido é a interação/precipitação de PS por polifenóis, nomeadamente taninos (Figura 10) (Pires et al., 2020). Desde 1954, quando Bate-Smith (Bate-Smith 1954) propôs que a adstringência resultava da interação de taninos com PS na cavidade oral, que se tem aceite e apoiado por diversos trabalhos este mecanismo (Susana Soares et al., 2017).

Os taninos interagem com as proteínas através de múltiplos sítios de ligação, e essa associação é governada por ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, dependendo do tamanho, carga e estrutura da proteína, bem como do peso molecular dos taninos. Esta interação leva à precipitação das proteínas, resultando numa sensação desagradável na cavidade oral (Silva et al., 2017).

Por muito tempo, a interação/precipitação tanino-proteína foi considerada o mecanismo central da perceção de adstringência, no entanto, estudos revelaram que este fenómeno não explica todas as sensações descritas, existindo algumas inconsistências entre experiências *in vitro* e estudos sensoriais (Guerreiro et al., 2022). Por este motivo, a adstringência pode ser explicada a nível molecular por outros mecanismos, tais como a interação de polifenóis com constituintes orais, como as células presentes no epitélio oral e a película da mucosa (Figura 10) (Susana Soares, Brandão, et al., 2020; Susana Soares, Soares, et al., 2020). Alguns estudos mostram

que os vários constituintes orais se podem ligar a polifenóis e, portanto, ter um papel ativo na perceção de adstringência (Payne et al., 2009; Sónia Soares et al., 2019).

De facto, outras hipóteses também têm sido levantadas, como a ativação de mecanorreceptores (Figura 10), no qual ocorre a ativação do nervo trigeminal, embora ainda não tenha sido muito estudado (Bajec et al., 2008).

No presente trabalho, através de um modelo celular inovador, foi possível estudar o efeito dos polissacáridos em dois dos mecanismos descritos para explicar a sensação de adstringência: a interação dos polifenóis com as PS e a interação dos polifenóis com constituintes orais, como as células do epitélio oral e a película da mucosa, que vão ser abordados de seguida.

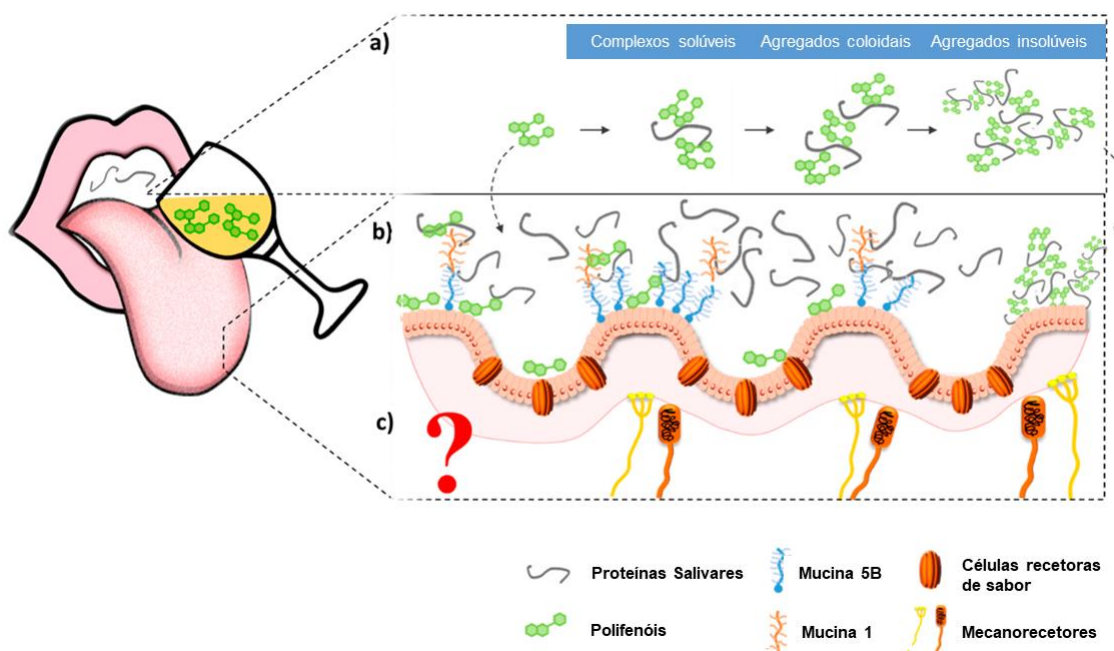


Figura 10 - Mecanismos propostos para o início da adstringência: (a) interação e precipitação de proteínas salivares por polifenóis; (b) interação dos polifenóis com as células orais e/ou película da mucosa; (c) ativação de mecanorreceptores orais. Adaptado de Susana Soares, Brandão, et al., (2020).

3.1 Mecanismo de adstringência: Interação entre polifenóis e proteínas salivares

Estudos mostram que a interação entre polifenóis e PS está relacionado com o desenvolvimento da adstringência. Este facto deve-se à ligação de taninos, provenientes de alimentos e de bebidas de origem vegetal, com PS, o que leva à formação de agregados solúveis e/ou insolúveis, que podem precipitar e eliminar grande

parte da lubrificação, dando origem à sensação de secura e aspereza na cavidade oral (Figura 11) (Brandão, Soares, Mateus, & Freitas, 2014).

Como já foi referido anteriormente, uma das propriedades mais importantes dos taninos é a capacidade de interação e precipitação de proteínas. Esta propriedade está na origem de diversos fenómenos associados a estes compostos, tais como atividade biológica e atividade organolética, sendo este tema alvo de estudo por vários grupos de investigação, ao longo dos anos. Nestes estudos, foram propostos modelos e mecanismos de interação tanino-proteína e discutidos os tipos de ligação envolvidos, assim como diversos fatores que afetam estas interações e que vão ser abordados de seguida.

Alguns estudos sugerem que a ligação entre polifenóis e proteínas é um mecanismo de deteção de taninos ou um mecanismo de defesa, que inibe os taninos nocivos antes que eles se tornem biodisponíveis e afetem o trato gastrointestinal (Lu & Bennick, 1998; Bajec et al., 2008). Independentemente de ser um mecanismo de defesa ou de deteção, a capacidade de ligação entre proteínas e polifenóis está bem documentada e foi demonstrada com uma variedade de proteínas, incluindo PRPs (Jöbstl et al., 2004; Bajec et al., 2008).



Figura 11 - Mecanismo molecular de interação/precipitação de proteínas salivares por polifenóis.

3.1.1 Tipos de ligação envolvidos na interação tanino-proteína

Os polifenóis apresentam uma estrutura molecular favorável à interação com proteínas, devido à presença de regiões hidrofóbicas (apolares), como o anel benzénico, que podem interagir com regiões hidrofóbicas das proteínas, tais como cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos como a leucina, isoleucina e prolina, entre outros e devido à presença de regiões hidrofílicas, como os grupos hidroxilo, que podem estabelecer

pontes de hidrogénio com os grupos carbonilo e amino das proteínas (Victor de Freitas & Nuno Mateus, 2012).

Assim, as interações tanino-proteína podem envolver ligações covalentes, iónicas, por pontes de hidrogénio e ligações hidrofóbicas (Fickel et al., 1999). Apesar que, a maioria da literatura sugere que estas interações são estabelecidas essencialmente por ligações não-covalentes, concretamente ligações hidrofóbicas e os seus complexos/precipitados formados são estabilizados por ligações de hidrogénio (Adrian J et al., 1996; Bennick, 2002b; Susana Soares et al., 2012; Susana Soares et al., 2017).

3.1.2 Modelos de interação tanino-proteína

Estudos sugerem que os taninos atuam como ligandos multidentados, ou seja, diferentes anéis fenólicos da mesma molécula podem interagir com a proteína, possibilitando aos taninos estabelecer ligações cruzadas entre duas ou mais moléculas proteicas ou ligar-se a mais do que um ponto da cadeia peptídica de uma proteína. Deste modo, a estequiometria e tamanho dos complexos tanino-proteína dependem das suas concentrações, ou seja, da razão entre tanino e proteína (Hagerman & Robbins, 1987).

Hagerman e Robbins, verificaram que existe uma relação tanino-proteína ótima para a qual ocorre a precipitação máxima (Figura 12. (A)). Durante a experiência, foi utilizado concentrações crescentes de albumina sérica bovina (BSA) e uma quantidade fixa de um tanino condensado e foi demonstrado que, sob razões ótimas tanino:proteína e condições de pH, os complexos tanino-proteína são insolúveis; na presença de excesso de proteína, os complexos tanino-proteína são solúveis, pois não há tanino suficiente para reticular suficientemente as proteínas e formar agregados; e o mesmo acontece na presença de excesso de tanino, porque quase todos os sítios na proteína estão ocupados. Por esta razão, os complexos tanino-proteína são descritos como solúveis e insolúveis (Hagerman & Robbins, 1987; Siebert et al., 1996; Bajec et al., 2008; Susana Soares et al., 2012).

Um modelo proposto para explicar estas observações surgiu mais tarde (Siebert et al. 1996) e está esquematizado na (Figura 12. (B)).

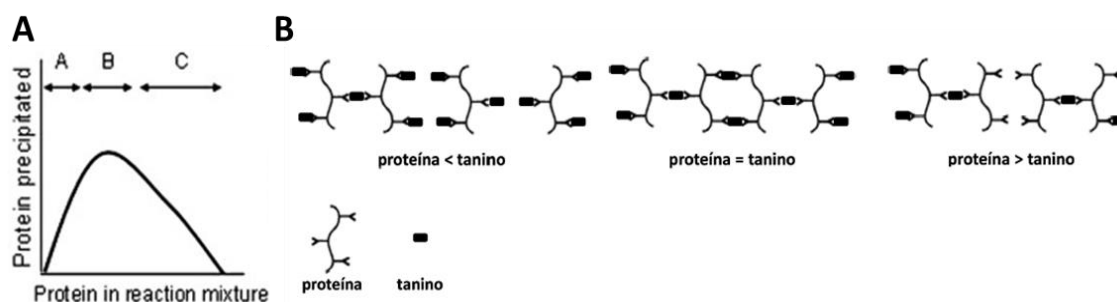


Figura 12 - Representação esquemática de (A) titulação de extrato vegetal contendo uma concentração fixa de tanino e concentrações crescentes de proteína (BSA): região A, excesso de tanino; região B, ponto de equivalência; região C, excesso de proteína (Adaptado de Hagerman e Robbins (1987)) e de (B) modelo de interação tanino-proteína: os taninos são descritos como tendo duas extremidades que se podem ligar às proteínas; as proteínas são representadas como tendo um número fixo (três) de locais de ligação ao tanino.

No entanto, este modelo tanino-proteína não se aplica a todas as proteínas. Por exemplo, no caso das PRPs o comportamento parece ser distinto. A adição de quantidades crescentes de PRP salivar a uma quantidade fixa de tanino levou à formação de complexos insolúveis tanino-proteína, os quais permaneceram insolúveis, independentemente da quantidade de proteína adicionada. Por isso, este comportamento sugeriu que a estabilidade dos complexos tanino-proteína dependesse também dos tipos de polifenol e proteína utilizados e não apenas das condições ambientais da reação (Hagerman & Robbins, 1987).

Deste modo, ao longo do tempo foram propostos mecanismos moleculares alternativos para explicar a interação entre taninos e PRPs, sendo que o modelo atualmente aceite foi proposto por Jobstl e colaboradores (Jöbstl et al., 2004), no qual é dividido em três fases (Figura 13).

Na primeira fase, as proteínas encontram-se livres e enroladas de forma aleatória e os taninos ligam-se simultaneamente em vários locais da proteína, pois comportam-se como ligandos multidentados e com isto, a proteína adquire uma conformação/estrutura mais pequena, compacta e esférica. Na segunda fase, à medida que a concentração de taninos aumenta, eles reticulam diferentes moléculas de proteína levando à dimerização, causando assim insolubilidade e, por fim, na terceira fase, os dímeros agregam-se e as partículas maiores precipitam na solução (Jöbstl et al., 2004).

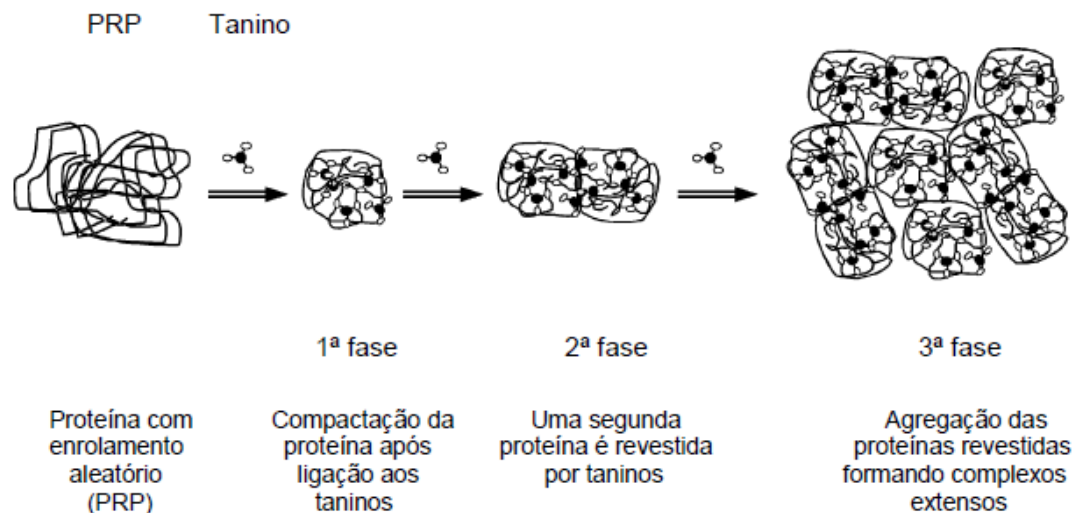


Figura 13 - Mecanismo molecular proposto para a interação das PRPs com os taninos. Adaptado de Jöbstl et al. (2004).

De uma forma geral, a interação tanino-proteína pode ser influenciada por vários fatores, tais como a estrutura do tanino, a estrutura da proteína, condições do meio, nomeadamente a presença do solvente (etanol), pH, temperatura, força iónica e a presença de outros compostos, como os polissacáridos (Susana Soares, Brandão, et al., 2020). A influência de alguns destes fatores vai ser abordada nas próximas secções.

3.1.3 Fatores que influenciam a interação tanino-proteína

A interação tanino-proteína é influenciada por vários fatores, tais como peso molecular e estrutura do tanino, estrutura/conformação e carga da proteína, fatores externos, como por exemplo pH, força iónica, etanol e temperatura e presença de polissacáridos, este último vai ser discutido na secção 4.1 e 4.1.1 (Susana Soares et al., 2017).

- Efeito da estrutura do tanino

Várias características estruturais dos taninos influenciam a sua capacidade em interagir com proteínas, nomeadamente peso molecular, grau de polimerização, grau de galhoilação, estereoquímica, conformação e ligação interflavânica (De Freitas & Mateus, 2001; S. Soares et al., 2007; S. Soares, Brandão, et al., 2020).

Trabalhos evidenciam que a afinidade dos taninos pelas proteínas aumenta com o peso molecular e com o grau de polimerização e galhoilação (maior número de grupos

galhoílo), porque o número de locais de interação aumenta com o tamanho (Baxter et al., 1997; De Freitas & Mateus, 2001). Por exemplo, os taninos hidrolisáveis são mais reativos às proteínas do que os taninos condensados, isto porque a afinidade de ligação entre o tanino hidrolisável e a proteína está relacionada com o grau de galhoilação, ou seja, este grau induz um aumento de locais no tanino aptos a ligarem-se à mesma proteína ou a proteínas diferentes (Bajec et al., 2008).

Em relação à estereoquímica e conformação dos taninos, de Freitas e Mateus mostraram que entre as duas unidades principais dos flavan-3-óis, a (+) - catequina apresentou maior interação com as PRPs do que a (-) - epicatequina e, relativamente às ligações interflavânicas, mostraram que os dímeros de procianidinas ligados por uma ligação C(4)-C(8) apresentaram maior interação com proteínas do que os dímeros de procianidinas com uma ligação C(4)-C(6) (De Freitas & Mateus, 2001; Victor de Freitas & Nuno Mateus, 2012).

- Efeito da estrutura da proteína

A estrutura da proteína influencia o modo de ligação ao polifenol e a interação pode ser afetada pela estrutura, carga, tamanho e o tipo de cadeia lateral dos aminoácidos.

Uma característica importante é a estrutura primária da proteína, Wróblewski e colaboradores, observaram por ressonância magnética nuclear que a ligação de taninos a uma histidina modificada, ou seja, histidina com os mesmo resíduos mas disposta aleatoriamente, foi significativamente menor quando comparada a uma histidina original (Wróblewski et al., 2001). De facto, uma proteína que apresente uma conformação helicoidal, mais “solta” e flexível, apresenta uma maior afinidade para ligar mais moléculas de polifenol por molécula de proteína, do que uma proteína que possua uma estrutura globular. A conformação helicoidal é uma característica estrutural comum das PRPs (Susana Soares et al., 2017).

Sabe-se que as PRPs apresentam uma elevada afinidade para interagir com taninos, nomeadamente taninos condensados do que por taninos hidrolisáveis. Da mesma forma, PRPs maiores apresentam maior afinidade por taninos do que PRPs menores ou fragmentos peptídicos. Esta maior afinidade pode ser explicada devido à natureza multidentada dos polifenóis, que permite que um único polifenol ligue vários resíduos da proteína (Bajec et al., 2008).

A composição em aminoácidos é também um fator que influencia as interações, isto é, proteínas com elevado teor em resíduos de prolina apresentam maior afinidade em se ligar a taninos. Nas PRPs, os principais locais de ligação são aqueles que apresentam uma sequência de resíduos de prolina, sendo o preferido, o primeiro resíduo

de uma sequência Pro-Pro. Além disso, os resíduos de prolina induzem conformações estruturais mais abertas e flexíveis às PS, de modo a expor outros resíduos à ligação com taninos (De Freitas & Mateus, 2001; Cala et al., 2013; S. Soares, Brandão, et al., 2020).

- Efeito de outros fatores (pH, força iónica, solvente, temperatura)

A interação entre taninos e proteínas também pode ser afetada por outros fatores, como por exemplo, o pH, a força iónica, os solventes (principalmente solventes orgânicos) e a temperatura. Em relação a estes fatores, existe uma maior variabilidade e menos dados disponíveis, sendo os seus efeitos mais dependentes do par tanino-proteína (Susana Soares, Brandão, et al., 2020).

Hagerman e Butler foram os primeiros a sugerir que o pH poderia influenciar as interações, isto é, ocorre uma menor solubilidade dos agregados tanino-proteína (maior interação), para valores de pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas (0,3 a 3,1 unidades abaixo), onde as repulsões entre as proteínas são minimizadas (Hagerman & Butler, 1978). De facto, Naczki e colaboradores, revelaram uma maior interação entre BSA e polifenóis de folhas de mirtilo, para valores de pH entre 4 e 5 e uma menor interação para valores de pH menores (3,5) e maiores (6,0) (M. Naczki et al., 2006).

A influência da força iónica sobre as interações tanino-proteína é ainda pouco estudada, dependendo muito dos compostos em questão. Segundo Freitas e colaboradores, a força iónica parece afetar de forma diferente a interação entre BSA e diferentes grupos de polifenóis, uma vez que, interações com proantocianidinas e quercetina diminuem com o aumento da força iónica e interações com taninos hidrolisáveis aumentam com o aumento da força iónica (Victor de Freitas & Nuno Mateus, 2012).

Em relação ao efeito do solvente, a maioria da literatura destaca o efeito do etanol, devido a uma grande percentagem de taninos se encontrarem presentes em bebidas alcoólicas. Alguns trabalhos também destacam o efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) (Susana Soares, Brandão, et al., 2020). De uma forma geral, a presença de etanol em pequenas percentagens (entre 4% e 12%) diminui a interação entre taninos e proteínas. Brandão e colaboradores observaram que o etanol e o DMSO podem interromper as interações entre a mucina e várias procianidinas (Brandão et al., 2017).

Relativamente ao efeito da temperatura, parece não existir muita coerência na literatura disponível. Charlton e colegas observaram uma diminuição nas afinidades entre taninos e PRPs, com o aumento da temperatura (Illiamson, 2002). Por outro lado, Hofmann e colaboradores revelaram que a interação entre taninos hidrolisáveis e

BSA aumentou com a temperatura (Hofmann et al., 2006). Assim, verifica-se que o efeito da temperatura depende muito do tipo de proteína e tanino envolvido na interação.

3.2 Mecanismo de adstringência: Interação de polifenóis com constituintes orais

Para além da interação entre polifenóis e PS, outros mecanismos têm surgido para explicar a adstringência, como a ligação de polifenóis, nomeadamente taninos, a constituintes orais, como as células do epitélio oral e a película da mucosa (Figura 14) (Payne et al., 2009; S. Soares et al., 2016; Sónia Soares et al., 2019; Canon et al., 2021; González-Muñoz et al., 2021).

Payne e colaboradores, demonstraram que os taninos podem interagir com células epiteliais orais. Esta interação aumentou em condições de pH mais baixo, o que se correlacionou diretamente com um aumento na perceção da adstringência (Payne et al., 2009). Davies e colegas, sugeriram que a interação de polifenóis com mucinas adsorvidas ao epitélio oral pode desempenhar um papel importante na sensação de adstringência, uma vez que os taninos se ligam a mucinas salivares (MUC5B e MUC7), constituintes da película da mucosa (Davies et al., 2014).

Ployon e colegas demonstraram que as mucinas salivares (MUC5B e MUC7) ligadas às células epiteliais estão envolvidas na formação da película da mucosa (Ployon et al., 2018). A película da mucosa é uma camada de interface entre o epitélio oral e a saliva (filme salivar), cujas propriedades físico-químicas podem controlar diferentes mecanismos, como adsorção ou difusão de substâncias e, portanto, influenciar a perceção da adstringência (González-Muñoz et al., 2021). Esta película é uma estrutura biológica fina, constituída por PS adsorvidas à membrana plasmática das células epiteliais orais através de ligações covalentes e não covalentes (Gibbins et al., 2014; Sónia Soares et al., 2019). Esta película contém MUC5B, MUC7, cistatinas, IgA, amilases e PRPs, sendo as mucinas MUC5B e MUC7, os componentes principais. Esta camada atua como uma barreira protetora e atua como lubrificante evitando a fricção contra a mucosa oral (Ployon et al., 2018).

Mais tarde, Soares e colaboradores estudaram a possível contribuição de PS e células orais na adstringência induzida por taninos. Os resultados mostraram que algumas procianidinas foram capazes de se ligar a células orais e que os complexos proteína-procianidina formados também foram capazes de se ligar às células orais, sendo que as procianidinas que não se ligaram às células, ligaram-se às PS formando

uma rede de complexos proteína-procianidina (Susana Soares et al., 2016). No entanto, a contribuição e o efeito (sinergia ou antagonismo) dos constituintes orais nas interações eram desconhecidos. Por isso, de forma a obter um conhecimento detalhado sobre os mecanismos moleculares que levam à percepção da adstringência, foi desenvolvido um modelo oral *in vitro*, que compreendeu células orais (linha celular de carcinoma espinocelular da língua humana (HSC-3)), saliva humana e película da mucosa. Este modelo permitiu pela primeira vez estudar a interação de misturas (complexas) de procianidinas com diferentes constituintes orais, de forma individual, e que estão presentes simultaneamente na cavidade oral. Em geral, os resultados revelaram que as PS e as células orais foram os principais constituintes orais que conduziram a ligação das procianidinas à cavidade oral (Sónia Soares et al., 2019).

Deste modo, através deste novo modelo oral, têm sido realizados estudos a fim de obter um conhecimento mais aprofundado sobre os mecanismos que podem levar à percepção da adstringência, assim como avaliar a interação entre diferentes famílias de polifenóis (presentes numa mistura) e os diferentes constituintes orais (células, PS e película da mucosa), assim como também modular essas interações na presença de polissacáridos (Susana Soares, Soares, et al., 2020; Guerreiro et al., 2022a)).

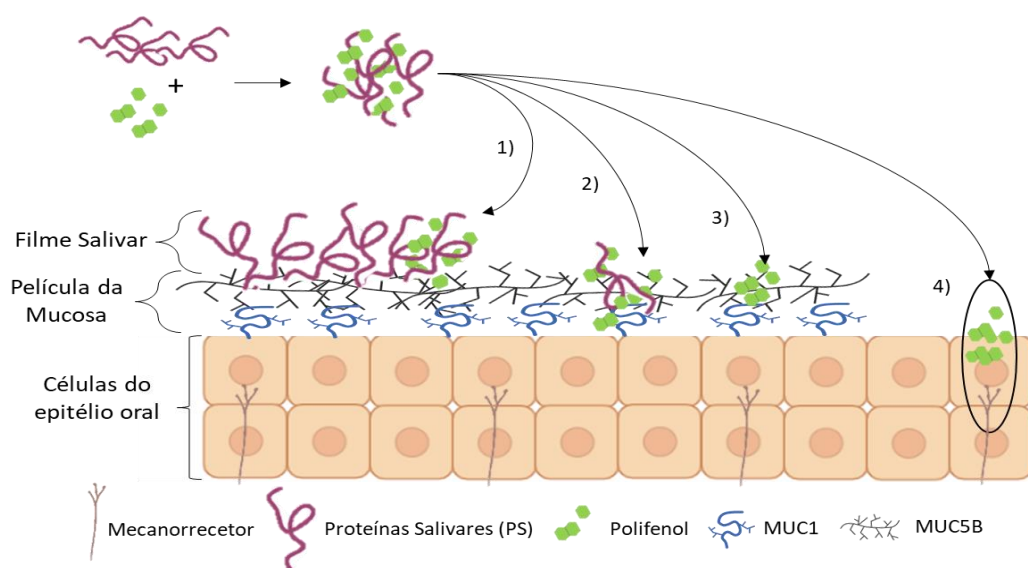


Figura 14 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos de adstringência envolvendo células orais, película da mucosa, proteínas salivares, polifenóis e mecanorreceptores. As proteínas salivares entram em contacto com os polifenóis na cavidade oral e formam complexos. Estes complexos 1) interagem com o filme salivar produzindo alterações na lubrificação salivar através da formação de precipitados que reduzem a viscosidade ou aumentam o atrito no tecido oral; 2) interagem com células epiteliais orais e película da mucosa; 3) polifenóis interagem com as mucinas salivares; 4) polifenóis interagem diretamente com as células do epitélio oral ou mecanorreceptores. Adaptado de González-Muñoz et al., (2021).

4. Modulação das propriedades do sabor

O sabor é, de facto, um dos fatores cruciais para a aceitação de um produto por parte do consumidor, o que é um problema quando os produtos apresentam níveis elevados de adstringência. A nível alimentar, define-se como adstringente as frutas que ainda se encontram “verdes”, sendo algo considerado desagradável para o consumidor. No entanto, a adstringência pode ser considerada um parâmetro de qualidade, como no caso do vinho tinto, cerveja e café. Contudo, é necessário moderar e equilibrar os níveis de adstringência dos produtos, pois quando se encontram elevados, pode levar à rejeição por parte dos consumidores.

Durante o processamento de alimentos e bebidas, os taninos podem interagir com as proteínas dos alimentos em diferentes estágios da cadeia alimentar e, devido a essas interações podem ocorrer fenómenos físico-químicos que influenciam as propriedades nutricionais, tecnológicas e organoléticas dos alimentos (Susana Soares, Brandão, et al., 2020). Por exemplo, a ocorrência de precipitação/turvação de garrafas é um problema comum em algumas bebidas, tais como sumos, cerveja e vinho, pois pode levar à rejeição do produto por parte dos consumidores. A turvação (formação de agregados) pode ocorrer por vários motivos, sendo a interação entre polifenóis e proteínas a mais comum (Siebert, 2009).

De forma a evitar ou retardar a formação de agregados, as indústrias de vinhos e sumos utilizam métodos de colagem e clarificação, em que o principal mecanismo é a interação tanino-proteína. Nestes processos, diversas proteínas são utilizadas, sendo as mais comuns, a caseína, a gelatina e a ovoalbumina (Siebert et al., 1996; Siebert, 1999). No entanto, existe um crescente interesse em utilizar proteínas de origem vegetal como agentes de clarificação, como alternativa à proteína animal, como é o caso da proteína de ervilha e extrato proteico de levedura.

Estes processos de colagem e clarificação são utilizados principalmente para estabilizar a bebida final através da remoção de taninos altamente reativos, mas também, para diminuir os níveis elevados de adstringência, a fim de modular as propriedades do sabor do produto final. No entanto, estes processos acarretam a perda de uma grande quantidade de polifenóis, o que também pode significar a perda dos potenciais benefícios para a saúde associados a estes compostos. Além disso, a utilização de colas pode também trazer problemas a nível de alergias alimentares. A adição de grandes quantidades de açúcares ou utilização de adoçantes são também métodos utilizados para equilibrar a sensação de adstringência nos produtos. Contudo,

estes métodos podem provocar problemas a nível nutricional, assim como outros problemas para a saúde.

Assim, o grande desafio é desenvolver estratégias naturais, económicas e sustentáveis para modular a adstringência, utilizando compostos de interesse extraídos de fontes naturais (e.g. algas marinhas) ou subprodutos (e.g. cascas e sementes de frutos e legumes), de forma a garantir quantidades consideráveis de compostos bioativos e os seus potenciais benefícios para a saúde.

Por este motivo, os polissacáridos, que são também compostos bioativos, têm vindo a ser cada vez mais estudados, surgindo como uma alternativa útil e viável para modular a adstringência, pois são capazes de inibir as interações entre polifenóis e proteínas e, em alguns casos, evitar a perda de compostos bioativos como os polifenóis e até acrescentar outros benefícios ao produto final (e.g. atividade pré-biótica) (Susana Soares et al., 2017).

4.1 Polissacáridos

Os polissacáridos podem ser definidos como hidratos de carbono compostos por uma grande quantidade de monossacáridos unidos entre si através de ligações glicosídicas. São polímeros naturais que podem ser encontrados em animais, plantas e fungos, sendo que podem atuar como fonte de atividades biológicas, como por exemplo no armazenamento de energia, sendo nas plantas, a reserva energética desempenhada pelo amido, enquanto nos animais, pelo glicogénio. Os polissacáridos também atuam como componentes estruturais, conferindo estabilidade às paredes celulares.

A nível estrutural, os polissacáridos diferem entre si não apenas na composição de monossacáridos, mas também na natureza da cadeia, seja ela linear ou ramificada, no peso molecular e no tipo de ligação glicosídica (Noreen et al., 2017).

Os polissacáridos pécticos estão presentes em grandes quantidades nos frutos e formam o grupo mais complexo de compostos constituintes da parede celular primária e lamela média. Estes compostos apresentam diferentes propriedades físicas, nutricionais e funcionais que vão sofrendo alteração durante o processo de crescimento e amadurecimento dos frutos. Este tipo de compostos apresentam a capacidade de formar um gel constituído por cadeias de ácido poligalacturónico, ligadas por pontes de cálcio (Ca^{2+}), que formam as designadas “zonas de junção” entre cadeias anti-paralelas, originando uma estrutura conhecida por “egg-box”. A extração de polissacáridos ligados por pontes de cálcio é, geralmente, realizada com água quente ou com soluções de agentes quelantes, tais como oxalato e, mais recentemente, solução de imidazole. Os

restantes polissacáridos pécticos podem ser extraídos com soluções alcalinas diluídas de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Fernandes, 2008).

Nos últimos anos, os polissacáridos pécticos, pectinas em particular, têm sido alvo de estudos pela sua diversidade de aplicações na indústria alimentar, devido às suas propriedades gelificantes, estabilizantes, espessantes e toxicidade relativamente baixa, desempenhando a função de aditivo alimentar, em produtos como compotas, bebidas lácteas e gelados. As matérias-primas mais tradicionais utilizadas para a extração de pectinas são as cascas de frutos cítricos, que contêm quantidades significativas de polissacáridos pécticos, mas com características químicas diferentes, que os tornam adequados para aplicações específicas (Minzanova et al., 2018).

A pectina é uma família muito complexa de polissacáridos presentes sobretudo na lamela média e parede celular primária das plantas, sendo considerada um heteropolissacárido, pela sua diversidade estrutural, uma vez que por hidrólise, origina mais do que um tipo de monossacárido e também pela sua ampla gama de pesos moleculares. A pectina pode ser composta por 17 monossacáridos diferentes com mais de 20 ligações diferentes, que formam os polissacáridos constituintes da pectina: homogalacturonanas (HGs), xilogalacturonanas, ramnogalacturonanas (RGs) (I e II), arabinanas e arabinogalactanas (I e II) (Vincken et al., 2003; Voragen et al., 2009).

Estruturalmente, as pectinas apresentam “*smooth and hairy regions*”. As “*smooth regions*”, também conhecidas como HGs, consistem numa longa cadeia de resíduos de ácido α -D-galacturónico unidos entre si, através de ligações glicosídicas α (1→4). Alguns dos grupos carboxilo podem ser metil-esterificados e acetil-esterificados, consoante a espécie vegetal. O grau de esterificação ou o número de grupos metil (ou metoxi) que estão a substituir o ácido carboxílico (COOH) nos resíduos de ácido galacturónico é, algumas vezes, usado para classificar os diferentes tipos de pectina, uma vez que influenciam fortemente as suas propriedades físico-químicas, assim como a hidrofobicidade. Sendo assim, as unidades lineares de HGs que apresentam mais de 50% dos ácidos galacturónicos esterificados com grupos metil designam-se por HGs com elevado grau de metil-esterificação, caso contrário, designam-se por HGs com baixo grau de metil-esterificação. Polímeros que apresentam ausência de acetilação e metil-esterificação, designam-se por pectatos.

As “*hairy regions*”, também conhecidas como RGs podem ser de dois tipos (I e II). A RG I possui uma estrutura mais complexa que as HGs, sendo formada pelo dissacárido repetitivo $\rightarrow 4$)- α -D-ácido galacturónico-(1→2)- α -L-ramnose-(1→, com os resíduos de ramnose das frações de RG parcialmente esterificados por cadeias laterais de açúcares neutros, compostas principalmente por arabinose e galactose. A RG II é uma estrutura

menor e, como as HGs, possui uma cadeia de resíduos de D-ácido galacturónico α (1 $\rightarrow$ 4), com cadeias laterais contendo ramnose, arabinose e uma variedade de monossacáridos menos comuns, como por exemplo fucose, apiose, entre outros (Pérez et al., 2003; Fernandes, 2008; Voragen et al., 2009; Watrelot et al., 2013; Noreen et al., 2017). A figura 15 mostra um esquema representativo simplificado dos principais constituintes da pectina.

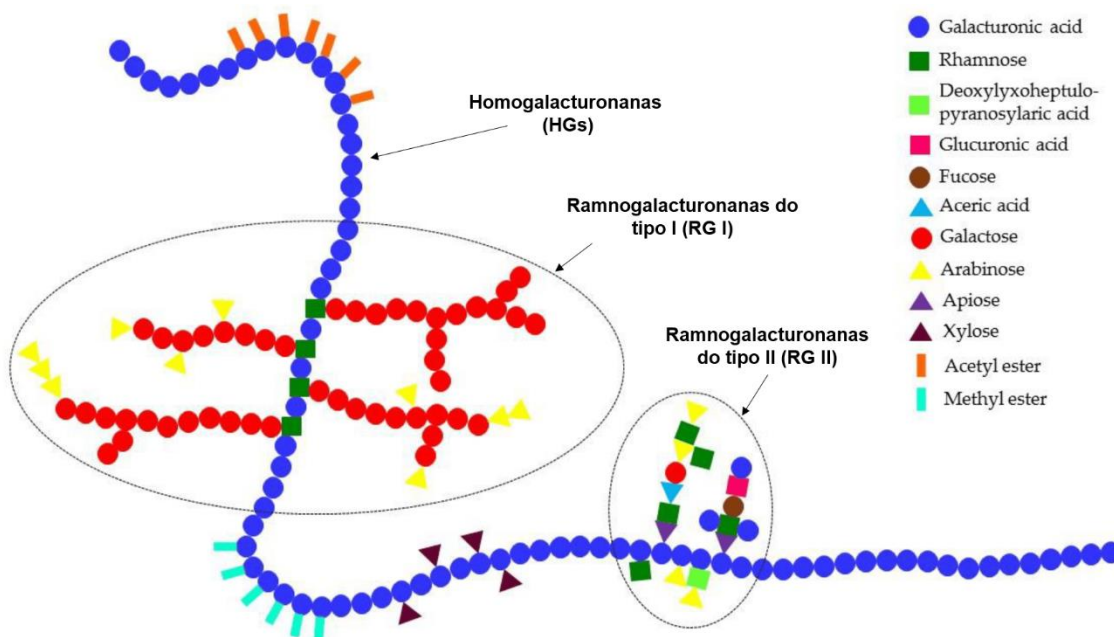


Figura 15 - Esquema simplificado da estrutura primária das pectinas. Adaptado de Minzanova et al., 2018.

Embora as estruturas de cada um destes constituintes sejam conhecidas, não se sabe exatamente como se organizam numa estrutura macromolecular. A composição da pectina depende da fonte de onde foi extraída, das condições de extração, entre outros fatores (Pérez et al., 2000).

Como referido anteriormente, os polissacáridos têm vindo a ser cada vez mais estudados, surgindo como uma alternativa útil e viável para modular a adstringência dos produtos, sendo este tema abordado na secção seguinte.

4.2 Efeito dos polissacáridos na adstringência

Atualmente, o grande desafio é desenvolver estratégias para modular o sabor dos produtos, ao mesmo tempo que se preservam os potenciais benefícios para a saúde associados aos polifenóis. Para além disso, existe cada vez mais a necessidade de reduzir desperdícios alimentares, valorizando-os economicamente. Por exemplo a indústria do processamento de vegetais e frutas gera uma grande quantidade de resíduos (e.g. cascas e sementes), que são muito ricos em compostos de interesse, como os polissacáridos. Na indústria alimentar, os polissacáridos são muito utilizados como coloides alimentares (gomas) e também estão presentes naturalmente em muitos produtos alimentares (Susana Soares et al., 2017). De facto, a incorporação de polissacáridos em alimentos pode modificar a perceção de textura e sabor, o que consequentemente pode determinar a sua aceitação (Pires et al., 2020).

A presença de polissacáridos pode inibir ou reduzir as interações entre PS e polifenóis, pois ao competir com as PS, reduzem a precipitação destas PS, levando a uma diminuição na sensação da adstringência (Pires et al., 2020). Estudos revelam que alguns polissacáridos neutros e aniónicos, como a pectina, a goma arábica, carragenana, xantana e gelana, demonstraram ser capazes de inibir esta interação (Mateus et al., 2004; De Freitas et al., 2003).

Esta inibição pode ser compreendida através do amadurecimento dos frutos, em que existe uma diminuição da sensação de adstringência (Mcrae & Kennedy, 2011). A fruta madura tende a ser menos adstringente que a fruta verde porque apresenta maior teor de polissacáridos, devido à degradação enzimática dos polissacáridos estruturais da parede celular (pectinas, hemiceluloses). Além disso, o amadurecimento dos frutos é acompanhado por uma alteração da textura, os frutos tornam-se moles e mais macios, ocorrendo uma diminuição de adesão celular, proveniente da degradação da lamela média. Portanto, a degradação de polissacáridos, torna a parede celular mais frágil, de maneira a que os tecidos dos frutos percam a sua firmeza e integridade, como representado na figura 16 (Cheng et al., 2009).

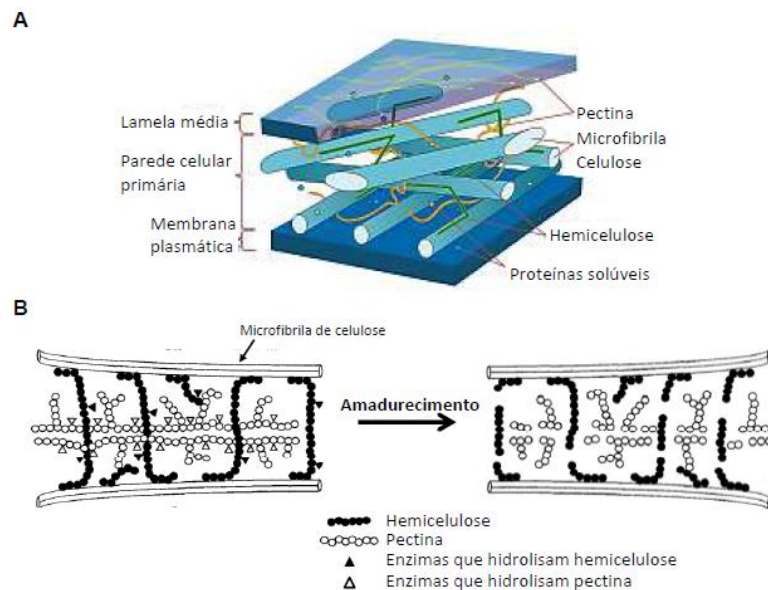


Figura 16 - Representação esquemática da (A) estrutura da parede celular primária evidenciando os polissacáridos mais importantes e a lamela média, e da (B) degradação da pectina e da hemicelulose durante o amadurecimento dos frutos. Adaptado de Wakabayashi et al., (2000).

As paredes celulares das frutas apresentam quantidades relativas de polissacáridos, dependendo do tipo, comprimento e ramificação, estes vão ter influência na estrutura das paredes e na textura do fruto. Normalmente, os frutos contêm uma grande quantidade de polissacáridos pécnicos, sendo os principais constituintes da lamela média, facilitando a adesão celular e empacotamento celular. A hemicelulose e a celulose também são importantes a nível estrutural, pois influenciam a textura do fruto (De Freitas et al., 2003; Nunes et al., 2008).

Uma das hipóteses para explicar a diminuição da adstringência baseia-se na capacidade dos polissacáridos se libertarem da parede celular e interagirem com as PS e/ou com os polifenóis através de mecanismos de inibição, que vão ser abordados de seguida (De Freitas et al., 2003).

4.2.1 Mecanismos de inibição/redução dos polissacáridos na interação entre polifenóis e proteínas salivares

A interação entre polifenóis e PS, pode ser influenciada pela presença de polissacáridos, vários estudos demonstraram que estes têm a capacidade de inibir ou reduzir a interação/precipitação de proteínas com polifenóis, levando a uma diminuição na sensação da adstringência.

Para explicar este fenómeno de inibição, foram propostos dois mecanismos, o mecanismo ternário proteína-polifenol-polissacárido e o mecanismo de competição (Figura 17).

O mecanismo ternário baseia-se na complexação entre a proteína, o polifenol e o polissacárido, devido aos grupos carregados que os polissacáridos apresentam por serem polieléctrolitos, é formado por isso um agregado proteína-polifenol que aumenta a solubilidade em meio aquoso (Carvalho et al., 2006). Já o mecanismo de competição sugere que haja uma associação molecular, ou seja, os polissacáridos podem encapsular os polifenóis, interrompendo a ligação destes às proteínas, gerando uma competição entre eles, no qual os polissacáridos competem com as PS pela ligação ao polifenol. Além disso, foi proposta a hipótese de que alguns polissacáridos apresentam capacidade de desenvolver uma estrutura secundária em solução, formando complexos hidrofóbicos capazes de encapsular os polifenóis (De Freitas et al., 2003).

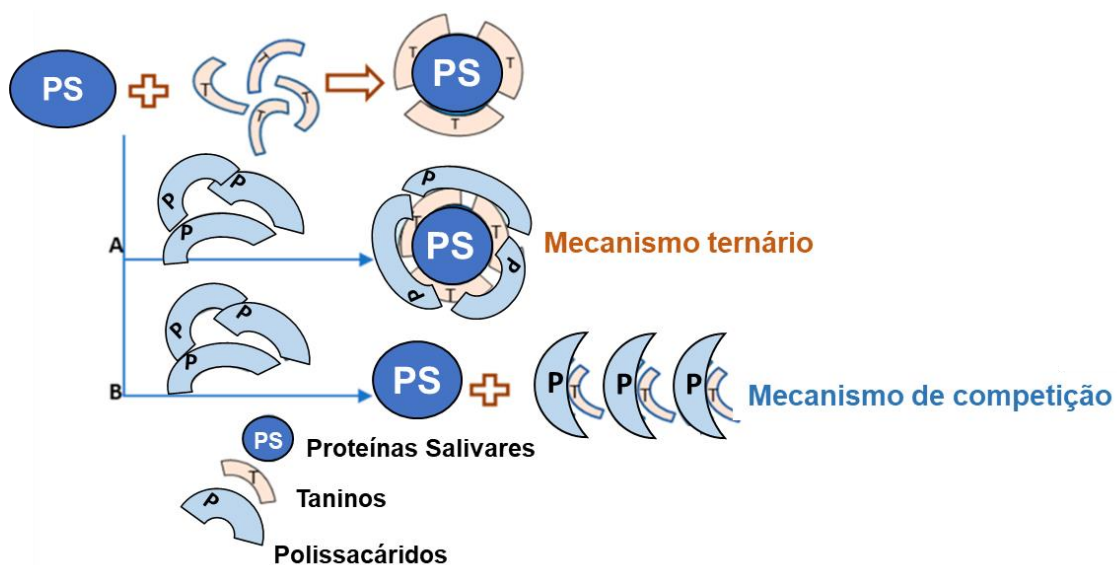


Figura 17 - Possíveis mecanismos (A): mecanismo ternário e (B): mecanismo de competição envolvidos PS: proteínas salivares, T: taninos, P: polissacáridos. Adaptado de Mateus et al., (2004).

Estes mecanismos de inibição dependem essencialmente do tamanho e estrutura dos taninos e dos polissacáridos, sendo a RG II e as manoproteínas, as moléculas mais utilizadas para a redução do efeito de adstringência (Le Bourvellec et al., 2005). Tal facto, foi comprovado por (Brandão et al., 2019) em que a RG II foi o polissacárido mais eficiente na inibição da ligação entre PRPs e taninos (punicalagina e procianidina B2), relativamente a outros polissacáridos estudados, como as proteínas arabinogalactanas.

4.2.2 Fontes de polissacáridos: o exemplo das cascas de frutos

As cascas de frutos são subprodutos que constituem cerca de 40% a 50% da massa total da fruta e, geralmente, são considerados um desperdício na indústria alimentar. No entanto, é possível extrair diferentes compostos bioativos, como é o caso dos polissacáridos pécticos.

A laranja é uma das frutas mais consumidas em todo o mundo, é amplamente cultivada em países tropicais e subtropicais e pertence à família *Rutaceae*, sendo muito rica em minerais, vitamina C e polifenóis, que contribuem para a atividade antioxidante (White et al., 2007). As laranjas podem ser consumidas frescas, embora em todo o mundo 1/3 da fruta seja consumida após processamento, especialmente na produção de sumo de laranja. A indústria de frutas cítricas produz uma quantidade considerável de resíduos ou subprodutos, tais como cascas, sementes e polpas, que representam 50% da massa total do fruto. O principal destino destes resíduos é a alimentação para gado, compostagem e incineração ou aterro, apesar de representar um grande problema para a saúde humana e saúde ambiental, por conter grande quantidade de água, açúcares livres, sais e proteínas, sendo fácil a sua fermentação.

Contudo, as cascas de laranja são ricas em polissacáridos pécticos, tais como celulose (18%-20%), hemiceluloses (14%-16%), pectina (20%-22%) e lenhina (5%-7%), sendo também abundante em açúcares livres, nomeadamente glucose, frutose e sacarose, óleos essenciais e proteínas. Por este motivo, a composição da casca de laranja mostra um grande potencial de valorização desde a estratégia de biorrefinaria, recuperação de bioetanol, produtos químicos, polímeros e recuperação de polissacáridos (de la Torre et al., 2019).

Assim, neste trabalho, as cascas de laranja foram utilizadas como fonte de polissacáridos, devido ao facto de serem subprodutos que apresentam grande quantidade destes compostos. Além disso, o uso destas cascas para extrair compostos de interesse, permite reduzir a quantidade de desperdícios alimentares assim como, valorizá-los economicamente.

Desta forma, a utilização de polissacáridos provenientes de diferentes fontes e subprodutos pode ser uma alternativa economicamente sustentável e muito valiosa para a indústria alimentar, uma vez que pode ser possível modular as propriedades do sabor dos alimentos, mantendo os níveis de polifenóis e os seus potenciais benefícios associados, ao mesmo tempo que se pode aumentar a quantidade de compostos bioativos, como os polissacáridos. Deste modo, poder-se-á obter um produto final mais enriquecido e com maior aceitabilidade por parte do consumidor.

II. Material e Métodos

II. Material e Métodos

1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de qualidade analítica ou superior. Acetato de etilo, do Carlo Erba; Acetona, Ácido Acético, Ácido Fórmico, Hidróxido de Sódio e Metanol, todos da ChemLab; Ácido Clorídrico da Fluka; Ácido Gálico, Ácido Trifluoroacético (TFA), Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA), Borohidreto de sódio, (+)-Catequina hidratada, D-(+)-Glucose, Dimetilsulfóxido (DMSO), 4-Dimetilaminocinamaldeído (DMACA), (-)-Epicatequina, Fenol, Imidazole, meio de cultura celular com alto teor de glucose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM), Mucina de estômago de suíno tipo II, reagente de Folin-Ciocalteu, solução de alanina e glutamina (Ala-Gln) a 1% (200 mM), solução de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B), tampão Hanks', Vermelho neutro, todos da Sigma-Aldrich; Ácido Tricloroacético, Carbonato de Sódio, da Panreac; Etanol, da AGA; EDTA-Tripsina 0,25%, da Gibco; EGCG, da Biopurify; Acetonitrilo (ACN), Ácido sulfúrico, Clorofórmio, Éter etílico, da Honeywell; tampão com fosfato (*Phosphate buffered saline*, PBS), Kit de BCA para quantificar proteínas, da Thermo Fisher Scientific; Soro fetal bovino (*Fetal bovine serum*, FBS), da Biowest; tampão com fosfato (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, DPBS), da PAN-Biotech, mistura de procianidinas (Vitisol®), da Berkem.

2. Recolha, tratamento e análise da saliva

2.1 Recolha e tratamento de saliva

A saliva foi recolhida de voluntários saudáveis e não fumadores do género feminino e masculino, com idades compreendidas entre os 22 e os 40 anos. Todos os dadores foram instruídos a permanecer 1 hora sem ingestão de alimentos ou bebidas e aproximadamente 10 minutos antes da recolha, acumular saliva, recolher num falcon e colocar imediatamente em gelo.

A recolha foi efetuada às 14 horas, de forma a reduzir a variabilidade da concentração das PS referentes às flutuações dos ritmos circadianos.

A saliva foi tratada com ácido trifluoroacético (TFA, concentração final de 0,1%) e de seguida foi centrifugada por 5 minutos a 11500 rpm e o sobrenadante foi separado do precipitado.

Os sobrenadantes dos diferentes voluntários foram misturados de modo a obter uma *pool* representativa da saliva humana. De seguida, a saliva foi aliquoteada, congelada e concentrada (liofilização), até pelo menos 1/3 do volume total, durante aproximadamente 6 a 7 horas. Por fim, a saliva concentrada foi armazenada a -80 °C para ser usada nos futuros ensaios.

2.2 Caracterização e análise da saliva

Alguns parâmetros físico-químicos da saliva foram analisados, tais como a concentração de proteínas totais, o perfil de PS, pH e força iónica.

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método do ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, 2020). Este método consiste na utilização de um sal de cobre (Cu^{2+}) que pode ser reduzido ao estado cuproso (Cu^+) por proteínas. O ião Cu^+ ao reagir com o ácido bicinconínico forma um complexo intensamente colorido com uma banda de absorção muito forte centrada em 562 nm. A intensidade deste complexo azul é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

Desta forma, foi preparada uma reta de calibração, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As soluções padrão de BSA foram preparadas em água milli-Q, com concentrações entre 0,0 - 1,5 mg/mL, em triplicado. Numa microplaca de 96 poços foi colocado 25 uL de solução padrão/amostra e, posteriormente, foi adicionado 200 uL de *working reagent* (mistura de Reagente A com Reagente B numa proporção de (A: B ,50:1) e incubado durante 30 minutos, a 37°C. Logo a seguir, a microplaca arrefeceu à temperatura ambiente e a absorvância de todas as amostras foi medida a 562 nm num leitor de placas (PowerWave XS, BioTek Instruments). A concentração total de proteínas foi calculada através de uma regressão linear Absorvância vs Concentração de proteína padrão, expressa em mg equivalentes de BSA por mL de amostra.

O perfil cromatográfico da saliva foi também analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), 90 µL de saliva acídica foram imediatamente analisados num sistema HPLC Jasco LC-4000, equipado com uma coluna Vydac C8 (Grace Davison Discovery Sciences), com diâmetro de partícula de 5 µm (dimensões da coluna 150 × 2,1 mm), a deteção foi realizada entre 214 a 280 nm, usando um detetor de arranjos diodos (M-4010). Os eluentes foram 0,2 % TFA em água (solvente A) e 0,2 % TFA em ACN/água 80:20 (v/v) (solvente B). O gradiente linear aplicado foi 10 a 17% (eluente B),

durante 10 min, 17 a 27% (eluente B), durante 20 min, 27 a 31% (eluente B), durante 3 min, 31 a 50% (eluente B), durante 17 min, 50 a 70% (eluente B), durante 19 min, 70 a 100% (eluente B), durante 11 min e 100 a 10% (eluente B), durante 11 min, a uma taxa de fluxo 0,3 mL min⁻¹. Após este programa, a coluna foi lavada com 100% do eluente B. Após a lavagem, a coluna foi estabilizada nas condições iniciais.

Por fim, o pH da saliva foi avaliado através de um medidor de pH (Mettler Toledo) e a força iónica foi avaliada através de um condutímetro (WTM Inolab 740).

3. Extração, purificação e caracterização de polifenóis

Neste trabalho foram usados três extratos ricos em polifenóis, dois representativos de bebidas ricas em polifenóis, mundialmente consumidas e conhecidas por serem muito adstringentes, como é o caso do chá preto e vinho tinto e um extrato comercial de grainha de uva (*Grape seed extract*, GSE). Contrariamente ao extrato de grainha de uva, o extrato de chá preto (*Black tea extract*, BTE) e o extrato de vinho tinto (*Red wine extract*, RWE) foram obtidos através de diferentes processos de extração que vão ser abordados de seguida.

3.1 Obtenção de extratos ricos em polifenóis

3.1.1 Chá preto

A extração e a purificação de polifenóis do chá preto foi adaptada de (Susana Soares, Soares, et al., 2020).

A extração dos polifenóis do chá preto foi dividida em várias etapas: extração hidroalcoólica, extração líquido-líquido e purificação através de gel C18.

1- Extração hidroalcoólica

O extrato de chá preto (*Black tea extract*, BTE) foi obtido a partir de 20 gramas de folhas secas de chá preto de *Camellia sinensis* do Sri Lanka. As folhas foram trituradas a pó e a extração foi realizada três vezes com 500 mL de etanol 80% (v/v) durante 1 hora, à temperatura ambiente e sob atmosfera de argon (Figura 18).

Entre as extrações, as misturas foram centrifugadas a 14000 rpm, durante 20 minutos a 4°C e os sobrenadantes resultantes foram combinados. O solvente orgânico foi

removido através de um evaporador rotativo sob pressão reduzida, resultando num resíduo castanho escuro denso.



Figura 18 - Extração hidroalcoólica do chá preto.

2- Extração Líquido-Líquido

O resíduo foi extraído cinco vezes com igual volume de clorofórmio (rácio 1:1) para remover metilxantinas e clorofilas (Figura 19. A) e, posteriormente, extraído cinco vezes com acetato de etilo na mesma proporção de solução aquosa, para extrair flavonóides (Figura 19. B). A parte orgânica foi retida e evaporada, usando um evaporador rotativo sob pressão reduzida.

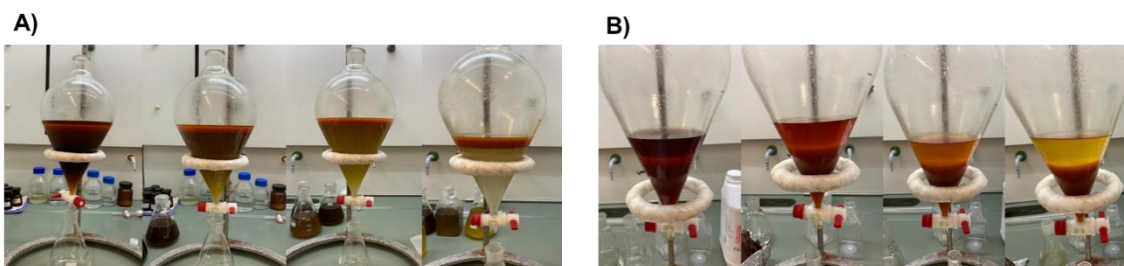


Figura 19 - Extrações Líquido-Líquido: A) para remover metilxantinas e clorofilas, B) para extrair flavonóides.

3- Purificação por C18 do extrato obtido

Após evaporação do acetato de etilo, o resíduo foi purificado usando o gel C18 (Figura 20). Este gel foi acondicionado com metanol e passado por água, de forma a evitar que a amostra fosse imediatamente eluída. Depois de passar a amostra, intercalada com água, a fração fenólica foi recuperada com metanol. Mais tarde, o solvente orgânico foi evaporado e o BTE foi congelado e liofilizado.



Figura 20 - Purificação por gel C18 do extrato obtido.

3.1.2 Vinho tinto

A extração de polifenóis do vinho tinto foi dividida em quatro etapas. Em primeiro lugar, o etanol foi totalmente evaporado através de um evaporador rotativo sob pressão reduzida. Posteriormente, o vinho foi diluído a metade com uma solução de ácido tricloroacético (25% p/v) em acetona e distribuído por falcons de 15 mL. Os falcons foram colocados durante 45 minutos, a -20°C e centrifugados durante 10 minutos, a 13500 rpm, a 4°C . Os sobrenadantes combinaram-se e a mistura foi aplicada em gel C18 para remover os açúcares (Figura 21). Este gel foi acondicionado com metanol e passado por água, de forma a evitar que a amostra fosse imediatamente eluída. A amostra foi diluída com água para que a percentagem de acetona fosse menor que 5%. Depois de passar a amostra, intercalada com água, a fração fenólica foi recuperada com metanol.



Figura 21 – Purificação por gel C18 para remover açúcares do vinho tinto.

Mais tarde, o solvente orgânico foi evaporado e foi realizada uma extração líquido-líquido com clorofórmio numa proporção de 1:1 para remover os lípidos (Figura 22). Por fim, o RWE foi congelado e liofilizado.



Figura 22 - Extração líquido-líquido com clorofórmio para remover os lípidos do vinho tinto.

3.2 Caracterização dos extratos de polifenóis

3.2.1 Análise por espectrometria de massa

Antes da análise por espectrometria de massa, os diferentes extratos de polifenóis foram analisados por HPLC (Vanquish, Thermo Scientific), equipado com uma coluna Agilent Poroshell 120 EC-C18, (250 x 4,6 mm de diâmetro interno, 2,7 μm) e um detetor DAD.

Para a análise do GSE, os eluentes foram 0,5% ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% ácido fórmico em ACN (solvente B) e o gradiente linear aplicado foi 0 a 10% eluente B, durante 3 min, 10 a 16% eluente B, durante 34 min, 16 a 20% eluente B, durante 3 min, 20 a 40% eluente B, durante 15 min, 40 a 100% eluente B, durante 15 min e 100 a 0% eluente B, durante 10 min, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Na análise do BTE, os eluentes foram 0,1% ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% ácido fórmico em ACN (solvente B) e o gradiente linear usado foi 10 a 28% eluente B, durante 50 min, 28 a 100% eluente B, durante 9 min e 100 a 10% eluente B, durante 11 min, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Para analisar o RWE, os eluentes foram 1% ácido acético em água (solvente A) e 1% ácido acético/20% ACN em água (solvente B) e o gradiente linear utilizado foi 25 a 100% eluente B, durante 100 min e 100 a 25% eluente B, durante 12 min, a uma taxa de fluxo de 0,3 mL min⁻¹. A deteção dos três extratos foi realizada a 280 nm.

O espectrofotómetro de massa (LQT XL, Thermo scientific) foi conectado ao sistema HPLC-DAD para identificar os compostos presentes nos extratos. O detetor de massa foi um *Linear Ion Trap* equipado com uma fonte de ionização à pressão atmosférica (API), usando uma interface de ionização por eletrospray (ESI). O vaporizador e as tensões capilares foram de 3,2 kV e 10 V, respetivamente. A temperatura capilar foi fixada em 300°C. O azoto foi usado como gás de bainha e auxiliar em vazões de 40 e 15, respetivamente (em unidades arbitrárias). Os espectros foram registados no modo de ião negativo entre m/z 110 e 2000 para o GSE e BTE e entre m/z 50 e 2000 para o RWE.

Os compostos foram identificados com base nos dados do espectro de massa, comparação com a literatura e a utilização de padrões.

3.2.2 Doseamento de polifenóis totais

Os polifenóis totais dos extratos foram determinados pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por (Arnous et al., 2001) e adaptado de (Azevedo et al., 2020).

Este ensaio utiliza o reagente Folin-Ciocalteu que é constituído pelos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, nos quais o tungstênio e o molibdênio possuem estado de oxidação 6+, apresentando cor amarela. Quando estes ácidos entram em contato com agentes redutores, como é o caso dos polifenóis, em pH alcalino, ocorre a formação do molibdênio azul e tungstênio azul, um estado de oxidação entre 5 e 6. Assim, através da mudança de cor é possível determinar a concentração de polifenóis (Ciocalteu et al., 2020).

Foram preparadas três curvas de calibração, uma utilizando ácido gálico como padrão para determinar a concentração dos polifenóis presentes no GSE, BTE e RWE, outra utilizando catequina como padrão para determinar a concentração dos polifenóis presentes no GSE e uma outra utilizando EGCG para determinar a concentração dos polifenóis presentes no BTE. As soluções padrão foram preparadas em água Milli-Q, em triplicado, com concentrações entre 0,0 –1500 µg/mL, 0,0-1600 µg/mL e 0,0-1000 µg/mL, respetivamente. Em eppendorfs de 2 mL, foram misturados 15 µL de solução padrão/ amostra, 75 µL de reagente Folin–Ciocalteu e 500 µL de água Milli-Q e agitados em vortex. Logo a seguir, 300 µL de Na₂CO₃ aquoso 2% e 610 µL de água Milli-Q foram adicionados aos tubos, sendo estes agitados novamente em vortex e deixados em repouso durante 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Após os 30 minutos, 350 µL de cada amostra foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A absorvância de cada poço foi medida a 750 nm num leitor de placas (PowerWave XS, BioTek Instruments).

A concentração total de polifenóis foi calculada através de uma regressão linear Absorvância vs Concentração de polifenol padrão, expressa em µg equivalentes de padrão por mg de extrato.

3.2.3 Doseamento de açúcares

Os açúcares presentes nos extratos foram determinados pelo método de Dubois (método do ácido fenol-sulfúrico), que foi adaptado para determinação em microplaca a partir da literatura (Kondo et al., 2021).

Foi preparada uma curva de calibração, usando glucose como padrão. As soluções padrão foram preparadas em água Milli-Q, em triplicado, com concentrações entre 0,0 -

0,2 mg/mL. Em eppendorfs de 2 mL, foram misturados 50 µL de solução padrão/amostra e 150 µL de H₂SO₄ concentrado e agitados em vortex. Logo a seguir, foi adicionado 30 µL de solução de fenol a 50 mg/mL e a solução foi agitada novamente em vortex. As amostras foram incubadas num termobloco, a 98°C, durante 30 minutos.

Após incubação, as amostras arrefeceram à temperatura ambiente e 200 uL de cada amostra foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A absorvância de cada poço foi medida a 490 nm num leitor de placas (PowerWave XS, BioTek Instruments). A concentração de açúcares foi calculada através de uma regressão linear Absorvância vs Concentração de glucose, expressa em µg equivalentes de glucose por mg de extrato.

4. Extração, purificação e caracterização dos polissacáridos

4.1 Extração e purificação dos polissacáridos pécticos da casca de laranja

A extração sequencial dos polissacáridos da casca da laranja, foi adaptada a partir de métodos descritos na literatura (Mafra et al., 2001; Nunes et al., 2008).

A extração dos polissacáridos pécticos da casca de laranja foi dividida em quatro etapas: obtenção do resíduo insolúvel em álcool (*alcohol insoluble residue*, AIR), extração sequencial com água, extração sequencial com imidazole (agente quelante) 0,5 M / HCl pH=7 e extração sequencial com carbonato de sódio (Na₂CO₃) 50 mM e borohidreto de sódio (NaBH₄) 20 mM.

1- Obtenção do resíduo insolúvel em álcool (AIR)

Foram pesadas 35 gramas de cascas de laranja liofilizadas e trituradas para um balão de 500 mL, com 190 mL de etanol 85 % em água destilada. A solução foi mantida em agitação, durante 20 min a ferver, a 89°C, em banho de silicone. Para evitar que o etanol evaporasse, o aquecimento foi realizado em refluxo e ligado a um condensador. De seguida, a mistura foi arrefecida (≈15 min) e filtrada sob vácuo com um funil de Buchner G3 e um filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C). Este processo repetiu-se 2 vezes.

A terceira extração foi realizada com etanol 85%, mas sem aquecimento. O resíduo foi lavado com 100 mL de éter etílico, filtrado e recolhido numa placa de petri e deixado a secar na hotte durante a noite à temperatura ambiente (Figura 23).



Figura 23 - Resíduo insolúvel em álcool (AIR).

2- Extração sequencial com água

O AIR que se obteve foi extraído com água destilada (1,90 L) em agitação, durante 16 h, a 4°C numa câmara fria. Após 16 h, a mistura foi filtrada sob vácuo com um filtro de fibra de vidro e o AIR foi novamente extraído com água (1,5 L), durante 6 h, à temperatura ambiente e filtrado a vácuo, para lavagem do material vegetal. Os sobrenadantes relativos às duas extrações não se misturaram. O sobrenadante da extração de 16h foi dialisado.

3- Extração sequencial com imidazole 0,5 M / HCl, pH=7

O AIR foi extraído com uma solução de imidazole 0,5 M, a pH 7, ajustado com ácido clorídrico (HCl) (2 L) durante 16 h, à temperatura ambiente e por fim filtrado sob vácuo com um filtro de fibra de vidro. O resíduo resultante foi novamente extraído com a solução de imidazole (2 L) durante 2 horas, à temperatura ambiente e filtrado sob vácuo. Os sobrenadantes relativos às duas extrações foram misturados e dialisados.

4- Extração sequencial com carbonato de sódio 50 mM e borohidreto de sódio 20 mM

O AIR foi extraído com uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 50 mM com borohidreto de sódio (NaBH_4) 20 mM (2 L) durante 16 h a 4°C e filtrado sob vácuo. Seguiu-se uma nova extração com a mesma solução (2 L) durante 2h, à temperatura ambiente e filtrado sob vácuo. Os dois sobrenadantes referentes às duas extrações não se misturaram e foram neutralizados com ácido acético glacial para pH 5-6, antes da diálise.

Após realizadas as extrações referidas anteriormente, os sobrenadantes foram evaporados de forma a concentrá-los antes da diálise.

Todos os sobrenadantes foram dialisados com membranas de celulose (SpectraPor, 6-8 kDa) com água desionizada, durante aproximadamente 72 h, em agitação e com trocas de água constantes. No primeiro dia, de 2h em 2h, no segundo dia, 3 vezes ao dia e no último, 2 vezes ao dia. Após a diálise, as frações foram congeladas e liofilizadas e o seu rendimento foi determinado com base na massa de AIR.

4.2 Caracterização dos polissacáridos pécticos da casca de laranja

A caracterização das frações dos polissacáridos pécticos foi realizada a partir dos métodos descritos por (Nunes et al., 2008).

A análise de açúcares foi realizada a partir de uma hidrólise em ácido sulfúrico (H_2SO_4), em que os monossacáridos foram libertados através de uma pré-hidrólise das amostras em 200 μL de H_2SO_4 (72 %), durante 3 h à temperatura ambiente. Depois, a mistura foi submetida a uma hidrólise de 2,5 h, numa solução de H_2SO_4 1 M, a 100 °C.

A composição dos açúcares neutros foi determinada por cromatografia gasosa (GC) após a sua conversão nos respetivos acetatos de alditol, utilizando a 2-desoxiglicose como padrão interno. Os resultados foram expressos em mol %.

Os ácidos urónicos foram determinados a partir de uma versão modificada do método colorimétrico do 3-fenilfenol (Coimbra et al., 1994). As amostras foram tratadas com 200 μL de H_2SO_4 (72 %) durante 3 h à temperatura ambiente, seguidas de 1 h em H_2SO_4 1 M, a 100 °C. O ácido d-galacturónico foi utilizado para elaborar uma curva de calibração. A hidrólise de todas as amostras foi efetuada em duplicado e cada uma foi analisada duas vezes. O teor de ácidos urónicos foi expresso em mol%.

O grau de acetilação e metil-esterificação dos polissacáridos pécticos foi calculado com base na quantidade de metanol libertado após saponificação e quantificado por GC com um detetor de ionização de chama (GC-FID) e 1-propanol como padrão interno (Waldron & Selvendran, 1990; Nunes et al., 2006).

O peso molecular dos diferentes polissacáridos foi calculado por cromatografia de permeação em gel/cromatografia de exclusão de tamanho (GPC/SEC). Para realizar a análise, foi utilizado um sistema integrado composto por três módulos: OMNISEC Reveal, OMNISEC Resolve e OMNISEC Software. O OMNISEC Reveal é um módulo multidetector Vistotek integrado que inclui um viscosímetro, um detetor de 90° de dispersão de luz em ângulo reto (RALS), um detetor de 7° de dispersão de luz em ângulo baixo (LALS) e um detetor de índice de refração. As separações foram efetuadas a 30°C em colunas mistas PL aqua gel-OH (com polímero poroso de hidroximetilmetacrilato). A fase móvel foi Na₂SO₄ 0,05 M e o fluxo a 1,0 mL/min. As amostras foram dissolvidas na fase móvel a 2 mg/mL, filtradas (acetato de celulose, 0,45 µm) e 100 µL de cada amostra foram injetados a 23°C, numa válvula de injeção automática equipada com um loop de capacidade máxima de 200 µL. Todos os módulos foram controlados pelo software OMNISEC, que também analisou os dados das amostras.

As proteínas totais presentes nas diferentes frações de polissacáridos foram determinadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA), referido na secção 2.2. A concentração total de proteínas foi calculada através de uma regressão linear Absorvância vs Concentração de proteína padrão, expressa em µg equivalentes de BSA por mg de extrato.

O teor de polifenóis totais foi determinado através do ensaio de Folin-Ciocalteu referido na secção 3.2.2. A concentração total de polifenóis foi calculada através de uma regressão linear Absorvância vs Concentração de polifenol padrão, expressa em µg equivalentes de ácido gálico por mg de extrato.

5. Condições de cultura celular

Neste estudo foi utilizado uma linhagem celular de carcinoma espinocelular do tipo epitelial: linha celular HSC-3 derivada da língua oral humana. Estas células cresceram em DMEM com alto teor de glucose, suplementado com 1% de Ala-Gln (solução 200 mM), 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B). As células foram mantidas em condições de 5% de CO₂ em ar, a 37 °C com atmosfera humidificada e foram dissociadas com tripsina (0,25% (p/v) tripsina-EDTA₄Na) a 80–90% de confluência.

5.1 Tripsinização

A tripsinização engloba vários passos e é realizada quando as células se encontram a 80%-90% de confluência. Este procedimento realiza-se em ambiente estéril, dentro de uma câmara de fluxo de ar laminar (Bio II Advance Plus, da Telstar).

Em primeiro lugar, o meio DMEM é removido do T-flask, depois é adicionado 3 mL de PBS gota a gota, com uma pipeta serológica, de forma a remover o meio de crescimento residual, posteriormente, o PBS é removido e 2 mL de tripsina são adicionados diretamente no T-flask. A tripsina fica a incubar durante 5 minutos, a 37°C, em condições de 5% de CO₂ em ar, de modo a desagregar as células da placa, através da sua propriedade proteolítica sobre proteínas intercelulares. Após incubação, 5 mL de meio DMEM suplementado é adicionado para inibir a ação da tripsina, sendo a mistura homogeneizada e centrifugada a 2500 rpm, a 21°C, durante 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante é rejeitado e o pellet é suspenso em 2 mL de meio DMEM. Por fim, dependendo do split escolhido, um determinado volume de células é colocado num novo T-flask com 10 mL de meio DMEM.

6. Desenvolvimento do modelo celular para estudar o efeito dos polissacáridos

De forma a estudar o efeito dos polissacáridos na interação dos polifenóis com os diferentes constituintes orais, desenvolveu-se um modelo celular representativo da cavidade oral que permite estudar dois dos mecanismos descritos como responsáveis pela adstringência: interação de polifenóis com PS e interação de polifenóis com constituintes orais (células do epitélio oral e película da mucosa).

Este modelo foi adaptado a partir de modelos já existentes na literatura (Susana Soares et al., 2016; Sónia Soares et al., 2019; Susana Soares et al., 2020; Guerreiro et al., 2022a), permitindo estudar as interações e contribuições dos constituintes orais na adstringência, assim como compreender o efeito dos polissacáridos nessas interações.

6.1 Formação da película da mucosa: adesão da mucina às células e ligação de proteínas salivares

A película da mucosa é formada por vários constituintes orais, nomeadamente células do epitélio oral, mucina e saliva. Neste modelo foi utilizada uma linha celular proveniente da língua humana, as células HSC-3.

Estas células foram plaqueadas em microplacas de cultura de 96 poços, com uma densidade de 3×10^5 células/mL e cresceram em meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) com alto teor de glucose, durante 48 horas antes de serem usadas nos ensaios (90-100% de confluência).

Antes da formação da película da mucosa, o meio de crescimento foi removido e as monocamadas de células foram lavadas uma vez com 100 μ L de PBS, a 37°C e a pH 7, com o objetivo de remover o meio de crescimento residual. De seguida, uma solução stock (20 mg/mL) de mucina de estômago suíno foi preparada em NaOH (1 M) e diluída em tampão Hanks' para obter uma solução de mucina de 1 mg/mL, ajustada a pH 7. Desta solução aquecida a 37°C, 30 μ L foram adicionados aos poços em quadruplicado segundo a Figura 24 – poços das linhas A a H e colunas 1 a 6 e incubados durante 1 hora, a 37 °C numa estufa de CO₂ a 5%, com atmosfera humidificada, de modo a ocorrer a adesão da mucina às células. A outra metade da microplaca permaneceu com meio de crescimento.

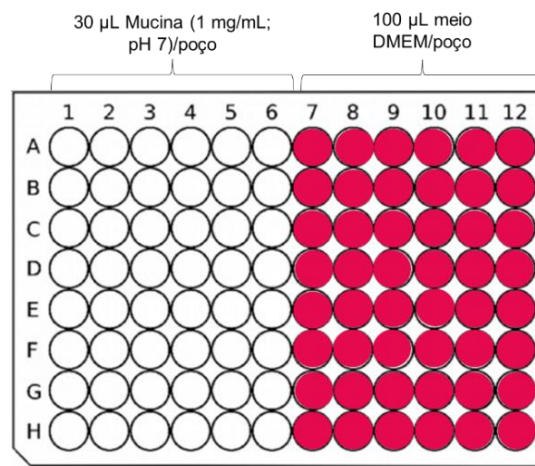


Figura 24 - Desenho de uma microplaca de 96 poços com distribuição dos poços em monocamada de células HSC-3, com pré-incubação de mucina 1 mg/mL, pH 7.

Após 1 hora de incubação, a outra metade da microplaca sem mucina foi lavada com 100 μL de PBS, a 37°C e a pH 7 e a mucina foi aspirada dos outros poços. De seguida, as amostras de saliva tratada com TFA, previamente concentradas, foram descongeladas e reconstituídas, para obter uma concentração final de 800 $\mu\text{g/mL}$ com Hanks', sendo o seu pH ajustado a 7. Para formação da película da mucosa, a saliva foi aquecida a 37°C e desta foi adicionado 30 μL em quadriplicado a 56 poços (poços com e sem mucina), como mostra a figura 25 (poços das colunas 1 a 12 e linhas A a D e poços da coluna 1 e 12 e linhas E a H. Aos 40 poços restantes, foram adicionados 30 μL de solução tampão Hanks', ajustado a pH 7.

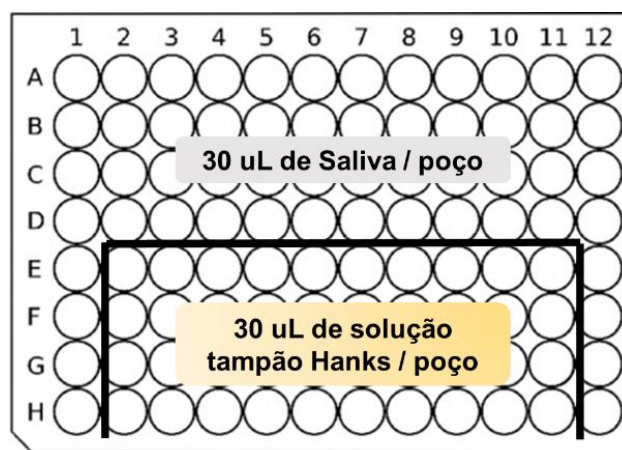


Figura 25 - Desenho de uma microplaca de 96 poços com distribuição dos poços em monocamada de células HSC-3, com pré-incubação de saliva tratada com TFA diluída em Hanks' de 800 $\mu\text{g/mL}$ a pH 7 e solução tampão Hanks'.

A microplaca foi incubada por 2 horas, a 37 °C numa estufa de CO₂ a 5%, com atmosfera humidificada. Ao mesmo tempo, também foi preparada uma microplaca de 96 poços com o mesmo desenho experimental, mas sem células, para garantir que todas as condições de controlo foram realizadas nas mesmas condições.

6.2 Desenvolvimento do modelo celular quaternário: Efeito dos polissacáridos na interação entre extratos de polifenóis e constituintes orais

O modelo celular quaternário é um modelo composto por constituintes orais, PS, polifenóis e polissacáridos. Através deste modelo foi possível estudar o efeito dos polissacáridos pécticos da casca de laranja nas interações entre polifenóis e constituintes orais, utilizando dois dos três mecanismos moleculares sugeridos para a sensação de adstringência: interação de polifenóis com PS e interação de polifenóis com constituintes orais (células do epitélio oral e película da mucosa).

De forma a avaliar o efeito dos polissacáridos pécticos da casca de laranja no modelo oral, foi estudada a interação entre três extratos de polifenóis (GSE, BTE e RWE) e diferentes constituintes orais, quer de forma individual ou em conjunto no modelo oral completo HSC-3-Mucina-PS, na presença de diferentes frações de polissacáridos pécticos.

Deste modo, foram preparadas soluções stock aquosas, a pH 6, em solução tampão Hanks', de diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja (frações obtidas com água, imidazole e carbonato de sódio). Foram também preparadas soluções stock aquosas, a pH 6, em solução tampão Hanks' de diferentes extratos de polifenóis (GSE, BTE e RWE), sendo que o BTE foi previamente dissolvido em DMSO (concentração final de 2%).

As soluções stock de polifenóis foram misturadas com as soluções stock de polissacáridos para obter concentrações finais de polifenol: GSE 0,1 g/L e 0,3 g/L, BTE 0,2 g/L e 0,4 g/L e RWE 0,8 g/L e 1,2 g/L e concentrações finais de 1,0 g/L e 2,0 g/L para as diferentes frações de polissacáridos. Estas soluções foram preparadas em solução tampão Hanks', a pH 6 e interagiram durante 30 minutos à temperatura ambiente, de modo a simular o processo que ocorre nos alimentos onde estes dois compostos estão em contacto. Foram também preparadas soluções apenas com polifenol como controlo (ausência de polissacárido).

Após esse tempo, os poços previamente incubados com saliva foram aspirados e foi colocado novamente 30 µL de saliva, aquecida previamente a 37 °C. De seguida, 15 µL de cada mistura (polifenol+polissacárido) ou das soluções de polifenol (controlo) foram adicionados aos poços como representado na figura 26, quer na microplaca com células quer na microplaca sem células, de forma a criar várias condições experimentais para cada concentração de polifenol e polissacárido, abrangendo todas as condições de controlo e todos os constituintes orais, quer de forma individual ou em conjunto.

Nos poços controlo (sem polifenol e sem polissacárido) foram adicionados 15 µL de solução tampão Hanks´ ajustado a pH 6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P2+PS1	P1+PS2	P1+PS1	P2	P1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P1	P2	P1+PS1	P1+PS2	P2+PS1
B	P2+PS1	P1+PS2	P1+PS1	P2	P1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P1	P2	P1+PS1	P1+PS2	P2+PS1
C	P2+PS1	P1+PS2	P1+PS1	P2	P1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P1	P2	P1+PS1	P1+PS2	P2+PS1
D	P2+PS1	P1+PS2	P1+PS1	P2	P1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P1	P2	P1+PS1	P1+PS2	P2+PS1
E	P2+PS2	P1+PS2	P1+PS1	P2	P1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P1	P2	P1+PS1	P1+PS2	P2+PS2
F	P2+PS2	P1+PS2	P1+PS1	P2	P1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P1	P2	P1+PS1	P1+PS2	P2+PS2
G	P2+PS2			P2+PS2	P2+PS1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P2+PS1	P2+PS2			P2+PS2
H	P2+PS2			P2+PS2	P2+PS1	15 µL Hanks	15 µL Hanks	P2+PS1	P2+PS2			P2+PS2
LEGENDA:												
P - POLIFENOL; PS - POLISSACÁRIDO; 1 - Concentração 1; 2 - Concentração 2												

Figura 26 - Desenho de uma microplaca de 96 poços com as diferentes amostras distribuídas por poço.

Após adição das amostras, ambas microplacas (com células e sem células) foram incubadas por 10 minutos a 37°C, numa estufa de CO₂ a 5%, com atmosfera humidificada. Logo a seguir as microplacas foram centrifugadas a 4400 rpm, durante 15 minutos, à temperatura ambiente e os sobrenadantes foram recolhidos, mantidos em gelo e imediatamente congelados a -80°C até serem analisados por HPLC.

6.2.1 Quantificação dos polifenóis adsorvidos à microplaca após interação – Ensaio de DMACA

Os polifenóis adsorvidos às microplacas após interação foram quantificados através de um ensaio de deteção colorimétrica por UV-Vis com o reagente DMACA. Este ensaio foi adaptado de (Nagel & Glories, 1991) e alterado para utilização em microplaca de 96 poços.

Após recolha de sobrenadantes, as microplacas foram aspiradas e uma solução de DMACA a 0,1% foi preparada em metanol acidificado (0,75 M H₂SO₄) para quantificar os polifenóis adsorvidos presentes no GSE. Para quantificar os polifenóis presentes no

BTE e no RWE foi preparada uma solução de DMACA a 0,025%. Na presença de ácido sulfúrico, o DMACA (4-dimetilaminocinamaldeído) reage seletivamente com catequinas e procianidinas para formar um produto azul-esverdeado que pode ser quantificado medindo a absorvância da mistura reacional a 640 nm.

Desta forma, 50 µL de metanol acidificado e 50 µL de solução de DMACA foram adicionados às microplacas e incubados durante 10 min, no escuro, à temperatura ambiente e a absorvância de cada poço foi medida a 640 nm num leitor de placas (Epoch 2, BioTek Instruments).

A concentração dos polifenóis em cada condição experimental foi avaliada através de uma curva de calibração estabelecida. A catequina foi utilizada como padrão para quantificar os polifenóis adsorvidos do GSE, a EGCG foi utilizada como padrão para quantificar os polifenóis adsorvidos do BTE e a epicatequina foi utilizada como padrão para quantificar os polifenóis adsorvidos do RWE.

6.2.2 Análise das proteínas salivares por HPLC

Os sobrenadantes dos ensaios celulares realizados foram analisados por HPLC quanto ao perfil de PS. Considerando os resultados obtidos no ensaio de DMACA, foram escolhidas as condições experimentais mais promissoras, no qual os polissacáridos apresentaram maior efeito em reduzir/inibir as interações.

As condições de HPLC foram adaptadas a partir de um estudo anterior (Guerreiro et al., 2022). Os sobrenadantes (60 µL) foram injetados através de um sistema HPLC JASCO (LC-4000), equipado com uma coluna Vydac C18 (Grace Davison Discovery Sciences), com diâmetro de partícula de 5 µm (dimensões da coluna 150 × 2,1 mm), a deteção foi realizada entre a 214 nm, utilizando um detetor DAD (MD-4010). Os eluentes foram 0,2 % TFA em água (solvente A) e 0,2 % TFA em ACN/água 80:20 (v/v) (solvente B). O gradiente linear aplicado foi 10 a 17% (eluente B), durante 10 min, 17 a 27% (eluente B), durante 20 min, 27 a 31% (eluente B), durante 3 min, 31 a 50% (eluente B), durante 17 min, 50 a 70% (eluente B), durante 19 min, 70 a 100% (eluente B), durante 11 min e 100 a 10% (eluente B), durante 11 min, a uma taxa de fluxo 0,3 mL min⁻¹. Após este programa, a coluna foi lavada com 100% do eluente B. Após a lavagem, a coluna foi estabilizada nas condições iniciais.

7. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular, em resposta à exposição de diferentes compostos tais como o GSE, BTE, RWE e os diferentes polissacáridos pécticos da casca de laranja, foi determinada a partir do método já descrito na literatura (Payne et al., 2009), utilizando o corante vermelho neutro.

O corante vermelho neutro é um corante que apresenta carga positiva e se liga a superfícies negativamente carregadas, como é o caso das membranas celulares. Este corante é utilizado para corar células vivas e destacar estruturas específicas, como as lisozimas. Esta propriedade permite distinguir entre células viáveis e não viáveis, devido ao facto deste corante só poder ser retido e absorvido pelas lisozimas de células viáveis.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado em quadruplicado em microplacas de 96 poços. No final do ensaio, após incubação com a mucina, saliva e interação com as amostras e todas as condições experimentais terem sido recuperadas, cada poço foi lavado com 100 μ L de PBS, a 37°C, a pH 7. Logo a seguir, foram adicionados 90 μ L por poço de solução vermelho neutro, a 37°C, com uma concentração de 3,3 mg/mL, previamente dissolvida com meio de cultura (DMEM), para uma concentração final de 0,08 mg/mL. O vermelho neutro ficou a incubar durante 2 horas, a 37°C, numa estufa de CO₂ a 5%, com atmosfera humidificada. Após incubação, cada poço foi cuidadosamente aspirado e lavado com 90 μ L de PBS, a 37°C, a pH 7. Por fim, foi adicionado 90 μ L de *working reagent* (etanol 50%/ ácido acético 1%) e a absorvância foi medida a 540 nm num leitor de placas (Epoch 2, da BioTek Instruments). A absorvância dos poços é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis presentes nos poços individuais, sendo que a sobrevivência celular foi expressa em percentagem de absorvâncias, considerando que as células em meio de cultura (DMEM) correspondem ao máximo de viabilidade (100%).

8. Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em $n=3$ réplicas independentes em dias diferentes.

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk e os valores médios e o erro padrão da média (EPM) foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram processadas usando o GraphPad Prism versão 9.0 para Windows.

III. Resultados e Discussão

III. Resultados e Discussão

A sensação de adstringência pode ser explicada por mais do que um mecanismo ou pode mesmo resultar de uma combinação de vários mecanismos, sendo que os polissacáridos têm vindo a ser descritos como possíveis moduladores da adstringência devido à sua capacidade de inibir/reduzir as interações entre PS e polifenóis.

Neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes polissacáridos pécnicos extraídos da casca de laranja na interação entre PS e diferentes famílias de polifenóis através de um modelo celular quaternário. Este modelo *in vitro* pretende simular a cavidade oral sendo composto por diferentes constituintes orais (células do epitélio oral e película da mucosa), PS, polifenóis e polissacáridos. Além disso, este modelo permite estudar dois dos três mecanismos moleculares sugeridos para a sensação de adstringência. Para este estudo foram utilizados três extratos ricos em polifenóis: GSE, BTE e RWE. O GSE foi adquirido comercialmente, tendo sido escolhido como modelo de um extrato rico em polifenóis por apresentar uma grande capacidade de interação com os diferentes constituintes orais num modelo celular já estudado pelo grupo de investigação (Sónia Soares et al., 2019). Por sua vez, o BTE e o RWE são extratos representativos de bebidas ricas em polifenóis, mundialmente consumidas e conhecidas por serem muito adstringentes, como é o caso do chá preto e do vinho tinto, respetivamente.

O efeito dos polissacáridos na interação entre os vários extratos ricos em polifenóis e os diferentes constituintes orais foi analisado através de duas abordagens:

- Detecção colorimétrica por UV-Vis - quantificação de polifenol adsorvido após interação por DMACA
- Análise por HPLC do perfil salivar – identificação e quantificação de proteínas salivares após interação.

O método de deteção colorimétrica permite fazer uma análise rápida das condições onde os polissacáridos apresentam mais efeito, sendo que a análise por HPLC permite avaliar de forma mais detalhada o efeito dos polissacáridos no perfil salivar e compreender quais as famílias de PS que mais interagiram com os polifenóis e que os polissacáridos tiveram mais efeito.

1. Caracterização proteica da saliva

A saliva humana, semelhante à utilizada neste estudo, já tinha sido previamente caracterizada pelo grupo de investigação por espectrometria de massa (Irene Messana et al., 2004; Soares et al., 2012).

A saliva recolhida foi submetida a um tratamento ácido inicial com TFA (0,1%, concentração final), de modo a inibir parcialmente as proteases, preservando a composição intrínseca da saliva, assim como a precipitar proteínas de elevado peso molecular, como mucinas, α -amilase e lactoferrina. No entanto, proteínas como as PRPs, estaterina, péptido P-B e cistatinas são solúveis na saliva ácida e podem ser analisadas diretamente por HPLC.

O cromatograma foi obtido a 214 nm, sendo semelhante ao descrito na literatura (Susana Soares et al., 2012). No entanto, como a estaterina e o péptido P-B foram co-eluídos, apresentaram o mesmo tempo de retenção e por isso não foi possível separar estas duas famílias de proteínas. Portanto, em vez de 6 zonas, o cromatograma dividiu-se em 5 zonas, cada uma delas associadas a uma família de proteínas: 1) proteínas ricas em prolina básicas, bPRPs; 2) proteínas ricas em prolina glicosiladas, gPRPs; 3) proteínas ricas em prolina acídicas, aPRPs; 4) estaterina/péptido P-B e 5) cistatinas (Figura 27).

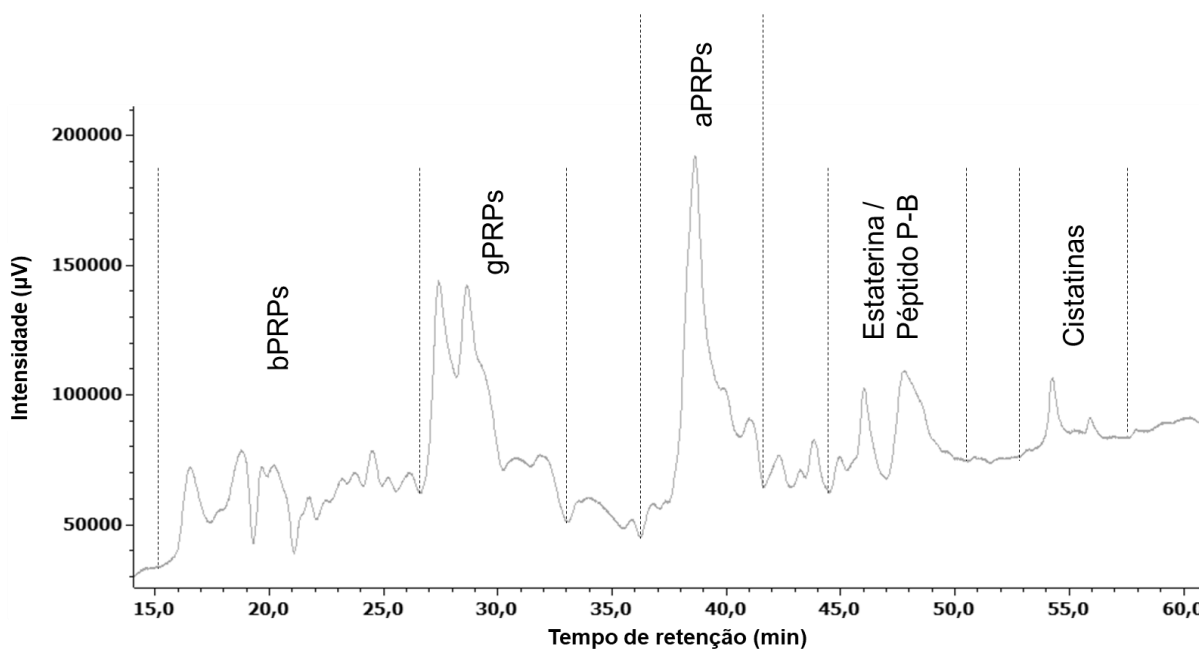


Figura 27 - Cromatograma típico da análise de saliva ácida, obtido por HPLC a 214 nm. As diferentes zonas correspondem a diferentes famílias de proteínas salivares.

Alguns parâmetros físico-químicos da saliva também foram analisados, tais como o pH após adição de TFA, a força iônica e o doseamento de proteínas pelo método do ácido bicinônico (BCA). Na tabela 1 encontra-se representado um exemplo dos parâmetros físico-químicos de uma amostra de saliva recolhida.

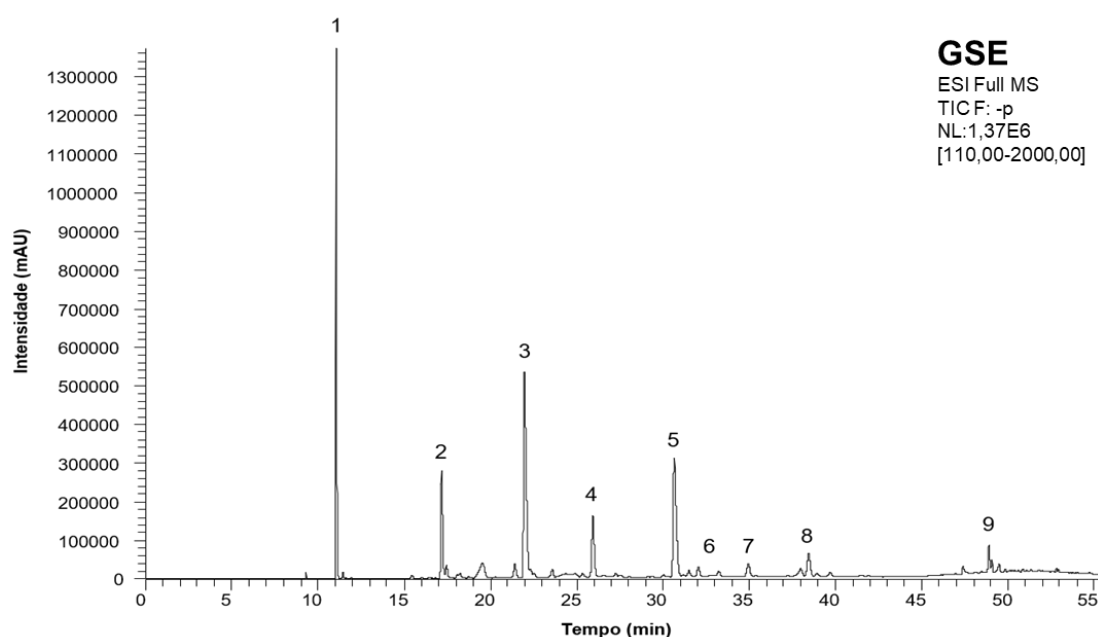
Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos da saliva recolhida.

Data	Horas	pH após adição de TFA	Volume total (mL)	Força iônica (mS/cm)	Doseamento de proteínas totais (BCA) (µg/mL)
19/06/2023	14:00h	2,70	55	4,90	1421

2. Caracterização dos polifenóis

2.1 Análise por espectrometria de massa

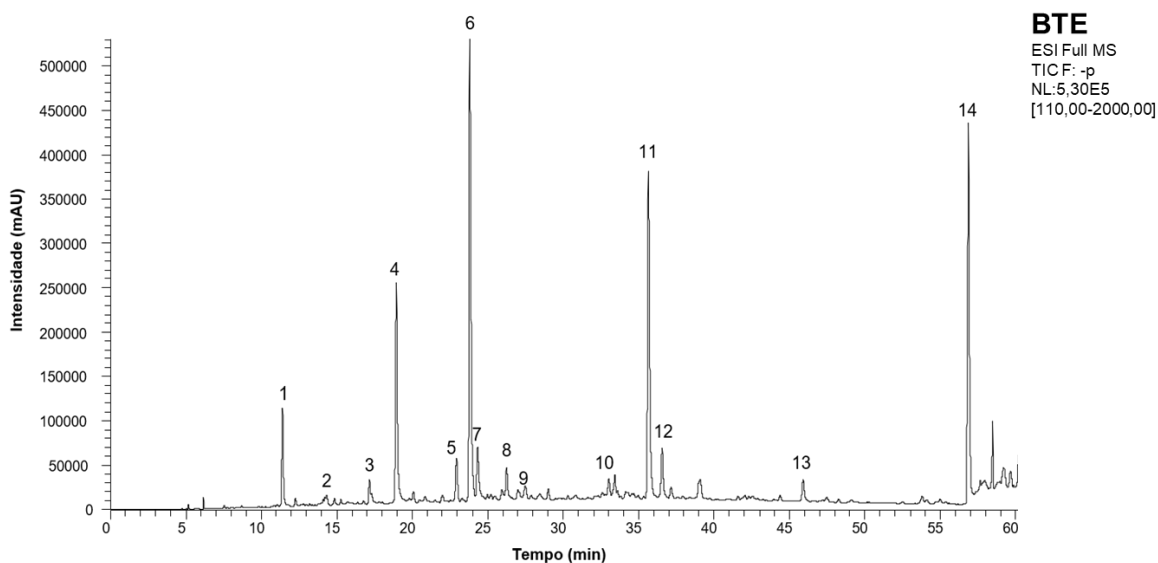
Os diferentes extratos de polifenóis (GSE, BTE e RWE) foram analisados por espectrometria de massa. Com base nos dados do espectro de massa, comparação com a literatura e utilização de padrões foi possível identificar os compostos presentes em cada extrato. Os cromatogramas e os principais compostos presentes em cada extrato encontram-se representados nas figuras 28, 29 e 30, respetivamente.



Pico	Identificação composto	Tempo de retenção (min)	[M] ⁻ m/z	Fragmentos MS ² m/z
1	Ácido Gálgico	11,08	169	124,79
2	Procianidina dimérica B1	17,19	577	425,10; 407,11; 289,19
3	(-)-Epicatequina	21,98	289	245,01; 202,98
4	Procianidina dimérica B2	25,95	577	425,15; 407,09; 289,15
5	(+)-Catequina	30,66	289	245,02; 202,93
6	Procianidina B2 3'-O-galhato	32,06	729	577,15; 559,21; 407,16
7	Trímero de procianidinas C1	34,95	865	695,19; 739,19; 577,21
8	Procianidina B4 3'-O-galhato	38,45	729	577,10; 559,06; 407,16
9	(-)-Epicatequina-3-O-galhato	48,91	441	289,03; 168,91

Figura 28 - Cromatograma do extrato de grainha de uva obtido por espectrometria de massa, no modo de ião negativo, a um comprimento de onda de 280 nm e identificação dos compostos assim como, tempo de retenção, massa do ião molecular principal desprotonado e padrões de fragmentação.

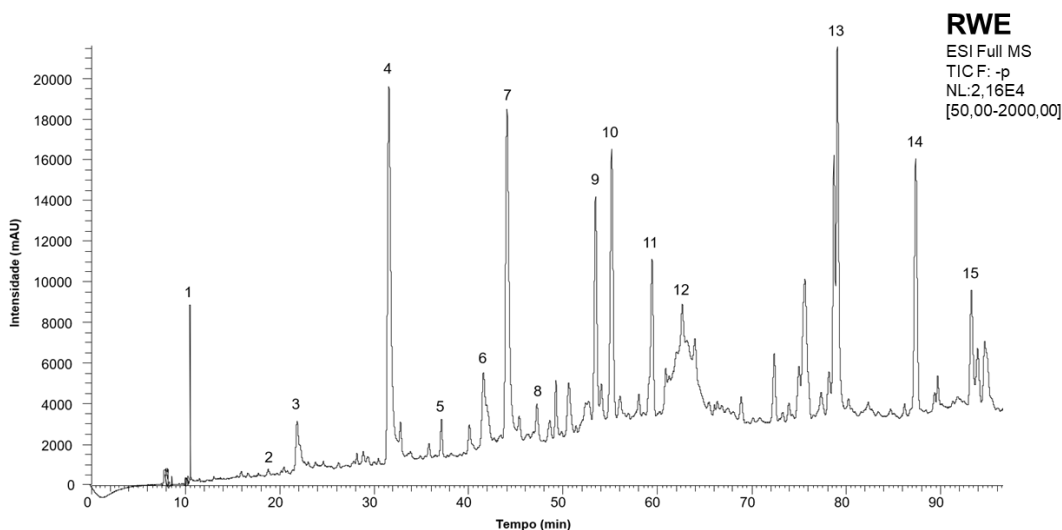
O perfil de polifenóis do GSE é composto maioritariamente pela presença de não flavonóides, como o ácido gálgico, flavan-3-óis, como as (-) - epicatequinas e (+) - catequinas e taninos condensados, como as procianidinas, que são polímeros de (+) - catequinas ou (-) - epicatequinas. Todos os compostos identificados estão de acordo com a literatura (Dou et al., 2007; Lin et al., 2008; Nikolai et al., 2010; García-Estévez et al., 2017).



Pico	Identificação composto	Tempo de retenção (min)	[M] ⁻ m/z	Fragmentos MS ² m/z
1	Teasinensina B (ou E)	11,41	761	591,21; 609,18
2	(-)-Epigalhocatequina	14,35	305	178,92; 220,95; 163,85
3	Estritina	17,17	633	300,98; 463,08
4	Teasinensina A (ou D)	18,94	913	743,11; 761,07; 591,05
5	(+)-Catequina	22,93	289	245,16; 203,16
6	(-)-Epigalhocatequina-3-O-galhato (EGCG)	23,81	457	305,1; 331,1
7	Teacitrin-digalhato	24,33	911	759,20
8	1,2,6-Trigalloilglicose	26,25	635	483,06; 168,92
9	Procianidina Bx 3'-O-galhato	27,50	729	577,16; 559,17; 441,21; 407,21
10	Rutina	33,42	609	301,00
11	(-)-Epicatequina-3-O-galhato	35,65	441	289,05; 168,92
12	Teasinensina C	36,55	609	439,08; 286,99
13	Quercetina-3-O- desoxihexosil (1-2) desoxihexosídeo	45,89	593	441,12; 331,06; 423,12
14	Teaflavin 3,3'-digalhato	56,82	867	715,16; 527,14

Figura 29 - Cromatograma do extrato de chá preto obtido por espectrometria de massa, no modo de íão negativo, a um comprimento de onda de 280 nm e identificação dos compostos assim como, tempo de retenção, massa do íão molecular principal desprotonado e padrões de fragmentação.

O perfil de polifenóis do BTE é caracterizado principalmente pela presença de flavan-3-óis, nomeadamente (+) - catequinas, (-) - epigalhocatequinas, (-) - epicatequina-3-O-galhato, (-) - epigalhocatequina-3-O-galhato (EGCG), teasinensinas e teaflavinas. As teasinensinas e teaflavinas são dos principais produtos oxidados do chá preto (Lima et al., 2009). Todos os compostos identificados estão de acordo com a literatura (Dou et al., 2007; Lin et al., 2008; Nikolai et al., 2010; Susana Soares, Soares, et al., 2020).



Pico	Identificação composto	Tempo de retenção (min)	[M] ⁻ m/z	Fragmentos MS ² m/z
1	Cianidina-3-O-glicósido-catequina	10,66	737	705,31; 661,34
2	(+)-Catequina	16,75	289	-
3	(-)-Epicatequina	22,02	289	-
4	Ácido Cafeico	31,72	179	134,86
5	Dímero de procianidinas	37,29	577	425,17; 407,22
6	Delfinidina-3-O-glicósido	41,68	463	301,07
7	Chalcona trans malvidina-3-O-glicósido	44,24	509	329,06; 297,06
8	Ácido p-cumárico	47,42	163	118,81
9	Dímero de procianidinas	53,91	577	425,10; 407,13
10	Cinamato de etilo	55,33	175	159,87; 131,82
11	4-O-galhoil-glicósido	59,61	331	299,03; 271,07
12	Chalcona cis malvidina-3-O-glicósido	62,82	509	329,15; 347,08
13	Peonidina-3-O-glicósido	79,24	479	317,05; 178,90
14	Resveratrol	87,55	227	159,02; 142,91
15	Quercetina	93,44	301	178,87; 150,90

Figura 30 - Cromatograma do extrato de vinho tinto obtido por espectrometria de massa, no modo de ião negativo, a um comprimento de onda de 280 nm e identificação dos compostos assim como, tempo de retenção, massa do ião molecular principal desprotonado e padrões de fragmentação.

O perfil de polifenóis do RWE é caracterizado principalmente pela presença de não flavonóides, como o ácido cafeico, ácido p-cumárico, cinamato de etilo e resveratrol, antocianinas, como a cianidila-3-O-glicósido, delfinidina-3-O-glicósido, chalcona malvidina-3-O-glicósido e peonidina-3-O-glicósido, flavonóis, como a quercetina, flavan-3-óis, como a (-) - epicatequina e taninos condensados, como os dímeros de procianidinas. Todos os compostos identificados estão de acordo com a literatura (He et al., 2012; García-Estévez et al., 2017; Azevedo et al., 2020; Prat-garc et al., 2021).

2.2 Doseamento de polifenóis e açúcares

O teor total em polifenóis e o teor em açúcares presentes nos diferentes extratos, encontra-se representado na tabela 2 e foi determinado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu e pelo método de Dubois, respetivamente.

O teor total de polifenóis presentes no GSE está expresso em equivalentes de ácido gálico e catequina. Os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico mostram

que o GSE é composto por aproximadamente 50% de polifenóis totais, o que está de acordo com a literatura (Baydar et al., 2006). Por outro lado, os resultados expressos em equivalentes de catequina mostram que o GSE é composto por aproximadamente 70% de polifenóis totais, o que indica que este extrato é composto maioritariamente por catequinas e procianidinas, o que está de acordo com a literatura (Payne et al., 2009; Krasteva et al., 2023).

Relativamente ao BTE, os resultados estão expressos em equivalentes de ácido gálico e EGCG. Os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico mostram que o BTE apresenta uma maior percentagem de polifenóis (74%), do que os resultados expressos em equivalentes de EGCG (51%).

O teor total de polifenóis presentes no RWE está expresso em equivalentes de ácido gálico. Os resultados mostram que este é o extrato que contém menor quantidade de polifenóis (38%), quando comparado com o GSE e o BTE.

O teor total de açúcares foi determinado a partir do método de Dubois e os resultados estão expressos em equivalentes de glucose. Os resultados mostram que o RWE é o extrato que apresenta maior teor de açúcares (13 %), o que é um valor expectável, visto que o vinho tinto apresenta na sua composição muitos açúcares, sendo que o valor pode variar muito de acordo com o tipo de uva, processo de vinificação e o nível de açúcar residual.

Tabela 2 - Composição dos diferentes extratos de polifenóis. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três repetições.

Amostra	Polifenóis ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Açúcares ($\mu\text{g}_{\text{glucose}} / \text{mg}$)
GSE	474,3 $\pm$ 2,2 *	72,1 $\pm$ 1,4
	701,7 $\pm$ 70,8 **	
BTE	743,2 $\pm$ 12,4 *	39,8 $\pm$ 1,0
	508,9 $\pm$ 1,9 ***	
RWE	374,1 $\pm$ 4,3 *	129,6 $\pm$ 3,8

* O teor em polifenóis é expresso em μg de ácido gálico por mg de amostra.

** O teor em polifenóis é expresso em μg de catequina por mg de amostra.

*** O teor em polifenóis é expresso em μg de EGCG por mg de amostra.

3. Caracterização dos polissacáridos

As frações de polissacáridos pécticos foram obtidos a partir de cascas de laranja por extração sequencial do AIR com água, solução de imidazole e carbonato de sódio (Na_2CO_3) durante 16h e 2h, correspondentes às frações “*water-soluble pectic polysaccharides*” - WSP, “*imidazole-soluble pectic polysaccharides*” - ISP, “*sodium carbonate-soluble pectic polysaccharides*” - CSP 16h e CSP 2h, respetivamente.

O AIR representou 72% da matéria prima inicial (peso seco). Após as extrações e diálises, as diferentes frações foram congeladas e liofilizadas e o seu rendimento foi determinado com base na massa de AIR (Tabela 3). Apesar de serem rendimentos baixos, estes valores estão de acordo com a literatura para extração de polissacáridos de paredes celulares de material vegetal (Nunes et al., 2008).

O teor em açúcares totais variou entre 40% a 71% (m/m), o que significa que os diferentes solventes permitiram obter diferentes frações ricas em polissacáridos pécticos, sendo que o ISP e CSP 2h foram as frações que apresentaram maior teor de açúcares totais (Tabela 3).

O teor total de proteínas e polifenóis presentes nas diferentes frações foram quantificadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) e ensaio de Folin-Ciocalteu, respetivamente (Tabela 3). Entre as várias frações, a fração obtida com solução de imidazole foi a que apresentou maior teor de proteína, aproximadamente 10%, este valor está de acordo com a literatura para a extração de polissacáridos pécticos de material vegetal (Gonçalves et al., 2018). A presença de proteínas ligadas à molécula de polissacárido pode ter efeitos benéficos nas suas propriedades funcionais e biológicas, como atividade emulsificante, antioxidante e inibidora de enzimas, no entanto em níveis elevados pode apresentar maior impureza na amostra isolada (Asgari et al., 2020).

Relativamente ao teor em polifenóis, os valores são inferiores a 1%, o que é expectável, uma vez que se trata de polissacáridos pécticos. Além disso, o procedimento que se realiza para obtenção do AIR com etanol 85%, ajuda a remover polifenóis.

O peso molecular é um fator crucial para as propriedades funcionais da pectina, assim como a sua capacidade emulsificante e estabilizadora. Yapo e colegas relataram que frações com um elevado peso molecular possuíam propriedades emulsificantes reduzidas, enquanto que as frações com um baixo peso molecular exibem uma boa capacidade emulsificante e boa eficiência na atividade antirradicalar (Yapo et al., 2007).

A análise por cromatografia de permeação em gel/cromatografia de exclusão de tamanho (GPC/SEC) mostrou que o ISP e CSP 16h apresentam pesos moleculares menores que o das frações WSP e CSP 2h, sendo que o peso molecular do CSP 16h é aproximadamente 82% menor que o da fração CSP 2h.

Tabela 3 - Caracterização das diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três repetições.

Amostra	Rendimento (%) *	Açúcares Totais (% (m/m))	Proteína (μg_{BSA} / mg)	Polifenóis (μg_{AG} / mg)	Pesos Moleculares (kDa)
WSP	5,2	61 $\pm$ 2	79,6 $\pm$ 2,6	7,4 $\pm$ 0,9	1004 $\pm$ 117
ISP	4,2	71 $\pm$ 3	103,6 $\pm$ 1,3	4,6 $\pm$ 1,4	668 $\pm$ 99
CSP 16 h	6,9	40 $\pm$ 1	22,1 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 3,3	227 $\pm$ 26
CSP 2 h	5,5	71 $\pm$ 3	35,1 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 2,1	1235 $\pm$ 53

*O rendimento é expresso em mg de matéria seca por g de AIR obtido.

BSA, *bovine serum albumin*; AG, ácido gálico; kDa, Quilodalton

Os açúcares neutros foram determinados através de cromatografia gasosa e estão expressos em mol %, sendo que o CSP 2h apresentou uma maior composição em açúcares neutros (60 mol %) (Tabela 4). Estes açúcares correspondem ao grupo de açúcares solúveis, entre os quais a ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose estão incluídos.

A análise da composição de açúcares, revelou que, de uma forma geral, os ácidos urónicos (40-89 mol %), a arabinose (6-44 mol %) e a galactose (2-14 mol %), são os açúcares mais abundantes nas diferentes frações (Tabela 4). Estes açúcares são típicos dos polissacáridos pécticos e estes valores estão de acordo com o que é observado na literatura (Nunes et al., 2008; Apolinar-Valiente et al., 2010). A ramnose e a glucose estão presentes em quantidades razoáveis, enquanto a xilose e a manose são os monossacáridos que estão presentes de forma residual.

Em relação ao WSP, este é rico em ácido urónicos (72 mol %), apresenta um grau de metil-esterificação de 88% e um grau de acetilação de 3%. O ISP apresenta um maior teor em ácido urónicos, 89 mol %, um grau de metil-esterificação de 51% e um grau de acetilação de 3%. Já o CSP 16 h não apresenta acetilação ou metil-esterificação, mas apresenta alto teor em ácidos urónicos (80 mol %). O CSP 2h apresenta uma maior

composição em açúcares neutros como a arabinose (44 mol %) e galactose (14 mol %) e ausência de acetilação e metil-esterificação dos ácidos urónicos, sugerindo a ocorrência de polissacáridos pécticos mais ramificados e negativamente carregados. A extração com carbonato de sódio durante 2 h, à temperatura ambiente permite obter polissacáridos pécticos com maior quantidade de arabinoses e galactoses quando comparado com a extração com carbonato de sódio durante 16 horas, a 4°C.

Tabela 4 - Composição em açúcares neutros e ácidos urónicos (mol %), grau de metil-esterificação (DME, %) e grau de acetilação (DA, %) das diferentes frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Amostra	mol % (média $\pm$ desvio padrão)								DME	DA
	Açúcares neutros	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácidos urónicos	(%)	(%)
WSP	28 $\pm$ 2	3 $\pm$ 0	11 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	7 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	72 $\pm$ 3	88	3
ISP	11 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	6 $\pm$ 1	tr	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	89 $\pm$ 1	51	3
CSP 16 h	20 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0	14 $\pm$ 1	tr	-	5 $\pm$ 0	-	80 $\pm$ 2	-	-
CSP 2 h	60 $\pm$ 2	2 $\pm$ 0	44 $\pm$ 2	tr	-	14 $\pm$ 0	tr	40 $\pm$ 3	-	-

Rha, ramnose; Ara, arabinose; Xyl, xilose; Man, manose; Gal, galactose; Glc, glucose; DME, *degree methyl esterified* (grau de metil-esterificação); DA, *degree of acetylation* (grau de acetilação).

Por fim, com base na caracterização dos diferentes polissacáridos pécticos, é possível concluir que, a extração com água permitiu obter pectinas altamente metil-esterificadas (*high methyl esterified pectins*, HMEP), por apresentar um elevado grau de metil-esterificação (88%). A extração com imidazole permitiu obter pectinas médio metil-esterificadas (*medium methyl esterified pectins*, MMEP), uma vez que metade dos ácidos urónicos (51%), encontram-se metil-esterificados. A extração com carbonato de sódio durante 16 horas permitiu obter pectatos de baixo peso molecular (*low molecular weight pectates*, LMWP), uma vez que apresenta ausência de acetilação e metil-esterificação e menor peso molecular (227 kDa). Por último, a extração com carbonato de sódio durante 2 horas permitiu obter pectatos de elevado peso molecular (*high molecular weight pectates*, HMWP), por apresentar ausência de acetilação e metil-esterificação e maior peso molecular (1235 kDa).

4. Interação dos polifenóis com os constituintes orais

O estabelecimento de modelos orais compreendendo três constituintes-chave (células do epitélio oral, película da mucosa e PS) foi adaptado da literatura (Susana Soares, Soares, et al., 2020).

Neste estudo, foi desenvolvido um modelo oral com uma linha celular de carcinoma espinocelular derivada do epitélio oral da língua humana, denominada HSC-3, para compreender a influência e contribuição dos diferentes constituintes orais:

- i) linha celular, mucina (Mu) e PS - modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS)
- ii) linha celular e PS (HSC-3-PS)
- iii) linha celular e mucina (HSC-3-Mu)
- iv) linha celular (HSC-3)
- v) proteínas salivares (PS)

Nas interações com os diferentes extratos de polifenóis: 2 extratos de bebidas – BTE e RWE e 1 extrato modelo de polifenol – GSE, que já tem vindo a ser estudado (Sónia Soares et al., 2019).

4.1 Interação do extrato de grainha de uva com os constituintes orais

A interação dos vários constituintes orais com os polifenóis presentes no GSE encontra-se representado na figura 31. Para cada interação, a concentração final de GSE utilizada foi 0,1 g/L e 0,3 g/L.

Os resultados representam a concentração de polifenol adsorvido para cada modelo oral estudado, expressa em equivalentes de catequina, sendo que o polifenol adsorvido é o polifenol que interagiu e ficou retido na microplaca.

Analisando a figura 31, é possível verificar que o GSE interage com todos os modelos orais, apresentando uma maior interação na concentração mais elevada. Isto é totalmente evidente no modelo oral completo, modelo contendo HSC-3 e PS e modelo contendo apenas PS.

O modelo oral completo é o modelo no qual o GSE interage mais, uma vez que apresenta uma grande quantidade de polifenol adsorvido. Desta forma, os resultados sugerem que possa existir um efeito sinérgico dos diversos constituintes orais

favorecendo as interações com o GSE. O modelo contendo HSC-3 e PS e o modelo contendo apenas PS são os seguintes modelos no qual o GSE interage mais, o que significa que as PS parecem ser o constituinte oral chave para conduzir as interações com os taninos condensados. Estes resultados são corroborados por dados recentes (Guerreiro et al., 2022).

Por outro lado, o GSE interage com menor preferência, na mesma proporção, com ambos modelos (HSC-3-Mu e HSC-3). Estes resultados são corroborados por dados recentes em que afirma que a presença de mucina leva a uma interação insignificante com as procianidinas (Sónia Soares et al., 2019).

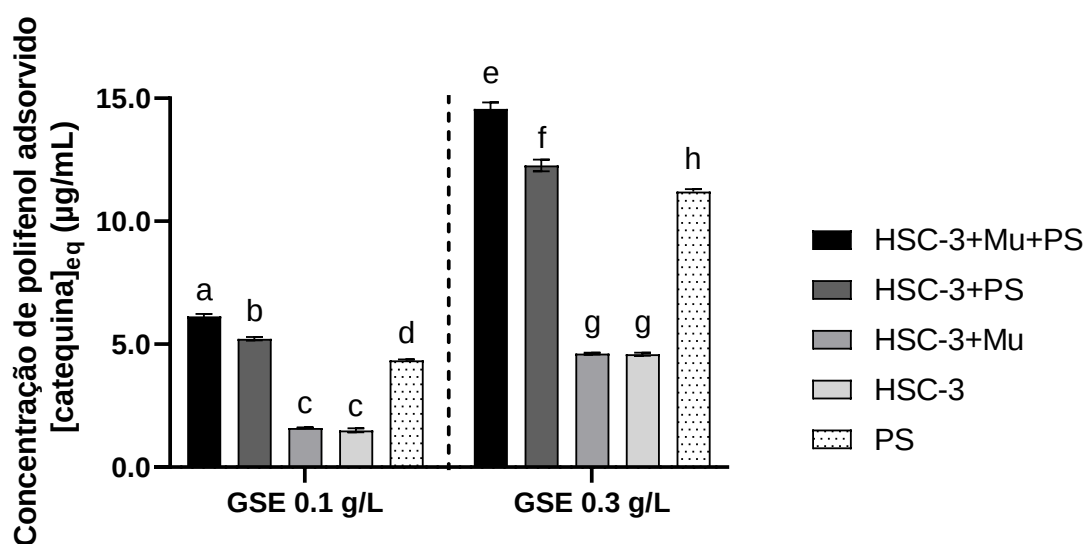


Figura 31 – Concentração de polifenol adsorvido em cada modelo oral estudado. As concentrações são expressas em equivalentes de catequina para o extrato de grainha de uva. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

4.2 Interação do extrato de chá preto com os constituintes orais

A interação dos vários constituintes orais com os polifenóis presentes no BTE encontra-se representado na figura 32. Para cada interação, a concentração final de BTE utilizada foi 0,2 g/L e 0,4 g/L.

Os resultados representam a concentração de polifenol adsorvido para cada modelo oral estudado, sendo expressos em equivalentes de EGCG.

Analisando a figura 32, é possível verificar que o BTE interage com todos os modelos orais, apresentando uma maior interação na concentração mais elevada. Isto é totalmente evidente no modelo oral completo, modelo contendo HSC-3 e PS e modelo contendo apenas PS.

O modelo oral completo é o modelo no qual o BTE interage mais, uma vez que apresenta uma grande quantidade de polifenol adsorvido. Logo a seguir, o modelo composto por HSC-3 e PS e o modelo contendo apenas PS são os segundos modelos no qual o BTE se liga mais, o que significa que as PS são o constituinte oral chave que favorece as interações com os flavan-3-óis. Estes resultados são corroborados por estudos recentes relativos ao extrato de chá verde, que afirma que a interação dos flavanóis parecem de alguma forma ser impulsionada pela presença de PS (Susana Soares, Soares, et al., 2020).

Por outro lado, o BTE interage com menor preferência, na mesma proporção, com ambos modelos (HSC-3-Mu e HSC-3).

De uma forma geral, é possível concluir que a sinergia de todos os constituintes orais pode favorecer as interações com o BTE.

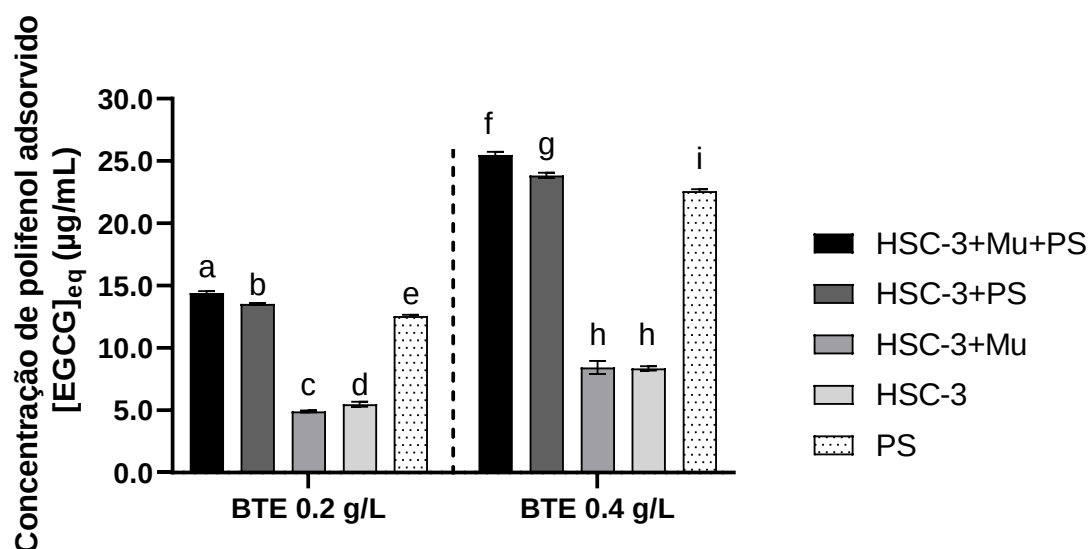


Figura 32 - Concentração de polifenol adsorvido em cada modelo oral estudado. As concentrações são expressas em equivalentes de EGCG para o extrato de chá preto. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

4.3 Interação do extrato de vinho tinto com os constituintes orais

A interação dos vários constituintes orais com os polifenóis presentes no RWE encontra-se representado na figura 33. Para cada interação, a concentração final de RWE utilizada foi 0,8 g/L e 1,2 g/L.

Os resultados representam a concentração de polifenol adsorvido para cada modelo oral estudado, sendo expresso em equivalentes de epicatequina.

Analisando a figura 33, é possível observar que existe um aumento da quantidade de polifenol adsorvido, com o aumento das concentrações aplicadas, para ambos modelos. Nota-se que o modelo oral completo é o modelo no qual o RWE interage mais, devido ao maior aumento de concentração de polifenol adsorvido. Por outro lado, o modelo HSC-3 e Mu e o modelo HSC-3 são os modelos menos preferidos pelo RWE, uma vez que apresenta uma interação menor e, por sua vez, uma menor concentração retida. Estes resultados são corroborados por um estudo recente realizado com o RWE, que afirma que a mucina parece reduzir significativamente a concentração de polifenol adsorvido (Susana Soares, Soares, et al., 2020).

A presença das PS é, de facto, um constituinte oral chave que favorece as interações dos ácidos fenólicos, estilbenos, flavonóis, antocianinas e taninos condensados, sendo que a sinergia de todos os constituintes orais proporciona um maior aumento das interações.

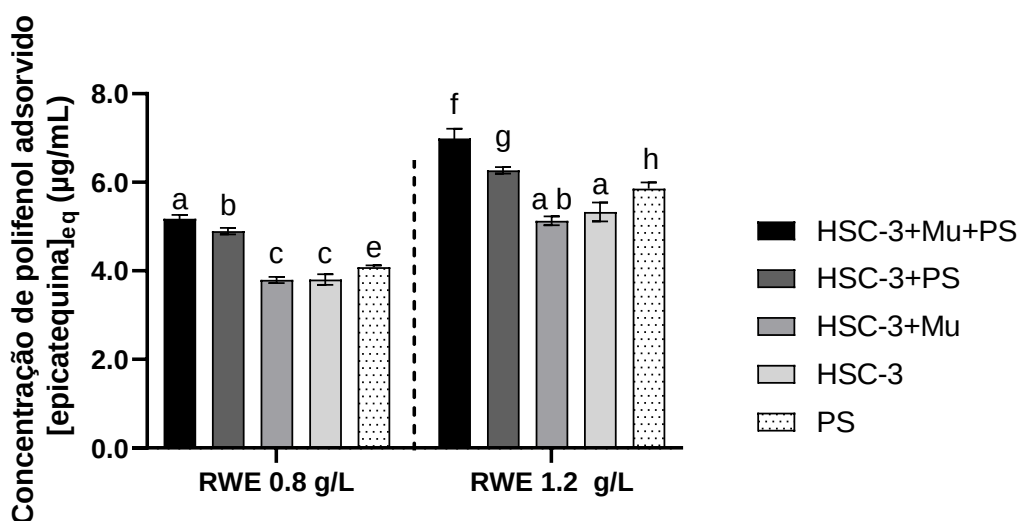


Figura 33 - Concentração de polifenol adsorvido em cada modelo oral estudado. As concentrações são expressas em equivalentes de epicatequina para o extrato de vinho tinto. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p < 0.05).

5. Influência dos polissacáridos nas interações entre polifenóis e constituintes orais

A influência de quatro frações de polissacáridos pécticos (HMEP, MMEP, LMWP, HMWP), extraídos da casca da laranja, foi avaliada através de um modelo celular quaternário com vários constituintes orais e três extratos de polifenóis: dois representativos de bebidas ricas em polifenóis (BTE, RWE) e um extrato modelo (GSE) que já tem vindo a ser estudado nas interações no modelo oral (Sónia Soares et al., 2019). Todos estes extratos de polifenóis foram escolhidos, devido à sua capacidade de interação com proteínas. O facto de serem extratos em vez de compostos puros, é mais interessante, uma vez que se sabe, com base em ensaios anteriores, que o comportamento destes compostos pode ser diferente quando estão sozinhos ou quando estão presentes numa mistura.

Desta forma, foram testadas duas concentrações de polissacáridos (1,0; 2,0 g/L) para compreender se estes compostos podem reduzir ou inibir a interação entre proteínas e polifenóis.

5.1 Influência dos polissacáridos na interação entre o extrato de grainha de uva e constituintes orais

5.1.1 Modelo Oral

As figuras 34 e 35 mostram a influência das quatro frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja (HMEP, MMEP, LMWP, HMWP), com diferentes concentrações (1,0; 2,0 g/L), na interação entre os taninos condensados presentes no GSE, com os constituintes orais do modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS), modelo oral contendo apenas PS e modelo contendo HSC-3-PS. De facto, foi no modelo oral completo (Figura 34), constituído por células, mucina e PS, que se verificou maior efeito dos polissacáridos em reduzir as interações entre os taninos condensados e as PS, quer para a concentração mais baixa (0,1 g/L), quer para a concentração mais alta (0,3 g/L) de GSE. A maior parte dos polissacáridos contribuiu para a diminuição de polifenol adsorvido, à exceção dos HMWP 2,0 g/L.

A percentagem de polifenol adsorvido (que interagiu e ficou retido) na presença de polissacárido foi calculada considerando o máximo de interação (adsorção), 100 %, na

ausência de polissacárido. Como em alguns casos parece que a presença dos polissacáridos poderá favorecer a interação dos polifenóis com os constituintes orais, apresentando valores superiores aos observados na ausência do polissacárido, optou-se por subtrair o valor 100 a todas as percentagens, de forma a perceber o efeito que os polissacáridos apresentam no modelo oral. De uma forma resumida, quanto menor for o valor percentual do polifenol adsorvido, maior será o efeito do polissacárido em inibir/reduzir as interações e, por isso, mais eficiente será.

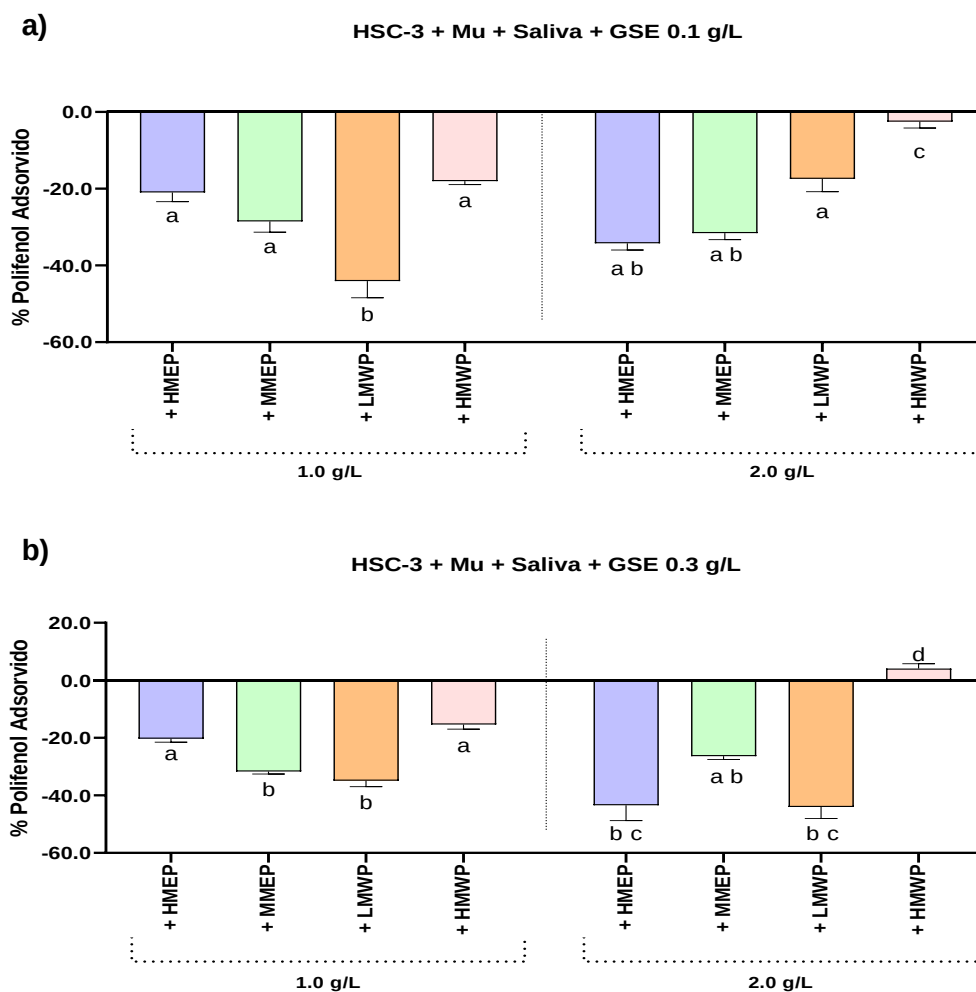


Figura 34 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS): a) após interação com GSE (0.1 g/L) e b) após interação com GSE (0.3 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

Para além do modelo oral completo, o modelo contendo apenas PS (Figura 35. a)) e o modelo contendo HSC-3-PS (Figura 35. b)) foram os seguintes modelos no qual se verificou efeito dos polissacáridos na concentração de GSE mais baixa e mais alta. No entanto, nem todas as frações de polissacáridos contribuíram para a diminuição de polifenol adsorvido, como é o caso dos LMWP, na concentração de 2,0 g/L e os HMWP em ambas concentrações. O modelo Mu-PS também apresentou uma tendência semelhante (Anexo 1).

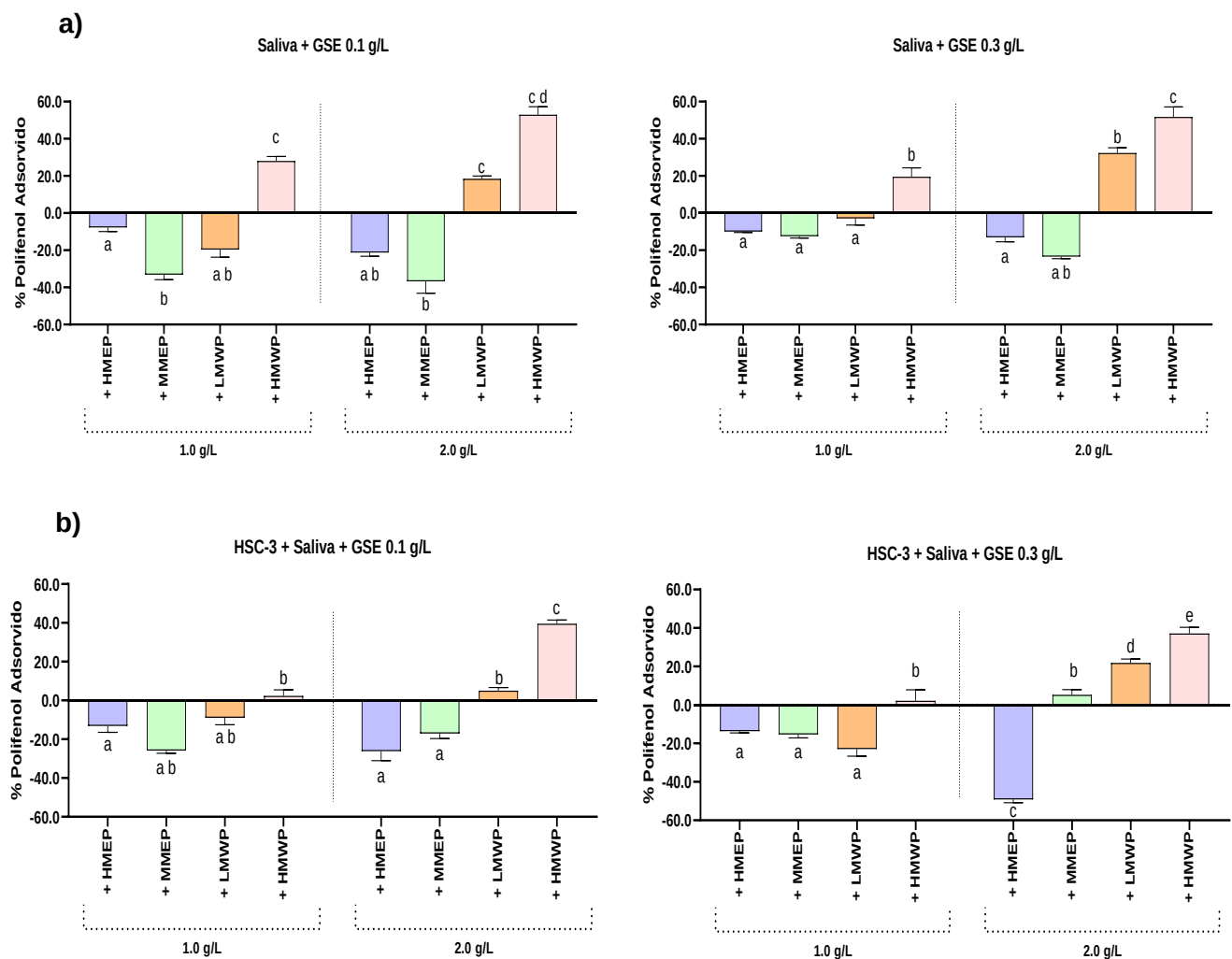


Figura 35 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) apenas PS e b) HSC-3-PS, após interação com GSE (0.1 g/L e 0.3 g/L) com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

Contudo, os polissacáridos apresentaram menos efeito nos modelos HSC-3-Mucina e HSC-3, que se encontram representados na figura 36, uma vez que a presença das diferentes frações de polissacáridos aumentou a interação entre o polifenol e o constituinte oral e consequentemente a precipitação de uma maior percentagem de polifenol.

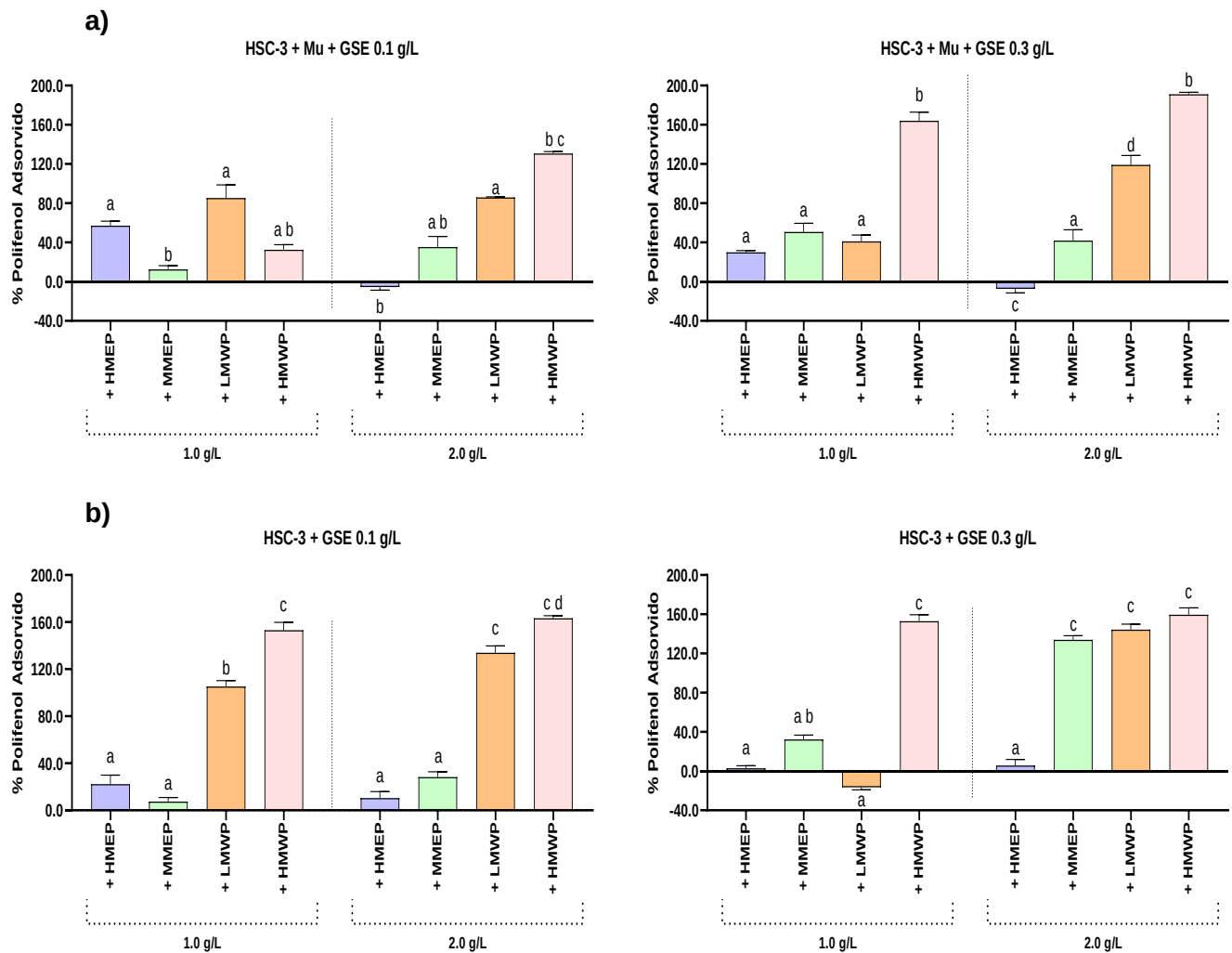


Figura 36 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) HSC-3-Mu, b) HSC-3, após interação com GSE (0.1 g/L e 0.3 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

5.1.2 Efeito da estrutura e da concentração de polifenol e polissacárido

A concentração de polifenol e de polissacárido foi um dos fatores que influenciou as diferentes interações com os constituintes orais. Como foi referido anteriormente, os polissacáridos tiveram um maior efeito no modelo oral completo (Figura 34).

Na concentração mais baixa de polifenol, foi possível observar uma maior redução da interação na presença dos LMWP 1,0 g/L, uma vez que este apresenta um baixo peso molecular e alta percentagem em ácidos urónicos e, por isso, sendo estes mais hidrofílicos podem interagir mais facilmente com os grupos hidrofílicos dos taninos condensados e estabelecer ligações por pontes de hidrogénio. Além disso, o facto de não apresentar acetilação e metil-esterificação dos ácidos urónicos, sugere a ocorrência de polissacáridos negativamente carregados e por isso mais facilidade em estabelecer ligações com os grupos hidrofílicos do GSE. Por esta razão existe uma diminuição na percentagem de polifenol, que corresponde a uma maior eficiência dos LMWP em reduzir as interações entre os polifenóis e proteínas. No caso dos LMWP 2,0 g/L observa-se na mesma efeito, mas um efeito menor, sendo que pode existir um menor efeito da concentração de polissacárido, quando existe pouco polifenol, muito provavelmente o polifenol até pode estar a interagir com o polissacárido e a precipitar, o que explica uma maior quantidade de polifenol adsorvido. As MMEP 2,0 g/L também mostraram ser eficientes na redução de precipitação de polifenol, o seu baixo peso molecular pode explicar este efeito, uma vez que apresentam cadeias mais pequenas e por isso menos impedimentos para se ligar aos taninos condensados.

Já na concentração de GSE mais alta (0,3 g/L), os polissacáridos na concentração mais alta (2,0 g/L) apresentam maior efeito, nomeadamente as HMEP e os LMWP, apesar de que na concentração mais baixa de polissacárido também se observa praticamente o mesmo efeito, mas como existe menos polissacárido disponível, mais polifenol acaba por precipitar. As HMEP 2,0 g/L e os LMWP 2,0 g/L foram os polissacáridos mais eficientes perante a concentração 0,3 g/L de GSE, tal facto pode ser explicado pela presença de um elevado número de ácidos úronicos que podem interagir com os grupos mais hidrofílicos dos taninos condensados e por isso diminuir a quantidade de polifenol adsorvido. Por sua vez, os HMWP 2,0 g/L foram os polissacáridos menos eficientes, uma vez que apresentam um elevado peso molecular e uma maior composição em açúcares neutros como a Arabinose (44 mol%) e Galactose (14 mol%), sugerindo a ocorrência de polissacáridos mais ramificados,

proporcionando impedimentos estéricos e por isso menor facilidade em se ligar aos taninos condensados.

Considerando o modelo oral composto apenas por PS e o modelo contendo HSC-3-PS (Figura 35), verifica-se uma tendência muito semelhante dos resultados. As maiores diferenças que se observam entre estes modelos e o modelo oral completo é o não efeito dos HMWP 1,0 g/L e LMWP 2,0 g/L, para qualquer concentração de polifenol, podendo concluir que para estes polissacáridos a sinergia dos constituintes orais (HSC-3-Mu-PS) favorece as interações. Por fim, apesar dos polissacáridos apresentarem algum efeito neste modelo, é notório que é um efeito muito menor, quando comparado ao modelo oral completo.

5.1.3 Efeito das proteínas salivares nas interações

O perfil proteico da saliva humana obtido por HPLC pode ser dividido em diferentes regiões que correspondem a várias famílias de PS: bPRPs, gPRPs, aPRPs, estaterina/péptido P-B e cistatinas, que estão maioritariamente associadas à perceção de adstringência.

Neste trabalho, para além do efeito dos polissacáridos na quantidade de polifenol adsorvido no modelo celular, também se pretendeu avaliar de forma mais detalhada o efeito dos polissacáridos no perfil salivar e compreender quais as famílias de PS que mais interagiram com os polifenóis e que os polissacáridos tiveram mais efeito. As condições experimentais analisadas por HPLC foram aquelas em que os polissacáridos demonstraram ter mais efeito no método de deteção em microplaca.

De facto, foi no modelo oral completo que se observou um maior efeito dos polissacáridos e, por isso os sobrenadantes dos ensaios celulares relativos a este modelo foram analisados por HPLC quanto ao perfil de PS.

Assim, foram seguidas as alterações neste perfil resultantes da interação dos taninos condensados (GSE 0,3 g/L) e de vários constituintes orais, no modelo oral completo, com os diferentes polissacáridos em concentrações de 1,0 g/L e 2,0 g/L. O efeito dos HMWP não foi analisado por HPLC, pois não apresentou efeito significativo na redução das interações entre polifenóis e os constituintes orais.

A figura 37 mostra os principais resultados obtidos do efeito dos polissacáridos, nas concentrações (1,0 g/L e 2,0 g/L), sobre a interação de várias famílias de PS (bPRPs, gPRPs, aPRPs, estaterina/péptido P-B e cistatinas) com o GSE no modelo oral completo, constituído por células, mucina e PS. A percentagem de interação na

presença do polissacárido foi calculada considerando as áreas dos picos cromatográficos na ausência de polifenol e polissacárido (controlo HSC-3-Mu-PS), a fim de determinar a percentagem de proteína que não interagiu. Como em alguns casos os valores ultrapassaram os 100%, optou-se por subtrair o valor 100 a todas as percentagens, de modo a perceber a diminuição da interação entre polifenóis e PS, na presença de polissacáridos no modelo oral completo.

De uma forma resumida, quanto menor for a percentagem de interação, maior será a percentagem de proteína que não precipitou na presença dos polissacáridos.

Analisando a figura 37, é possível observar um comportamento distinto dos polissacáridos, dependendo das famílias de PS envolvidas, no modelo oral completo. Embora nenhum dos polissacáridos na concentração de 1,0 g/L tenha apresentado efeito na interação dos taninos condensados com as bPRPs, a presença dos LMWP 2,0 g/L favoreceu em pequena percentagem a diminuição da interação entre as bPRPs e o GSE.

As HMEP 1,0 g/L foram consideradas as mais eficientes em reduzir as interações entre as PS e o GSE, sendo mais visível para as gPRPs, aPRPs, esterina/péptido P-B e cistatinas. Já as MMEP 1,0 g/L foram consideradas as menos eficientes, uma vez que só conseguiram reduzir a interação entre a esterina/péptido P-B com o GSE. Contrariamente ao descrito, as MMEP favoreceram um aumento da interação entre as bPRPs, aPRPs e cistatinas com o GSE. Por outro lado, os LMWP mostraram ser eficientes em reduzir as interações entre a esterina/péptido P-B e o GSE e entre as cistatinas e o GSE.

A maior diminuição da interação foi observada para a esterina/péptido P-B na presença das três frações de polissacáridos pécticos (HMEP, MMEP, LMWP), no modelo oral completo, sendo as HMEP e os LMWP estatisticamente mais eficientes que as MMEP. A razão pela qual as HMEP apresentaram um efeito eficaz na redução da interação destas proteínas pode ser justificada pela hidrofobicidade dos grupos esterificados na ligação aos aminoácidos mais apolares do péptido P-B e esterina, podendo formar um complexo proteína-polifenol-polissacárido, através do mecanismo ternário. O elevado teor em ácidos urónicos das MMEP pode facilitar a ligação destas aos resíduos de aminoácidos da esterina e péptido P-B carregados positivamente.

Relativamente à concentração de polissacárido, a concentração de 1,0 g/L parece ser, de uma maneira geral, a mais eficiente na redução das interações.

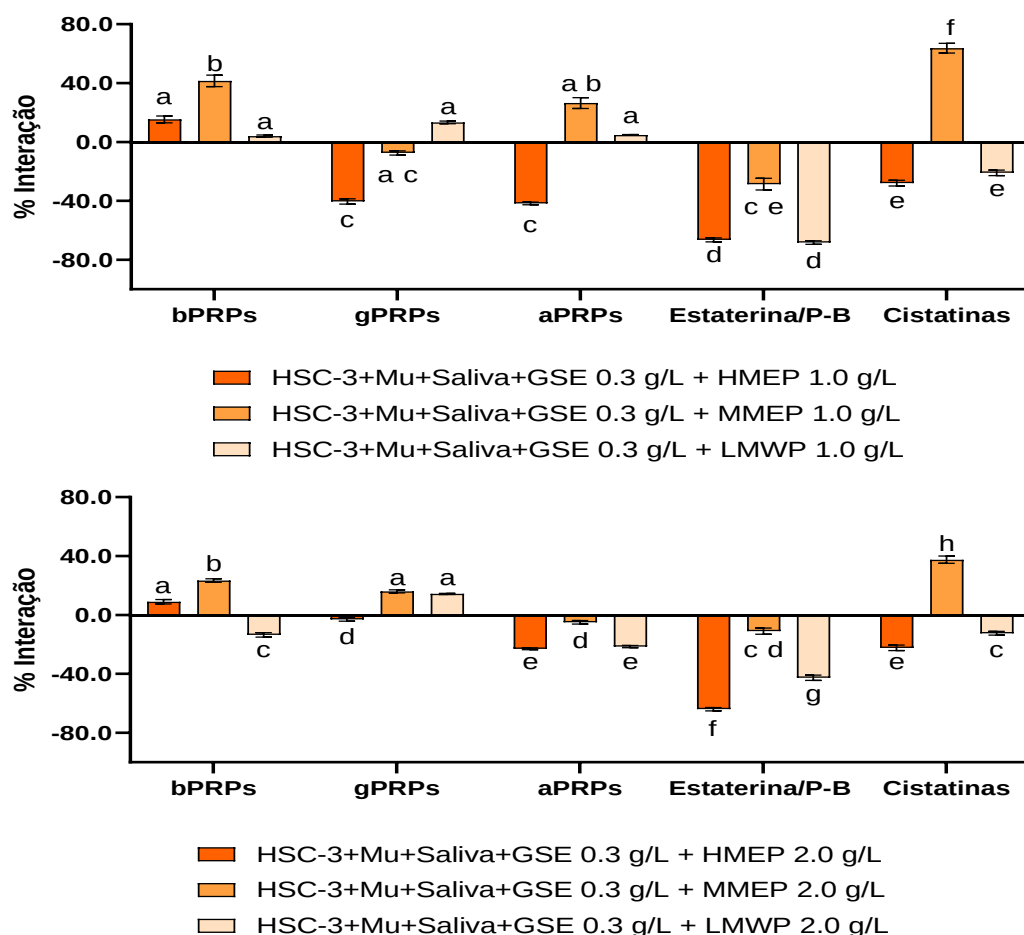


Figura 37 - Percentagem de interação para as diferentes famílias de PS, na presença das diferentes frações de polissacáridos (HMEP, MMEP e LMWP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

5.2 Influência dos polissacáridos na interação entre o extrato de chá preto e constituintes orais

5.2.1 Modelo oral

As figuras 38 e 39 mostram a influência das quatro frações de polissacáridos pécicos da casca de laranja (HMEP, MMEP, LMWP e HMWP), com diferentes concentrações (1,0; 2,0 g/L), na interação entre os polifenóis presentes no BTE, com os constituintes orais do modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS) e modelo oral contendo HSC-3-PS, respetivamente.

De facto, foi no modelo oral completo e modelo oral contendo HSC-3-PS, que se verificou maior efeito dos polissacáridos em reduzir as interações entre os polifenóis e as PS, quer para a concentração mais baixa (0,2 g/L) e mais alta (0,4 g/L) de BTE. Independentemente da concentração de polissacárido utilizada, todas as frações contribuíram para a diminuição de polifenol adsorvido, principalmente as frações MMEP, LMWP e HMWP.

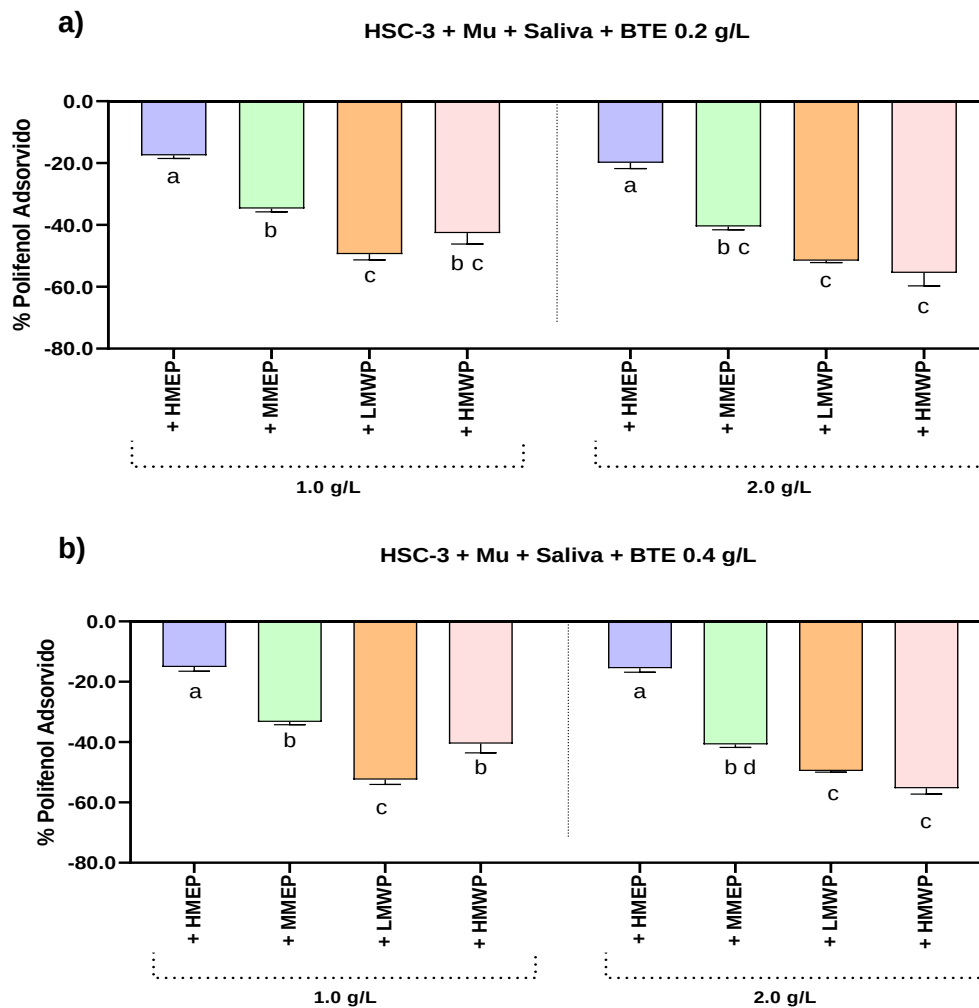


Figura 38 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS): a) após interação com BTE (0.2 g/L) e b) após interação com BTE (0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p < 0.05).

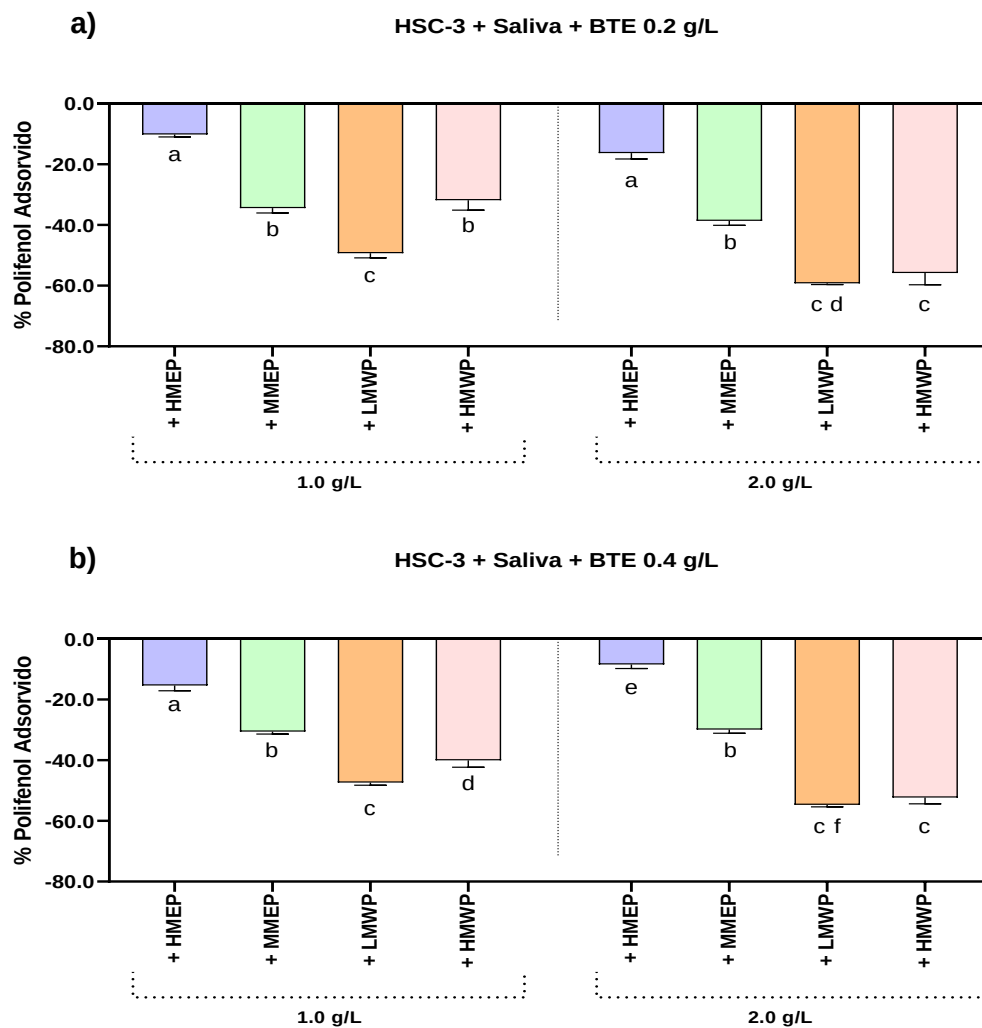


Figura 39 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo HSC-3-PS: a) após interação com BTE (0.2 g/L) e b) após interação com BTE (0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

Por outro lado, o modelo contendo apenas PS (Figura 40) foi o terceiro modelo em que os polissacáridos apresentaram maior efeito em reduzir as interações, uma vez que diminuíram a percentagem de polifenol adsorvido, independentemente das concentrações de polifenol e polissacárido utilizadas. De uma forma geral, todas as frações mostraram ser eficientes na redução das interações. Contrariamente ao observado nos outros dois modelos, as HMEP apresentaram um maior efeito, uma vez que se verificou uma maior redução da percentagem de polifenol adsorvido.

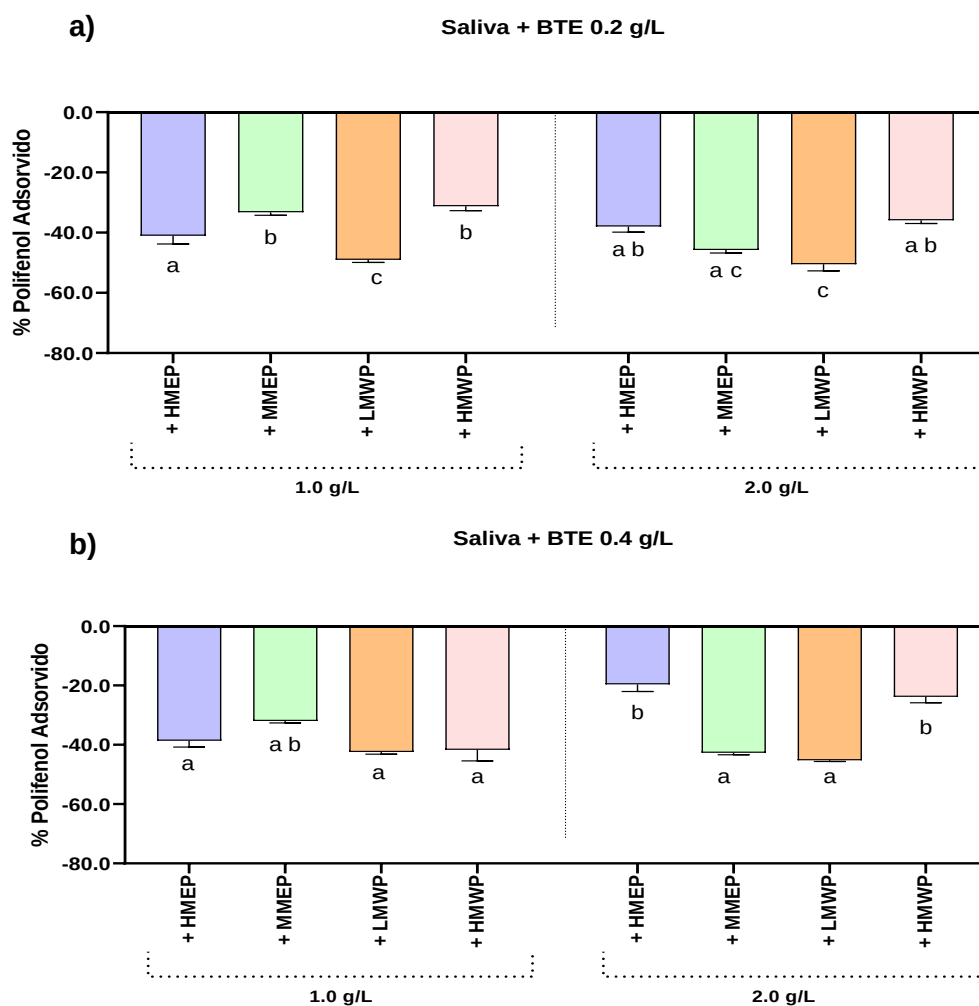


Figura 40 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo apenas PS: a) após interação com BTE (0.2 g/L) e b) após interação com BTE (0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

Contrariamente ao observado, os polissacáridos apresentaram menor efeito nos modelos HSC-3-Mu e HSC-3, uma vez que a presença de algumas frações de polissacáridos aumentou a interação entre o polifenol e o constituinte oral e consequentemente a precipitação de uma maior percentagem de polifenol (Anexo 2).

5.2.2 Efeito da estrutura e da concentração de polifenol e polissacárido

Relativamente ao modelo oral completo e ao modelo oral contendo HSC-3-PS (Figura 38 e 39), a tendência foi muito semelhante. O efeito das diferentes frações de polissacáridos parece ser independente da concentração de polifenol e polissacárido utilizada, uma vez que as percentagens de polifenol adsorvido são muito semelhantes para cada concentração e condição utilizada. Independentemente da concentração de polifenol utilizada, verifica-se uma redução acentuada do polifenol adsorvido, pela presença dos LMWP. Mais uma vez, o baixo peso molecular, o elevado número de ácidos urónicos e ausência de acetilação e metil-esterificação dos ácidos urónicos, influenciam as interações, uma vez que o tornam mais acessível em estabelecer ligações e também mais hidrofílico, de forma a estabelecer ligações por pontes de hidrogénio com os grupos mais hidrofílicos dos flavan-3-óis presentes no BTE. Os HMWP parecem ser a segunda fração de polissacáridos mais eficiente na redução das interações entre polifenóis e PS, especialmente quando se apresentam na concentração mais alta (2,0 g/L). Apesar desta fração apresentar um elevado peso molecular, a razão pela qual pode interagir com os flavan-3-óis pode dever-se à ausência de acetilação e metil-esterificação dos ácidos urónicos, o que sugere a ocorrência de polissacáridos pécticos negativamente carregados e, por isso, sendo as catequinas compostos hidrofílicos, podem estabelecer ligações mais facilmente. As MMEP são consideradas a terceira fração mais eficiente, devido ao seu baixo peso molecular e elevado teor em ácidos urónicos. Apesar de ser uma estrutura mais hidrofóbica por apresentar um grau de metil-esterificação médio (51%), é a fração que apresenta maior número de ácidos urónicos e, por isso, pode ser este o fator determinante para conseguir reduzir as interações.

Por fim, as HMEP foi a fração de polissacáridos menos eficiente, uma vez que foi a fração que menos reduziu a quantidade de polifenol adsorvido, quando comparado com as outras frações. O elevado peso molecular e o elevado grau de metil-esterificação podem ter sido o motivo pela qual não teve tanto efeito em reduzir as interações, uma vez que apresenta uma maior hidrofobicidade e por isso menos facilidade em se ligar aos flavan-3-óis presentes no BTE.

Relativamente ao modelo contendo apenas PS (Figura 40), os resultados são muito semelhantes aos anteriores. Contrariamente ao que foi observado nos outros dois modelos, as HMEP mostraram ser das mais eficientes, o que sugere uma maior afinidade com as PS isoladas dos restantes constituintes orais. Também foi possível verificar que para uma concentração elevada de polifenol, todos os polissacáridos na

concentração de 1,0 g/L revelaram uma capacidade semelhante em reduzir a percentagem de polifenol adsorvido.

No geral, é possível afirmar que quanto maior for número de ácidos urónicos e menor o grau de metil-esterificação dos ácidos urónicos, maior é a capacidade do polissacárido em reduzir as interações entre os flavan-3-óis e as PS.

5.2.3 Efeito das proteínas salivares nas interações

Da mesma forma que foi analisada a influência que os polissacáridos apresentam nas famílias de PS, nas interações entre o GSE e constituintes orais, também foi analisado o mesmo, mas nas interações entre o BTE e constituintes orais.

Tendo em conta os resultados obtidos na quantificação de polifenol adsorvido, foram escolhidas as condições experimentais mais promissoras, no qual os polissacáridos apresentaram maior efeito em reduzir/inibir as interações. Neste caso, foi no modelo oral completo que se observou um maior efeito dos polissacáridos e, por isso, os sobrenadantes dos ensaios celulares relativos a este modelo foram analisados por HPLC quanto ao perfil de PS. No caso das HMEP, estas mostraram ser mais eficientes no modelo oral contendo apenas saliva e, por isso, foi analisada somente esta condição, sendo esta a única exceção.

Assim, foram seguidas as alterações do perfil proteico resultantes da interação dos polifenóis do (BTE 0,4 g/L) e de vários constituintes orais, no modelo oral completo, com os diferentes polissacáridos em concentrações de 1,0 g/L e 2,0 g/L e no modelo oral contendo apenas saliva, apenas na presença das HMEP 1,0 g/L e 2,0 g/L.

A figura 41 mostra os principais resultados obtidos do efeito dos polissacáridos sobre a interação de várias famílias de PS (bPRPs, gPRPs, aPRPs, estaterina/péptido P-B e cistatinas) com o BTE no modelo oral completo, constituído por células, mucina e PS, na presença das frações MMEP, LMWP e HMWP e no modelo oral contendo apenas PS, na presença das HMEP.

Analisando a figura 41, é possível observar um comportamento distinto dos polissacáridos, na diminuição da interação das famílias de PS com o BTE, no modelo oral completo e modelo contendo apenas saliva. Para a concentração mais baixa de polissacárido, há diminuição da interação de todas as proteínas com o BTE, na presença das frações MMEP, LMWP e HMWP, à exceção das cistatinas na presença da fração

MMEP, uma vez que esta favoreceu um aumento da interação com o BTE, no modelo oral completo.

Já no modelo oral contendo apenas PS, as HMEP 1,0 g/L mostraram ser muito eficientes em reduzir a interação das cistatinas com o BTE. Tal facto, pode ser explicado pelo elevado grau de metil-esterificação dos ácidos úronicos, tornando a estrutura mais hidrofóbica e por isso mais facilidade em interagir com os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das cistatinas. Em relação às aPRPs, as HMEP também mostraram ser eficientes em reduzir as interações com o BTE.

Em relação às gPRPs, as MMEP e os LMWP foram os polissacáridos que tiveram mais efeito em reduzir as interações, no modelo oral completo. O número elevado de ácidos urónicos presentes nas duas frações pode favorecer as ligações aos polissacáridos presentes na estrutura das proteínas glicosiladas, o que pode sugerir a formação de uma rede complexo polifenol-proteína-polissacárido, através do mecanismo ternário.

Por fim, as gPRPs, aPRPs, a estaterina, péptido P-B e cistatinas foram as proteínas em que se observou uma maior diminuição das interações na presença dos HMWP. A ausência de acetilação e metil-esterificação desta fração, sugere a ocorrência de polissacáridos negativamente carregados e por isso uma maior afinidade em se ligar a resíduos de aminoácidos carregados positivamente.

Relativamente à concentração de polissacárido, a concentração de 2,0 g/L parece apresentar uma tendência semelhante comparativamente à concentração mais baixa (1,0 g/L), com exceção da família de gPRPs, que apresenta um comportamento inverso na presença das MMEP e LMWP e a família das bPRPs que também apresentam um comportamento contrário na presença das MMEP.

No modelo oral contendo apenas saliva, a influência da concentração de polissacárido é notória nas bPRPs e cistatinas, uma vez que as percentagens de interação são menores na presença de uma menor concentração de polissacárido, por isso uma maior concentração de polissacárido pode ser menos eficiente em reduzir as interações.

De uma maneira geral, a concentração de polissacárido mais baixa parece ser a mais eficiente na redução das interações entre as proteínas e polifenóis, no modelo oral completo e modelo oral contendo apenas saliva.

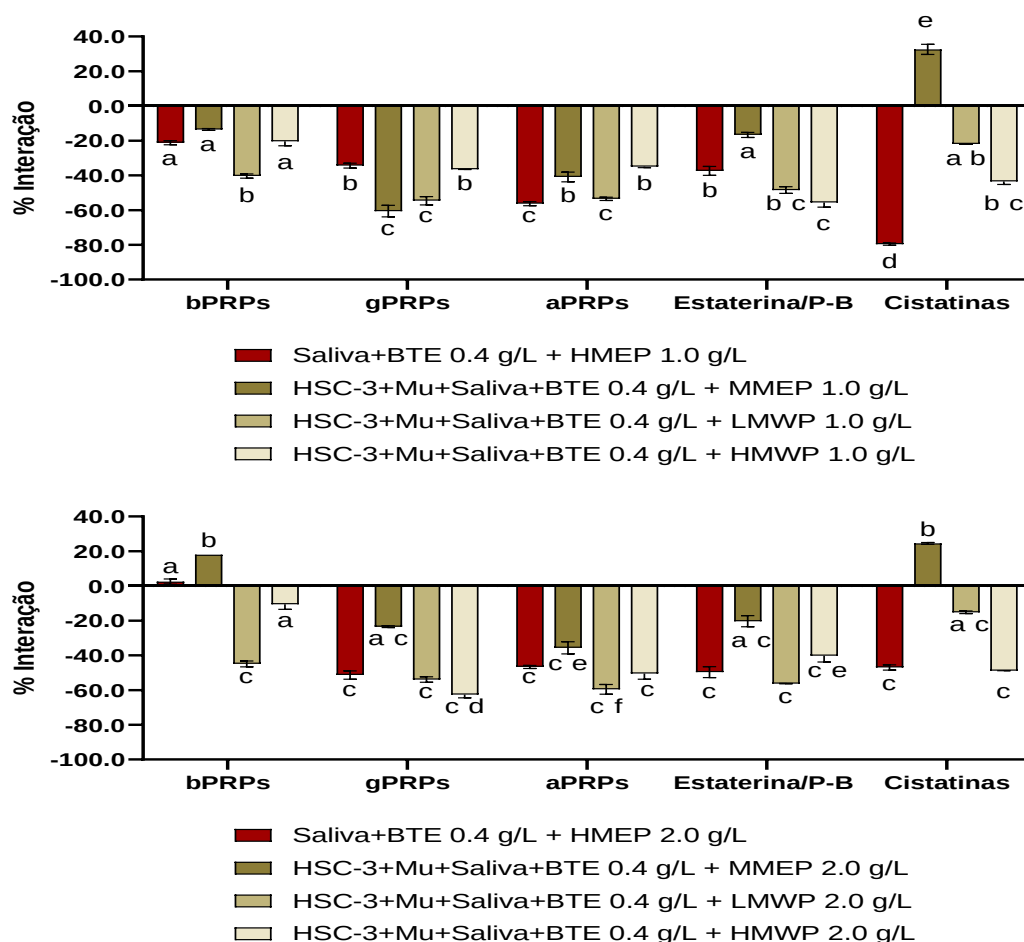


Figura 41 - Percentagem de interação para as diferentes famílias de PS, na presença das diferentes frações de polissacáridos (MMEP, LMWP e HMWP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS) e na presença da fração (HMEP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo contendo apenas saliva. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

5.3 Influência dos polissacáridos na interação entre o extrato de vinho tinto e constituintes orais

5.3.1 Modelo Oral

As figuras 42, 43 e 44 mostram a influência das quatro frações de polissacáridos pécicos da casca de laranja (HMEP, MMEP, LMWP e HMWP), com diferentes concentrações (1,0; 2,0 g/L), na interação entre os polifenóis presentes no RWE, com os constituintes orais do modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS), modelo contendo apenas saliva e modelo oral contendo HSC-3-PS, respetivamente.

De facto, foi no modelo oral completo (Figura 42), que se verificou maior efeito dos polissacáridos em reduzir as interações entre os polifenóis e as PS, especialmente na concentração mais alta (1,2 g/L) de RWE. Independentemente da concentração de polissacárido utilizada, todas as frações contribuíram para a diminuição de polifenol adsorvido.

Na concentração mais baixa de polifenol, é notório que a fração LMWP 1,0 g/L foi a fração que apresentou maior efeito na redução das interações entre polifenóis e PS. Já na concentração mais alta de polifenol, as frações HMEP 2,0 g/L e MMEP 2,0 g/L foram as mais eficientes, visto que reduziram mais de 40% da percentagem de polifenol adsorvido.

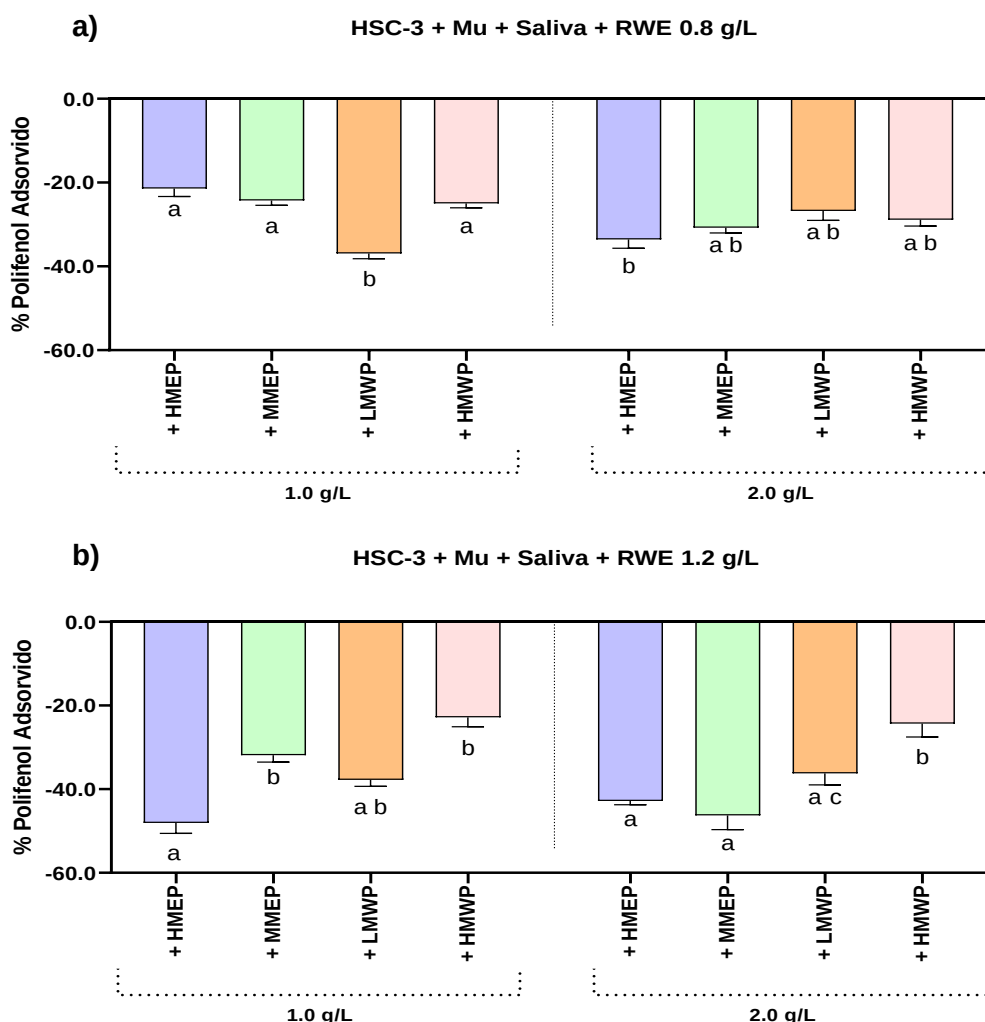


Figura 42 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS): a) após interação com RWE (0.8 g/L) e b) após interação com RWE (1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios ± EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p < 0.05).

O modelo contendo apenas PS (Figura 43) foi o segundo modelo em que se verificou um maior efeito dos polissacáridos na redução das interações, uma vez que diminuíram a percentagem de polifenol adsorvido, independentemente das concentrações de polifenol e polissacárido utilizadas. Por sua vez, é possível afirmar que existe um maior efeito dos polissacáridos para a concentração de polifenol mais elevada. De uma forma geral, todas as frações mostraram ser eficientes na redução das interações.

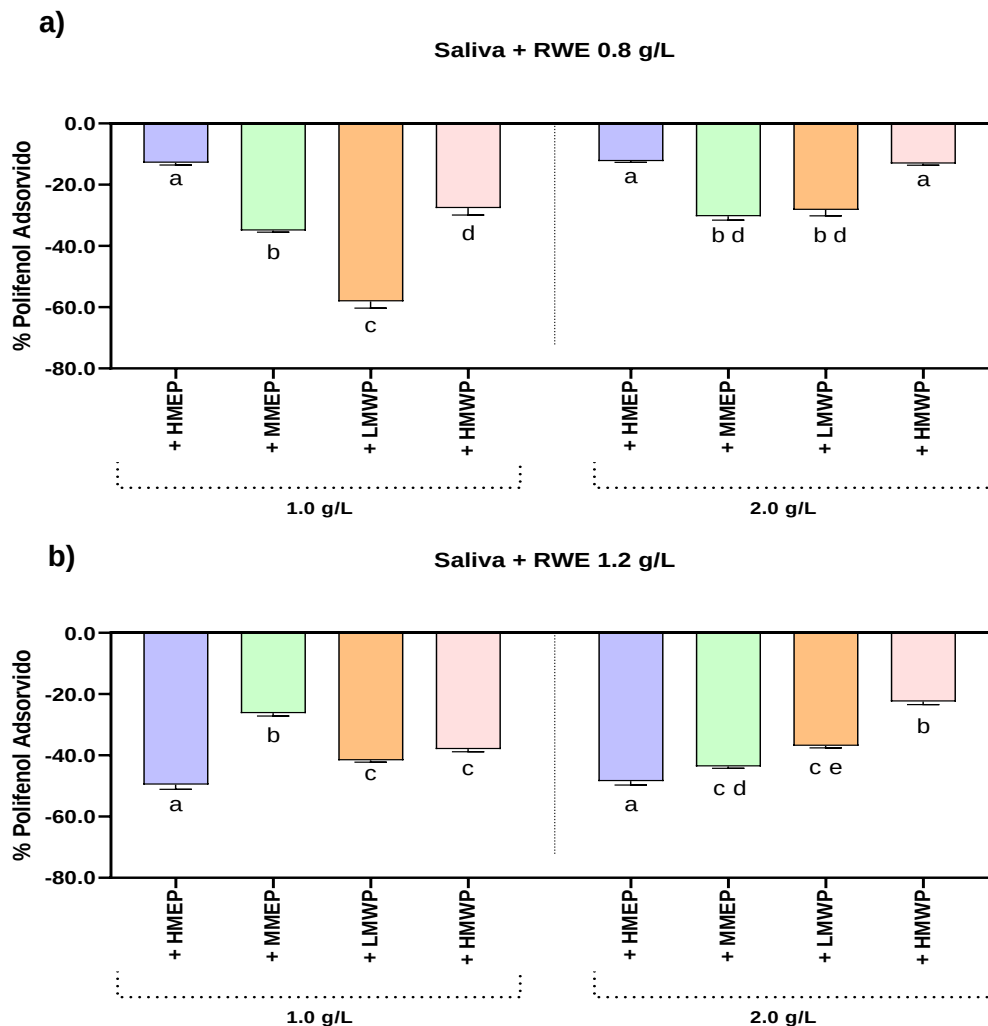


Figura 43 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo apenas PS: a) após interação com RWE (0.8 g/L) e b) após interação com RWE (1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p < 0.05).

O modelo composto por HSC-3-PS (Figura 44) foi o terceiro modelo em que se verificou maior efeito dos polissacáridos em reduzir as interações entre PS e polifenóis.

Os resultados apresentaram a mesma tendência comparativamente ao modelo oral completo, à exceção do comportamento diferente das HMEP 2,0 g/L. O efeito da concentração desta fração mostrou ser estatisticamente diferente da observada para a concentração de 1,0 g/L, desta forma é possível afirmar que as HMEP foram mais eficientes na concentração de 1,0 g/L. O efeito das restantes frações mostrou ser independente da concentração de polifenol e polissacárido utilizado.

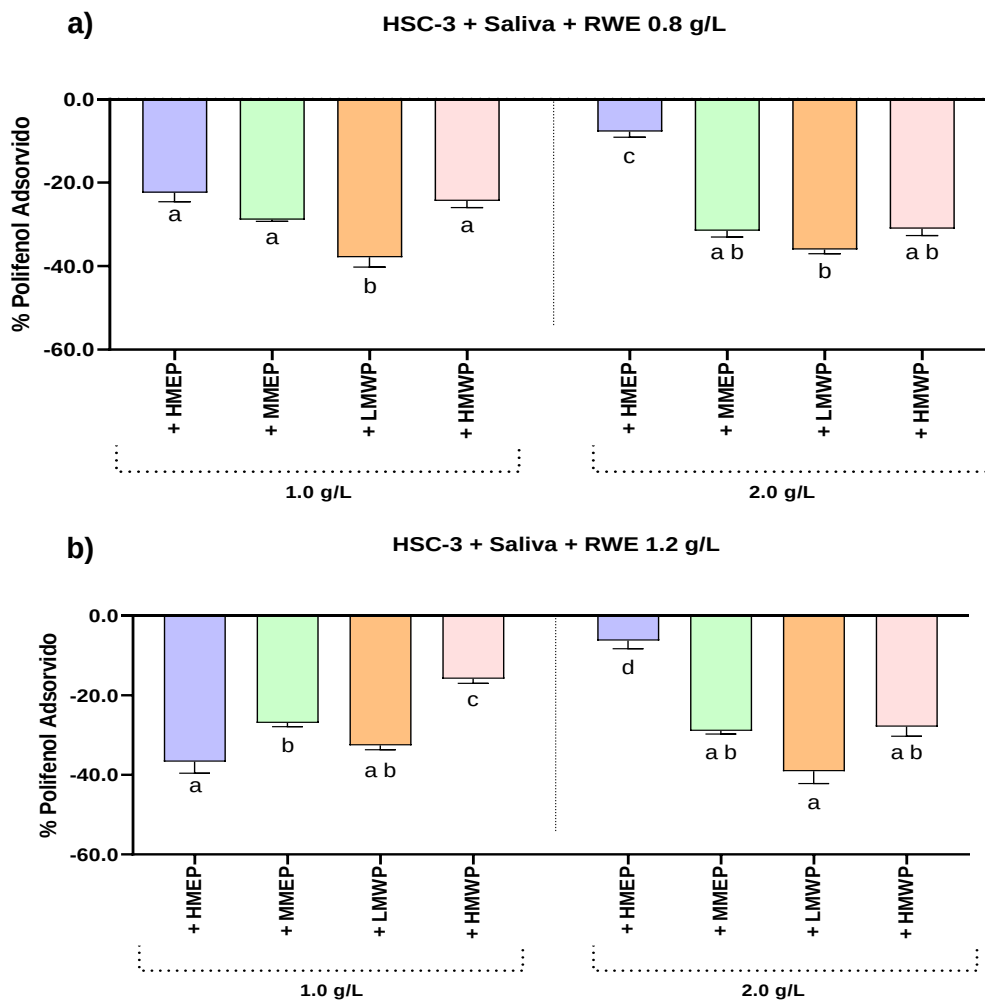


Figura 44 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo HSC-3-PS: a) após interação do RWE (0.8 g/L) e b) após interação do RWE (1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 3 experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

Os polissacáridos também apresentaram efeito em reduzir as interações entre PS e polifenóis, nos modelos compostos por HSC-3-Mu e HSC-3, apesar de ter sido um efeito menor quando comparado aos modelos referidos anteriormente (Anexo 3).

5.3.2 Efeito da estrutura e da concentração de polifenol e polissacárido

Relativamente ao modelo oral completo (Figura 42), o efeito das diferentes frações de polissacáridos parece ser influenciado pela concentração de polifenol, uma vez que as percentagens de polifenol adsorvido são mais baixas para a concentração de polifenol mais elevada. Por isso, os resultados mais promissores na redução das interações entre polifenóis e PS foram aqueles observados na maior concentração de polifenol (1,2 g/L).

Na concentração mais baixa de polifenol, a fração LMWP 1,0 g/L mostrou ser a mais eficiente, uma vez que foi a fração que reduziu cerca de 40% de polifenol adsorvido. Mais uma vez, a presença de um elevado número de ácidos urónicos e ausência de acetilação e metil-esterificação dos ácidos urónicos facilita a ligação aos compostos mais hidrofílicos presentes no RWE. Por outro lado, a fração HMEP 2,0 g/L mostrou ser mais eficiente que a fração HMEP 1,0 g/L, por reduzir quase o dobro da percentagem de polifenol adsorvido. Neste caso a concentração mais elevada de polissacárido pode influenciar a redução de interação entre os polifenóis e constituintes orais.

Relativamente à concentração mais alta de polifenol, as frações HMEP 2,0 g/L e MMEP 2,0 g/L mostraram ser as frações mais eficientes, uma vez que reduziram mais de 40% do polifenol adsorvido. No caso das MMEP, o baixo peso molecular beneficiou as ligações aos taninos por apresentar menos impedimentos estéricos e o elevado número de ácidos urónicos também ajudou a estabelecer ligações por pontes de hidrogénio com os grupos hidroxilo dos taninos condensados. Já as HMEP, apesar de apresentar um elevado peso molecular, o seu elevado número de ácidos urónicos permitiu estabelecer mais facilmente ligações com os compostos hidrofílicos dos polifenóis presentes no RWE e por isso reduzir a percentagem de polifenol precipitado. Pelo contrário, a fração HMWP 2,0 g/L foi a fração menos eficiente, tal facto pode ser explicado pelo seu elevado peso molecular e baixo número em ácidos urónicos.

Relativamente ao efeito da concentração de polissacárido, não existem muitas diferenças significativas, à exceção da fração HMEP na concentração de polifenol mais baixa e a fração MMEP na concentração de polifenol mais elevada.

Considerando o modelo oral composto apenas por PS (Figura 43) e o modelo composto por HSC-3 e PS (Figura 44) poucas diferenças nos resultados foram observadas em comparação com o modelo oral completo. Os resultados mais promissores na redução das interações entre polifenóis e PS continuam a ser aqueles observados na maior concentração de polifenol (1,2 g/L) e tendo em conta a concentração de polissacárido, de uma forma geral, a concentração mais eficiente é a de 1,0 g/L.

De uma forma geral, o elevado número de ácidos urónicos influencia as interações, uma vez que tornam os polissacáridos mais acessíveis em estabelecer ligações por pontes de hidrogénio com os grupos hidroxilo dos flavonóides e não flavonóides presentes no RWE.

Comparando os resultados dos três modelos, é possível observar que todos os polissacáridos foram eficientes na redução das interações no modelo oral completo. A sinergia de todos os constituintes orais (HSC-3-Mu-PS) pode ser um aspeto relevante, uma vez que favorece o efeito redutor dos polissacáridos neste modelo.

5.3.3 Efeito das proteínas salivares nas interações

Da mesma forma que foi analisada a influência que os polissacáridos apresentam nas famílias de PS, nas interações entre o GSE e BTE e constituintes orais, também foi analisado o mesmo, mas nas interações entre o RWE e constituintes orais.

Considerando os resultados obtidos na quantificação de polifenol adsorvido, foram escolhidas as condições experimentais mais promissoras, no qual os polissacáridos apresentaram maior efeito em reduzir/inibir as interações. O modelo oral completo foi o modelo em que se observou um maior efeito dos polissacáridos e, por isso, os sobrenadantes dos ensaios celulares relativos a este modelo foram analisados por HPLC quanto ao perfil de PS.

Assim, foram seguidas as alterações do perfil proteico resultantes da interação dos polifenóis (RWE 1,2 g/L) e de vários constituintes orais, no modelo oral completo, com os diferentes polissacáridos em concentrações de 1,0 g/L e 2,0 g/L.

A figura 45 mostra os principais resultados obtidos do efeito dos polissacáridos sobre a interação de várias famílias de PS (bPRPs, gPRPs, aPRPs, estaterina/péptido P-B e cistatinas) com o RWE no modelo oral completo, constituído por células, mucina e PS, na presença das frações HMEP, MMEP, LMWP e HMWP.

Analisando a figura 45, é possível observar um comportamento distinto dos polissacáridos, na diminuição da interação das famílias de PS com o RWE, no modelo oral completo.

Na concentração mais baixa de polissacárido, as frações LMWP e HMWP foram as mais eficientes na redução da interação entre o RWE e as bPRPs e, principalmente as cistatinas. De facto, a interação entre as cistatinas e o RWE foi significativamente reduzida pela presença dos HMWP, no modelo oral completo. Este efeito pode ser justificado pela ausência de acetilação e metil-esterificação, o que sugere a ocorrência de polissacáridos negativamente carregados e, por isso mais facilidade em se ligar a resíduos de aminoácidos positivamente carregados presentes nas cistatinas.

Por outro lado, há uma diminuição significativa da interação entre o RWE e as gPRPs na presença das frações HMEP, MMEP e LMWP. Este efeito pode estar correlacionado com o elevado número de ácidos urónicos presentes nas estruturas dos polissacáridos e, por isso, conseguir estabelecer mais facilmente ligações com os polissacáridos presentes na estrutura das gPRPs ou com os resíduos de aminoácidos mais hidrofílicos.

Em relação às aPRPs, a maior redução observada foi na presença das HMEP e LMWP. No caso da estaterina/péptido P-B, todos os polissacáridos mostraram ser eficientes na redução da interação com o RWE.

A concentração mais alta de polissacárido também mostrou uma redução na interação entre as PS e o RWE. Os resultados mais significativos foram observados na redução da interação entre o RWE e as bPRPs, gPRPs e estaterina/péptido P-B, na presença das HMEP e na redução da interação entre o RWE e as bPRPs, estaterina/péptido P-B e cistatinas, na presença dos LMWP e HMWP.

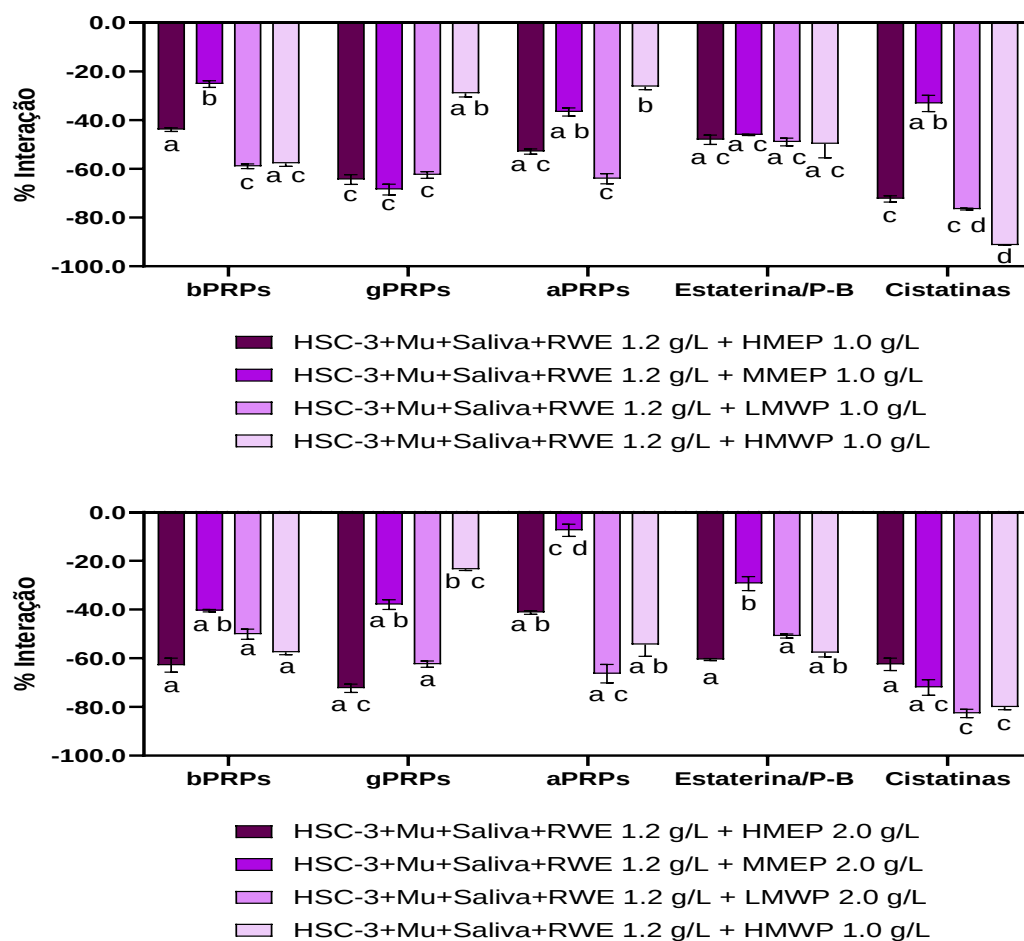


Figura 45 - Percentagem de interação para as diferentes famílias de PS, na presença das diferentes frações de polissacáridos (HMEP, MMEP, LMWP e HMWP), em diferentes concentrações (1.0 g/L e 2.0 g/L), no modelo oral completo (HSC-3-Mu-PS). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (*p < 0.05).

5.4 Ensaio de viabilidade celular

Para determinar se os três extratos de polifenóis e as quatro frações de polissacáridos eram tóxicos para as células epiteliais orais, monocamadas confluentes de células HSC-3 foram expostas a uma gama de concentrações de 0,3 g/L, 0,4 g/L, 1,2 g/L, respetivamente, para os extratos de polifenóis e 2,0 g/L para as frações de polissacáridos, durante 10 minutos, a 37 °C.

Os resultados mostraram que as exposições das células aos diferentes extratos tiveram um efeito significativo sobre a viabilidade das células, à exceção da condição

BTE 0,4 g/L + MMEP 2,0 g/L, conforme determinado pela ausência de diferenças na absorção do corante vermelho neutro, observada entre células de controlo e tratadas.

Por sua vez, as percentagens de viabilidade para todas as condições são superiores a 60%, o que sugere que os compostos estudados não são tóxicos para as células (Figura 46).

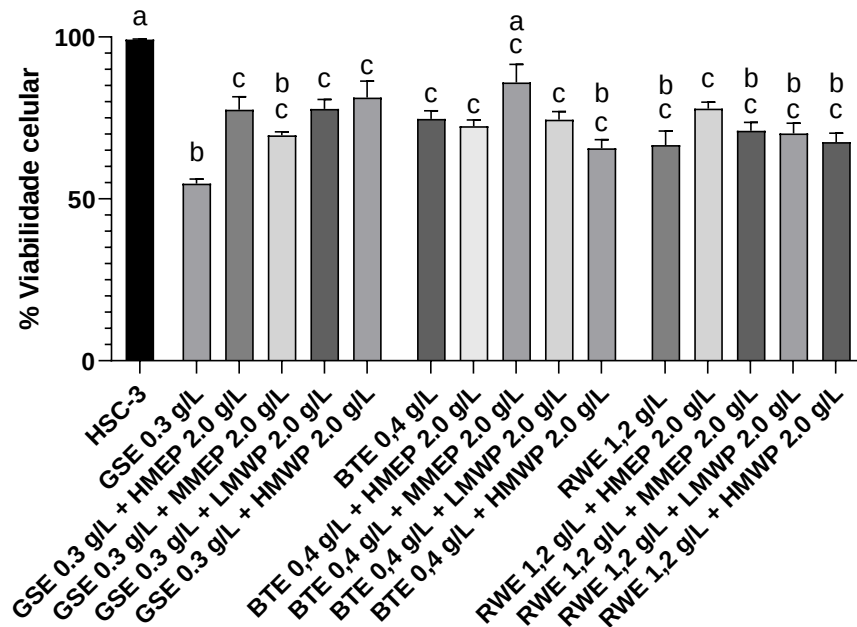


Figura 46 - Percentagem de viabilidade celular. Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos 4 repetições independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

IV. Conclusão e Perspetivas Futuras

IV. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este trabalho permitiu obter evidências de que os polissacáridos pécticos da laranja podem desempenhar um papel importante nas interações entre diferentes extratos de polifenóis, PS e os diferentes constituintes orais (células do epitélio oral e película da mucosa).

Os resultados obtidos mostraram que as diferentes frações de polissacáridos tiveram um maior efeito em reduzir as interações entre os diferentes extratos de polifenóis e diferentes constituintes orais, no modelo oral completo, composto por células, mucina e PS, especialmente nas concentrações mais elevadas de polifenol. A sinergia de todos os constituintes orais pode ser um aspeto relevante, uma vez que favoreceu o efeito redutor dos polissacáridos no modelo oral completo.

Verifica-se que o efeito dos polissacáridos depende da estrutura dos compostos ou das moléculas envolvidas (polifenóis, constituintes orais e polissacáridos) que podem influenciar o tipo de ligações moleculares estabelecidas.

De uma forma geral, através da quantificação de polifenol adsorvido no modelo celular por DMACA, foi possível concluir que os LMWP foram dos polissacáridos pécticos mais eficientes, reduzindo a quantidade de polifenol adsorvido após interações entre os diferentes extratos de polifenóis e os constituintes orais, principalmente no modelo oral completo, provavelmente devido ao seu baixo peso molecular, elevado teor de ácidos urónicos e ausência de acetilação e metil-esterificação dos ácidos urónicos. As HMEP também apresentaram um grande efeito em reduzir as interações entre o GSE e o RWE e constituintes orais, no modelo oral completo. No entanto, para o BTE, as HMEP demonstraram uma maior capacidade em reduzir a quantidade de polifenol adsorvido no modelo contendo apenas PS.

Através da análise do perfil salivar por HPLC, foi possível observar que a eficiência dos polissacáridos depende da família de PS. As gPRPs, aPRPs, estaterina/péptido P-B e cistatinas foram as famílias de PS que menos interagiram com os diferentes extratos de polifenóis, na presença das HMEP. A estaterina, o péptido P-B e as cistatinas foram as famílias de PS sobre as quais os polissacáridos tiveram um maior efeito, que por sua vez foram aquelas que mais interagiram com os extratos de polifenóis.

No geral, os resultados mostraram que as diferentes frações de polissacáridos pécticos foram capazes de reduzir as interações entre diferentes extratos de polifenóis e famílias de PS através de um modelo celular quaternário.

Importante salientar que foi das primeiras vezes que se utilizou um modelo mais realista para estudar o efeito dos polissacáridos nas interações entre polifenóis e

diferentes constituintes orais. A evidência de que frações de polissacáridos pécticos isolados da casca de laranja apresentam um efeito redutor nas interações entre polifenóis e constituintes orais (células do epitélio oral e película da mucosa) pode ser uma informação valiosa para a indústria alimentar. Além disso, estas frações de polissacáridos foram obtidas a partir de subprodutos alimentares, o que promove uma utilização mais sustentável dos recursos por esta indústria, sendo também uma forma de tornar este subproduto num produto com valor económico.

A existência de alternativas sustentáveis para reduzir as interações entre polifenóis e constituintes orais e, conseqüentemente, modular a percepção da adstringência, pode contribuir para o desenvolvimento de produtos alimentares mais saborosos, mais agradáveis ao consumidor e com (mais) benefícios para a saúde. De facto, a utilização de polissacáridos, é uma estratégia sustentável, uma vez que pode aumentar a aprovação do consumidor, evitando a perda de uma grande quantidade de polifenóis e os seus benefícios para a saúde.

Contudo, apesar destes resultados terem sido promissores a nível molecular, em estudos *in vitro*, estes têm de ser corroborados através de uma análise sensorial. Estudos futuros devem centrar-se na incorporação das mesmas frações de polissacáridos pécticos da casca de laranja nas mesmas bebidas ricas em polifenóis deste trabalho, como é o caso do vinho tinto e chá preto, a fim de avaliar o seu efeito na percepção da adstringência.

Como trabalho futuro, é também importante estudar as interações entre polifenol e polissacárido através de diversas técnicas, tais como calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal titration calorimetry*, ITC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) e voltametria cíclica, a fim de compreender os mecanismos envolvidos nas interações.

V. Referências Bibliográficas

V. Referências Bibliográficas

- Adrian J, C., Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., McDonald, C. J., & Williamson, M. P. (1996). Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. *FEBS Letters*, 382(3), 289–292. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00186-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00186-X)
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E., & Ros-García, J. M. (2010). Application and comparison of four selected procedures for the isolation of cell-wall material from the skin of grapes cv. Monastrell. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.020>
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5736–5742. <https://doi.org/10.1021/JF010827S/ASSET/IMAGES/LARGE/JF010827SF00003.JPEG>
- Asgari, K., Labbafi, M., Khodaiyan, F., Kazemi, M., & Hosseini, S. S. (2020). High-methylated pectin from walnut processing wastes as a potential resource: Ultrasound assisted extraction and physicochemical, structural and functional analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 1274–1282. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.224>
- Azevedo, J., Brandão, E., Soares, S., Oliveira, J., Lopes, P., Mateus, N., & De Freitas, V. (n.d.). *Polyphenolic Characterization of Nebbiolo Red Wines and Their Interaction with Salivary Proteins*. <https://doi.org/10.3390/foods9121867>
- Bajec, M. R., Pickering, G. J., Bajec, M. R., & Pickering, G. J. (2008). *Astringency: Mechanisms and Perception Astringency: Mechanisms*. 8398. <https://doi.org/10.1080/10408390701724223>
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36(18), 5566–5577. <https://doi.org/10.1021/bi9700328>
- Baydar, N. G., Sagdic, O., Ozkan, G., & Cetin, S. (2006). Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(7), 799–804.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01095.x>

- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, I. D., Venskutonis, P. R., Georgiev, M. I., Clément, C., & Luo, Z. (2020). Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. *Biotechnology Advances*, 43(July 2020), 107600. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107600>
- Bennick, A. (2002a). Interaction of Plant Polyphenols. *Crit Rev Oral Med*, 13(2), 184–196.
- Bennick, A. (2002b). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 13(2), 184–196. <https://doi.org/10.1177/154411130201300208>
- Boze, H., Marlin, T., Durand, D., Pérez, J., Vemhet, A., Canon, F., Sami-Manchado, P., Cheynier, V., & Cabane, B. (2010). Proline-rich salivary proteins have extended conformations. *Biophysical Journal*, 99(2), 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.050>
- Brandão, E., Santos Silva, M., García-Estévez, I., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2017). Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food Chemistry*, 228, 427–434. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.02.027>
- Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., Freitas, V. de, & Soares, S. (2019). Inhibition Mechanisms of Wine Polysaccharides on Salivary Protein Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 2955–2963. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B06184>
- Brandão, E., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2014). Human saliva protein profile: Influence of food ingestion. *Food Research International*, 64, 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.022>
- Brandão, E., Soares, S., Mateus, N., & Freitas, V. de. (2014). In Vivo Interactions between Procyanidins and Human Saliva Proteins: Effect of Repeated Exposures to Procyanidins Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9562–9568. <https://doi.org/10.1021/JF502721C>
- Cala, O., Dufourc, E. J., Fouquet, E., Manigand, C., Laguerre, M., & Pianet, I. (2023).

The Colloidal State of Tannins Impacts the Nature of Their Interaction with Proteins: The Case of Salivary Proline-Rich Protein/ Procyanidins Binding. 28, 30.
<https://doi.org/10.1021/la303964m>

- Canon, F., Belloir, C., Bourillot, E., Ne Brignot, H., Briand, L., Feron, G., Lesniewska, E., Nivet, C., Septier, C., Schwartz, M., Tournier, C., Vargiolu, R., Wang, M., Zahouani, H., & Neiers, F. (2021). Perspectives on Astringency Sensation: An Alternative Hypothesis on the Molecular Origin of Astringency. *Cite This: J. Agric. Food Chem*, 69, 3826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07474>
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8936–8944. <https://doi.org/10.1021/jf061835h>
- Castagnola, M., Cabras, T., Vitali, A., Sanna, M. T., & Messana, I. (2011). Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 409–418. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2011.04.002>
- Castaldo, L., Narváez, A., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Minno, G. Di, & Ritieni, A. (2019). Red wine consumption and cardiovascular health. *Molecules*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193626>
- Cheng, G., Duan, X., Jiang, Y., Sun, J., Yang, S., Yang, B., He, S., Liang, H., & Luo, Y. (2009). Modification of hemicellulose polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. *Food Chemistry*, 115(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.11.065>
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 223–229. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223s>
- Ciocalteau, F., Method, A., Quantify, T. O., In, P., & Mate, Y. (2020). *FOLIN CIOCALTEAU ADAPTED METHOD TO QUANTIFY.*
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033–1043. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T)
- Coimbra, M. A., Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1994). Isolation and

- characterisation of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europaea* L.). *Carbohydrate Research*, 252(C), 245–262. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)90019-1)
- Davies, H. S., Pudney, P. D. A., Georgiades, P., Waigh, T. A., Hodson, N. W., Ridley, C. E., Blanch, E. W., Thornton, D. J., & Uversky, V. N. (2014). *Reorganisation of the Salivary Mucin Network by Dietary Components: Insights from Green Tea Polyphenols*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108372>
- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y. W., Joshi, R. K., Jensen, S. B., Kerr, A. R., & Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2015.03.004>
- De Freitas, V., Carvalho, E., & Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81(4), 503–509. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00479-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00479-X)
- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). *Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins*. <https://doi.org/10.1021/jf000981z>
- De La Iglesia, R., Milagro, F. I., Campión, J., Boqué, N., & Martínez, J. A. (2010). Healthy properties of proanthocyanidins. *BioFactors*, 36(3), 159–168. <https://doi.org/10.1002/biof.79>
- de la Torre, I., Martin-Dominguez, V., Acedos, M. G., Esteban, J., Santos, V. E., & Ladero, M. (2019). Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 5975–5991. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09929-2>
- De Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de Ácidos fenólicos. *Quimica Nova*, 34(6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600023>
- Dinnella, C., Recchia, A., Tuorila, H., & Monteleone, E. (2011). Individual astringency responsiveness affects the acceptance of phenol-rich foods. *Appetite*, 56(3), 633–642. <https://doi.org/10.1016/J.APPET.2011.02.017>
- Dixon, R. A., Liu, C., & Jun, J. H. (2013). Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 329–335.

<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2012.07.004>

- Dodds, M. W. J., Johnson, D. A., & Yeh, C. K. (2005). Health benefits of saliva: A review. *Journal of Dentistry*, 33(3 SPEC. ISS.), 223–233. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2004.10.009>
- Dou, J., Lee, V. S. Y., Tzen, J. T. C., & Lee, M. R. (2007). Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7462–7468. <https://doi.org/10.1021/jf0718603>
- Fernandes, A. P. S. (2008). *Caracterização dos polissacarídeos pécticos da ameixa Ana Paula Sérgio Caracterização dos polissacarídeos pécticos da ameixa.*
- Fickel, J., Pitra, C., Joest, B. A., & Hofmann, R. R. (1999). A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 122(2), 225–229. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10112-3](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10112-3)
- García-Estévez, I., Alcalde-Eon, C., & Escribano-Bailón, M. T. (2017). Flavanol Quantification of Grapes via Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Application to Differentiation among Clones of *Vitis vinifera* L. cv. Rufete Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6359–6368. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05278>
- Gibbins, H. L., Yakubov, G. E., Proctor, G. B., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2014). What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, 184–192. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.05.020>
- Gonçalves, F. J., Fernandes, P. A. R., Wessel, D. F., Cardoso, S. M., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2018). Interaction of wine mannoproteins and arabinogalactans with anthocyanins. *Food Chemistry*, 243(September 2017), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.097>
- González-Muñoz, B., Garrido-Vargas, F., Pavez, C., Osorio, F., Chen, J., Bordeu, E., O'brien, J. A., & Brossard, N. (2021). *Wine astringency: more than just tannin-protein interactions.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.11672>
- Guerreiro, C., Brandão, E., de Jesus, M., Gonçalves, L., Pérez-Gregório, R., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2022). New insights into the oral interactions of different

- families of phenolic compounds: Deepening the astringency mouthfeels. *Food Chemistry*, 375, 131642. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131642>
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 809–812. https://doi.org/10.1021/JF60218A027/ASSET/JF60218A027.FP.PNG_V03
- Hagerman, A. E., & Robbins, C. T. (1987). Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *Journal of Chemical Ecology*, 13(5), 1243–1259. <https://doi.org/10.1007/BF01020552>
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571–1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>
- Helmerhorst, E. J., Traboulsi, G., Salih, E., & Oppenheim, F. G. (2010). Mass spectrometric identification of key proteolytic cleavage sites in statherin affecting mineral homeostasis and bacterial binding domains. *Journal of Proteome Research*, 9(10), 5413–5421. <https://doi.org/10.1021/pr100653r>
- Hofmann, T., Glabasnia, A., Schwarz, B., Wisman, K. N., Gangwer, K. A., & Hagerman, A. E. (2006). Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9503–9509. <https://doi.org/10.1021/jf062272c>
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>
- Williamson, M. I. P. W. (2002). *Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation*.
- Irene Messana, †, Tiziana Cabras, †, Rosanna Inzitari, ‡, Alessandro Lupi, §, Cecilia Zuppi, ‡, Chiara Olmi, ‡, Maria Benedetta Fadda, †, Massimo Cordaro, †, Bruno Giardina, ‡,§ and, & Massimo Castagnola*, ‡,§. (2004). Characterization of the Human Salivary Basic Proline-Rich Protein Complex by a Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research*, 3(4), 792–800. <https://doi.org/10.1021/PR049953C>
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P. A., & Williamson, M. P. (2004). Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions.

- Biomacromolecules*, 5(3), 942–949. <https://doi.org/10.1021/bm0345110>
- Josiah Ochieng, & Gautam Chaudhuri. (2010). Cystatin Superfamily. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*, 21(1A), 51–70. <https://doi.org/10.1353/hpu.0.0257>
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2019). Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/nu11010039>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, 61(1). <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Klepacka, J., Gujska, E., & Michalak, J. (2011). *Phenolic Compounds as Cultivar-and Variety-distinguishing Factors in Some Plant Products*. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0205-1>
- Kondo, M., Mulianda, R., Matamura, M., Shibata, T., Mishima, T., Jayanegara, A., & Isono, N. (2021). Validation of a phenol-sulfuric acid method in a microplate format for the quantification of soluble sugars in ruminant feeds. *Animal Science Journal*, 92(1), e13530. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13530>
- Krasteva, D., Ivanov, Y., Chengolova, Z., & Godjevargova, T. (2023). Antimicrobial Potential, Antioxidant Activity, and Phenolic Content of Grape Seed Extracts from Four Grape Varieties. *Microorganisms*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020395>
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. M. G. C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1725(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2005.06.004>
- Lima, J. D., Mazzafera, P., Moraes, W. da S., & da Silva, R. B. (2009). Tea: aspects related to the quality and prospects. *Ciencia Rural*, 39(4), 1270–1278.
- Lin, L. Z., Chen, P., & Harnly, J. M. (2008). New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8130–8140. <https://doi.org/10.1021/jf800986s>
- Lu, Y., & Bennick, A. (1998). Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*, 43(9), 717–728. <https://doi.org/10.1016/S0003->

9969(98)00040-5

- Mafrá, I., Lanza, B., Reis, A., Marsilio, V., Campestre, C., Angelis, M. De, & Coimbra, M. A. (2001). Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea europaea*). *Physiologia Plantarum*, 111(4), 439–447. <https://doi.org/10.1034/J.1399-3054.2001.1110403.X>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. In *Am J Clin Nutr* (Vol. 79). <https://academic.oup.com/ajcn/article/79/5/727/4690182>
- Março, P. H., Poppi, R. J., & Scarminio, I. S. (2008). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, 31(5), 1218–1223. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000500051>
- Mateus, N., Carvalho, E., Luís, C., & De Freitas, V. (2004). Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.072>
- Matsubara, S., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2006). Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 401–407. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612006000200024>
- Mcrae, J. M., & Kennedy, J. A. (2011). *Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and Their Impact on Astringency: A Review of Current Research*. 2348–2364. <https://doi.org/10.3390/molecules16042348>
- Minzanova, S. T., Mironov, V. F., Arkhipova, D. M., Khabibullina, A. V., Mironova, L. G., Zakirova, Y. M., & Milyukov, V. A. (2018). Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: A review. *Polymers*, 10(12), 1–31. <https://doi.org/10.3390/polym10121407>
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1–2), 3–20. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00227-9)
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Coria-Oliveros, A. J., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., del Rocío Martínez-Ruiz, N., Sayago-Ayerdi, S. G., & Alvarez-Parrilla, E. (2021). Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *Food Research International*, 140. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.110069>
- Naczek, M., Grant, S., Zadernowski, R., & Barre, E. (2006). Protein precipitating capacity

- of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chemistry*, 96(4), 640–647. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.03.017>
- Naczek, Marian, & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 41, Issue 5, pp. 1523–1542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>
- Nagel, C. W., & Glories, Y. (1991). Use of a Modified Dimethylaminocinnamaldehyde Reagent for Analysis of Flavanols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(4), 364–366. <https://doi.org/10.5344/AJEV.1991.42.4.364>
- Noreen, A., Nazli, Z. i. H., Akram, J., Rasul, I., Mansha, A., Yaqoob, N., Iqbal, R., Tabasum, S., Zuber, M., & Zia, K. M. (2017). Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 254–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.029>
- Nunes, C., Rocha, S. M., Saraiva, J., & Coimbra, M. A. (2006). *Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID)*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.039>
- Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2008). Effect of candying on cell wall polysaccharides of plums (*Prunus domestica* L.) and influence of cell wall enzymes. *Food Chemistry*, 111(3), 538–548. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.04.016>
- Payne, C., Bowyer, P. K., Herderich, M., & Bastian, S. E. P. (2009). Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chemistry*, 115(2), 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.061>
- Pérez, S., Mazeau, K., & Hervé du Penhoat, C. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 37–55. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00169-8)
- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1–2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00053-1)

- Pierce. (2020). *BCA Protein Assay Kit 23225*. 2161296, 0–3.
- Pires, M. A., Pastrana, L. M., Fucinõs, P., Abreu, C. S., & Oliveira, S. M. (2020). Sensorial Perception of Astringency: Oral Mechanisms and Current Analysis Methods. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9081124>
- Ployon, S., Morzel, M., Belloir, C., Bonnotte, A., Bourillot, E., Briand, L., Lesniewska, E., Lherminier, J., Aybeke, E., & Canon, F. (2018). Mechanisms of astringency: Structural alteration of the oral mucosal pellicle by dietary tannins and protective effect of bPRPs. *Food Chemistry*, 253, 79–87. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.01.141>
- Prat-garc, S., Oliveira, J., Alamo-sanza, M., Freitas, V. De, Nevares, I., & Mateus, N. (2021). *in Red Wines during Ageing in Custom Oxygenation Oak Wood Barrels*.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2006.06.025>
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519–534. <https://doi.org/10.1002/med.10033>
- Robards, K., & Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst*, 122(2), 11–34. <https://doi.org/10.1039/a606499j>
- Roblegg, E., Coughran, A., & Sirjani, D. (2019). Saliva: An all-rounder of our body. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 142, 133–141. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2019.06.016>
- Romani, A., Ieri, F., Turchetti, B., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., & Buzzini, P. (2006). Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(2), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.11.031>
- Sarneckis, C. J., Damberg, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 39–49. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00042.x>

- Siebert, K. J. (1999). *Effects of Protein - Polyphenol Interactions on Beverage Haze , Stabilization , and Analysis*. 47(2).
- Siebert, K. J. (2009). Chapter 2 Haze in Beverages. *Advances in Food and Nutrition Research*, 57, 53–86. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)57002-7](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)57002-7)
- Siebert, K. J., Troukhanova, N. V, & Lynn, P. Y. (1996). *Nature of Polyphenol-Protein Interactions*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Silva, M. S., García-Estévez, I., Brandão, E., Mateus, N., De Freitas, V., & Soares, S. (2017). Molecular Interaction between Salivary Proteins and Food Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6415–6424. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01722>
- Sivadasan, P., Gupta, M. K., Sathe, G. J., Balakrishnan, L., Palit, P., Gowda, H., Suresh, A., Kuriakose, M. A., & Sirdeshmukh, R. (2015). Human salivary proteome - a resource of potential biomarkers for oral cancer. *Journal of Proteomics*, 127, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.039>
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2019). *Development of a New Cell-Based Oral Model To Study the Interaction of Oral Constituents with Food Polyphenols*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05575>
- Soares, S. E. (2002). Phenolic acids as antioxidants. In *ANTIOXIDANTES* | 71 Rev. Nutr (Vol. 15, Issue 1).
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Mateus, N., De Freitas, V., & Soares, S. (2019). Development of a New Cell-Based Oral Model to Study the Interaction of Oral Constituents with Food Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05575>
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2020). Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 11, p. 2590). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25112590>
- Soares, S., Brandão, E., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017). Sensorial properties of red wine polyphenols: Astringency and bitterness. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), 937–948. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.946468>
- Soares, S., Ferrer-Galego, R., Brandão, E., Silva, M., Mateus, N., & De Freitas, V.

- (2016). *Contribution of Human Oral Cells to Astringency by Binding Salivary Protein/Tannin Complexes*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02659>
- Soares, Susana, Mateus, N., & de Freitas, V. (2012). Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. *Food Research International*, 49(2), 807–813. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.09.008>
- Soares, Susana, Mateus, N., & De Freitas, V. (2007). *Interaction of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by Fluorescence Quenching*. <https://doi.org/10.1021/jf070905x>
- Soares, Susana, Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Oral interactions between a green tea flavanol extract and red wine anthocyanin extract using a new cell-based model: insights on the effect of different oral epithelia. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69531-9>
- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024–1032. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1024::AID-JSFA567>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1024::AID-JSFA567>3.0.CO;2-S)
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Vermeris, W., & Nicholson, R. (2006). Families of phenolic compounds and means of classification. *Phenolic Compound Biochemistry*, 1–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_1/COVER
- Victor de Freitas, & Nuno Mateus. (2012). Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present Contributions. Mechanisms of Astringency Perception. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 724–746. <https://doi.org/10.2174/138527212799958002>
- Vincken, J., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., Mccann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., & Visser, R. G. F. (2003). *If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I . Implications for Cell Wall Architecture 1*. 132(August), 1781–1789. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022350.in>
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>

- Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1990). Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiologia Plantarum*, 80(4), 568–575. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1990.TB05680.X>
- WatreLOT, A. A., Le Bourvellec, C., Imbert, A., & Renard, C. M. G. C. (2013). Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules*, 14(3), 709–718. <https://doi.org/10.1021/bm301796y>
- White, P. J., Pollak, L. M., & Duvick, S. (2007). Improving the fatty acid composition of corn oil by using germplasm introgression. *Lipid Technology*, 19(2), 35–38. <https://doi.org/10.1002/lite.200600009>
- Wróblewski, K., Muhandiram, R., Chakrabarty, A., & Bennick, A. (2001). The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 268(16), 4384–4397. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2001.02350.X>
- Yang, G., Zhang, S., Jiang, H., Ding, S., Xu, S., & Fang, J. (2020). The Protective Effect of Polyphenols for Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology* | *Www.Frontiersin.Org*, 1, 1407. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01407>
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, 100(4), 1356–1364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.012>

VI. Anexos

VI. Anexos

Anexo 1

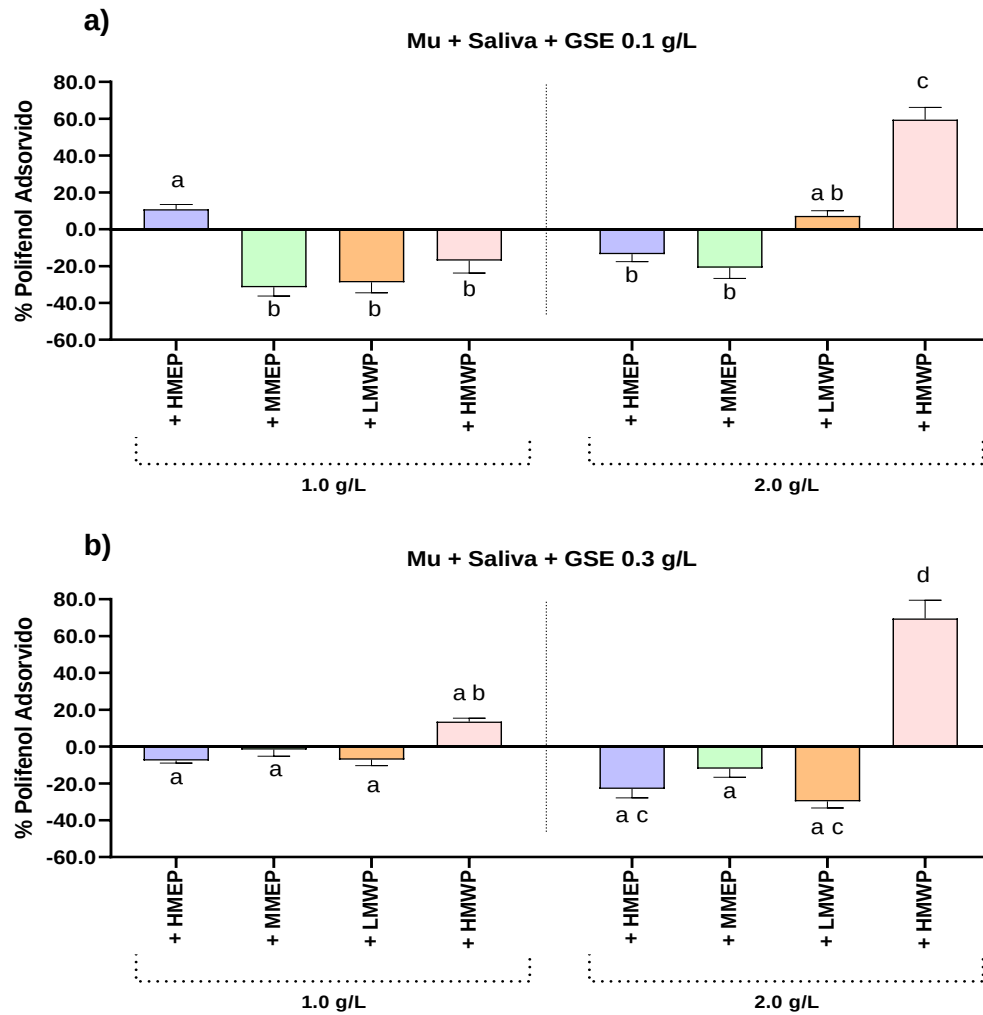


Figura 47 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo Mu-PS: a) após interação com GSE (0.1 g/L), b) após interação com GSE (0.3 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

Anexo 2

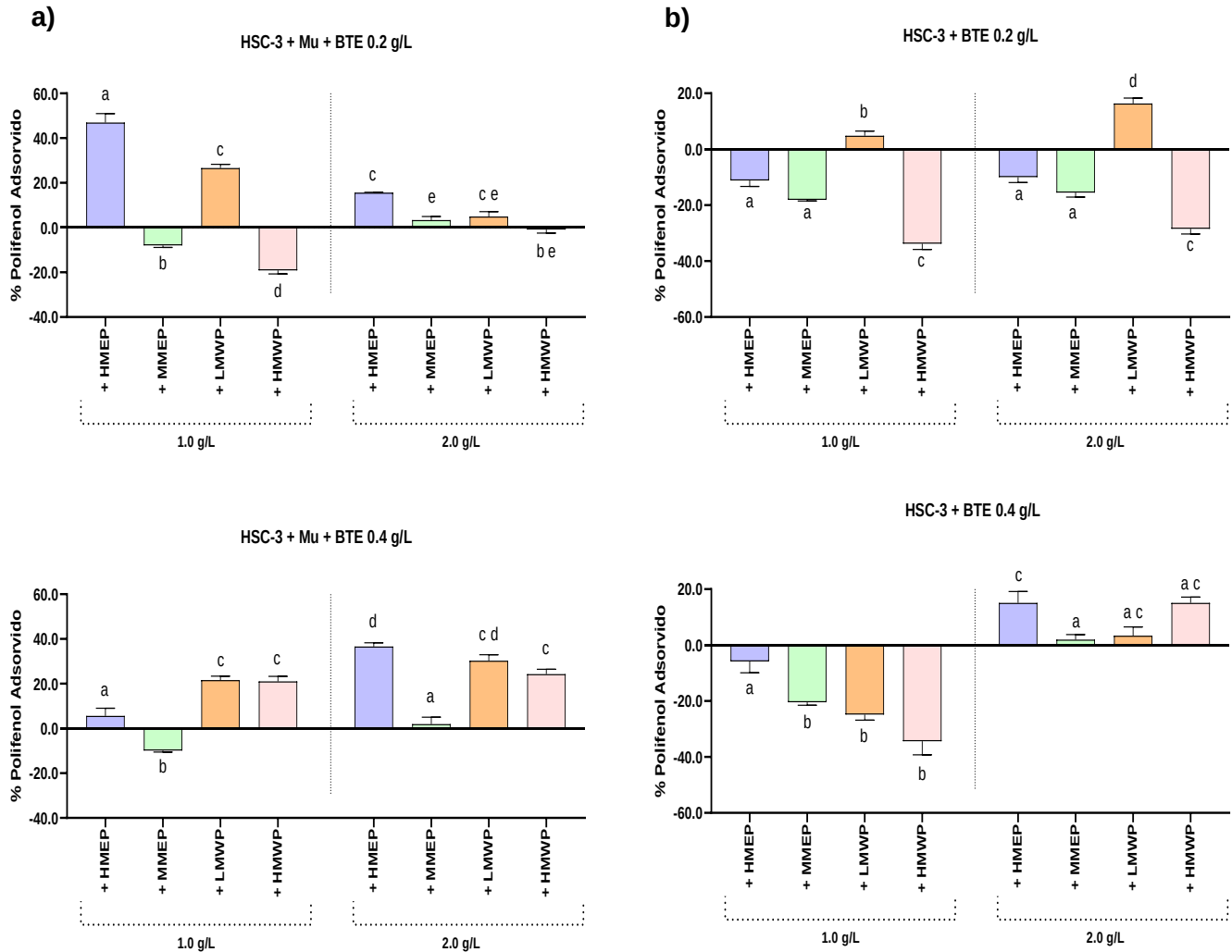


Figura 48 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) HSC-3-Mu, b) HSC-3, após interação com BTE (0.2 g/L e 0.4 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).

Anexo 3

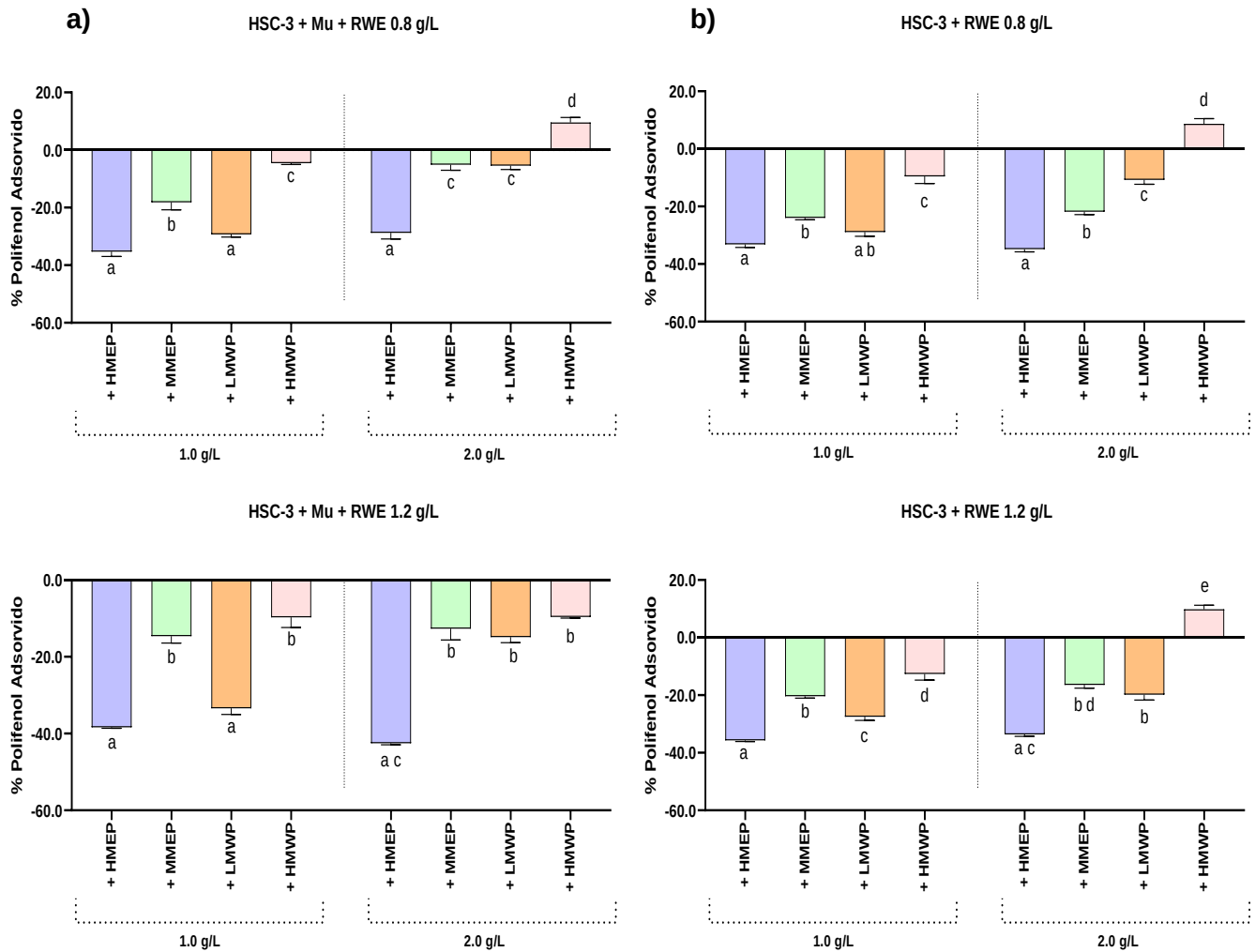


Figura 49 - Percentagem de polifenol adsorvido no modelo oral contendo a) HSC-3-Mu, b) HSC-3, após interação com RWE (0.8 g/L e 1.2 g/L), com as diferentes frações de polissacáridos (1.0 g/L e 2.0 g/L). Os dados são expressos como valores médios $\pm$ EPM para pelo menos três experiências independentes. As associações de letras distintas para cada barra representam resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0.05$).